

## REVISÃO DA TAXONOMIA E CLASSIFICAÇÃO DO TRYPANOSOMA CRUZI – IMPORTÂNCIA DA GENÉTICA \*

Ana Maria de Oliveira \*\*

### RESUMO

Desde que foi reconhecida a existência de variação intra-específica do *T. cruzi*, os pesquisadores têm procurado, insistentemente, desvendar este fenômeno e sua repercussão nos aspectos clínico, epidemiológico e diagnóstico da Doença de Chagas, nas áreas endêmicas.

Recentes avanços nas áreas de Bioquímica e Imunologia têm trazido imensa contribuição para caracterização das cepas isoladas do *T. cruzi* e somente um estudo multidisciplinar dos comportamentos biológico, antigênico e bioquímico do parasita poderá solucionar o problema da taxonomia e classificação do *T. cruzi* e suas implicações clínico-epidemiológicas na Doença de Chagas.

Desde a descoberta da Doença por Carlos Chagas, os pesquisadores tentam obter critérios absolutos de diferenciação do parasita: comportamentos morfológico e biológico, composição antigênica, padrões isoenzimáticos e caracterização do kDNA.

Dos estudos já realizados sobre o assunto conclui-se que: 1 – Uma cepa-tipo particular pode predominar, em dada área geográfica; 2 – Cepas de diferentes tipos mostram diferentes composições antigênicas; 3 – A sensibilidade a drogas exibe correlação com a cepa-tipo; 4 – Cepas do mesmo tipo têm padrões isoenzimáticos semelhantes; 5 – As diferenças nas cepas-tipo são mais importantes em determinar o curso da infecção que a carga genética do hospedeiro.

Quanto aos estudos da composição antigênica, os resultados indicam que: 1 – Existe heterogeneidade intra-específica tanto em amostras originais como em populações clonadas; 2 – Esta heterogeneidade inclui os parasitas obtidos de pacientes, mamíferos e vetores; 3 – Ocorre com epimastigotas e tripomastigotas.

A análise molecular dos componentes e produtos metabólicos do parasita (ligação às lectinas, padrões isoenzimáticos e análise de esquizodemas) tem alcançado grande avanço na última década. Apesar das limitações de ordem técnica, dos estudos realizados até agora, conclui-se que: 1 – Parece haver relação entre zimodema e tipo de ciclo epidemiológico de transmissão; 2 – Parece haver correlação entre amostras clonadas e lectinas; 3 – Os três zimodemas (Z1, Z2 e Z3) podem infectar o homem e causar doença aguda, mas raramente o Z3 infecta; 4 – Padrões heterozigotos são

\* Trabalho do Curso de Mestrado em Medicina Tropical do IPTESP, UFG.

\*\* Aluna do Curso de Mestrado em Medicina Tropical do IPTESP, UFG.

comuns na América do Sul, sugerindo que o *T. cruzi* seja diplóide, porém sem evidências de trocas de genes entre os zimodemas; 5 — Existe clara associação entre a expressão de uma glicoproteína de superfície (GP 72000 Kd) e zimodema Z1.

## INTRODUÇÃO

A tendência generalizada entre biólogos e geneticistas de conceituar espécies pela capacidade de cruzamento entre seus membros e formação de populações relativamente homogêneas, dificilmente poderia ser aplicada nos tripanosomas de mamíferos, nos quais a reprodução sexual aparentemente inexistente, as variações intra-específicas são numerosas e uma classificação natural filogenética é impossível de ser alcançada em virtude da inexistência de espécimes fósseis.

Em consequência destes fatos, a classificação dos tripanosomas se baseia, necessariamente, em critérios operacionais que levam em conta, na análise de suas relações taxonômicas, as afinidades dos seus ciclos biológicos, as relações parasita-hospedeiro e aspectos morfológicos. (BRENER, 1979) (13).

A classificação dos organismos compreendidos no Phylum Protozoa sofreu nos últimos anos modificações decorrentes de conhecimentos advindos da citologia, bioquímica e microscopia eletrônica das células eucarióticas. Em virtude destes progressos foi possível dar exata caracterização à super-classe Mastigophora, a ordem Kinetoplastida. Na família Tripanosomatidae, da ordem Kinetoplastida estão incluídos vários gêneros de flagelados monogenéticos e digenéticos. Os Tripanosomas são flagelados digenéticos que durante o ciclo evolutivo apresentam

as formas fundamentais de amastigota, promastigota, epimastigota, esferomastigota e tripomastigota. (HOARE e cols. 1966) (20).

Modificações posteriores na taxonomia ocorreram devido à crescente complexidade do grupo de Tripanosomas de mamíferos e a necessidade de se distinguir espécies afins. Assim, foram criadas as Seções Stercoraria e Salivaria que se apossam no comportamento do parasita primariamente no vetor e secundariamente no homem. (HOARE, 1964 in BRENER, 1979) (13).

Sem prejuízo das seções foram criados subgêneros baseados, tanto quanto possível, nas hipóteses filogenéticas correntes e no caso particular do *T. cruzi* sugeriu-se o subgênero Schizotrypanum.

Desde o início das investigações sobre a doença de Chagas tem sido observada uma tendência dos pesquisadores que procuram reproduzir a doença, a conservar os parasitas obtidos de casos humanos, de animais naturalmente infectados ou de inseto vetor, por meio de passagens em animais suscetíveis ou "in vitro".

Procurando estabelecer convenções e definições de termos em Protozoologia para uniformização e distinção entre os diferentes materiais, tendo em vista a manutenção de amostras por criopreservação, define-se "cepa" como uma população derivada de um "isolado", mantida em cativeiro em reprodução contí-

nua por passagens seriadas, em cultura ou animais de laboratório. (LUMSDEN, 1970) (24).

Dentro destes critérios estão enquadradas todas as amostras que têm sido isoladas e mantidas em laboratório, designadas "cepas". Desta maneira existe na literatura mundial inúmeras cepas, muitas das quais têm sido utilizadas por diversos pesquisadores sob diversos aspectos. (in ANDRADE, 1974) (4).

Quando isoladas e estudadas em laboratório as cepas apresentam distintas características que permitem sua individualização. Evidentemente que não há sentido na multiplicidade do número de cepas cada vez que o *T. cruzi* é isolado, surgindo então a necessidade de se estabelecer critérios para se agruparem as amostras conforme seus caracteres. (ANDRADE, 1974) (4).

Apesar das amostras, em geral, não terem qualquer ponto de seleção a não ser a procedência, nota-se nos diversos trabalhos publicados uma tendência dos diversos autores em estudarem, comparativamente, as amostras de que dispõem, utilizando-se de vários parasitas, embora de modo isolado. Tem se verificado diferenças de comportamento entre as mesmas. (ANDRADE, 1974) (4).

Como resultado temos um volume de dados biológicos acumulados usados para estudo de variação intra-específica do *T. cruzi*.

Amostragem do comportamento dessas cepas pode ser feita por vários caminhos, desde o curso de infecção no hospedeiro até a análise molecular dos componentes ou produtos metabólicos do parasita. Recentemente vários aspectos

têm sido enfatizados e várias pesquisas tentam alcançar critérios absolutos de diferenciação, tais como: composição antigênica do parasita (ANDRADE e cols. 1981) (7), padrões isoenzimáticos. (ANDRADE e cols. 1983) (9); MILES e cols., 1980(25), e caracterização de DNA do cinetoplasto (MOREL e cols., 1980) (29).

Estes estudos além de importantes na taxonomia e classificação do parasita, pretendem, em última análise, estabelecer possíveis correlações entre o comportamento experimental das amostras em condições de laboratório e algumas implicações clínico-epidemiológicas, procurando determinar o papel do parasita na patogenia da doença. (ANDRADE, 1985) (8).

Pelo fato de se tratar de assunto extremamente importante, complexo e intrigante nos revisamos à literatura mais recente que trata do problema da taxonomia e classificação do *T. cruzi*, com ênfase especial aos métodos bioquímicos de distinção do parasita.

## 1 — BASES PARA IDENTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DO *T. CRUZI*

A preocupação em identificar e classificar os Tripanosomatídeos, especialmente o *T. cruzi* surgiu desde a descrição inicial da doença, quando se percebeu a existência de variações nas características do parasita. Desde então e, principalmente mais recentemente, com os avanços na área de imunologia e bioquímica, novos conceitos têm sido introduzidos.

O próprio processo de classificação exige que se use o maior número possível de caracteres, ainda que alguns te-

nham maior importância que outros. Assim, até o momento utilizam-se nas identificações e classificação do *T. cruzi* critérios morfológicos, antigênicos e bioquímicos. (Quadro I).

### 1.1 – Caracterização Biológica:

O caminho inicial na tentativa de se caracterizar as várias cepas isoladas de *T. cruzi* começa com a caracterização morfológica do parasita. A partir daí, tenta-se fazer estudos comparativos para se determinar os aspectos comuns e restringir as amostras a padrões "standart" e Tipos. (ANDRADE, 1976) (5).

Tais estudos não estão em oposição e não impedem pesquisas analíticas mais refinadas, que são indiscutíveis para a ciência básica e taxonomia do parasita.

Das pesquisas já feitas sobre o assunto, alguns interessantes resultados já foram produzidos:

(1) Uma cepa-Tipo particular pode predominar em uma dada área geográfica (ANDRADE, 1974) (4);

(2) Cepas de diferentes Tipos mostraram diferentes composições antigênicas (ANDRADE e cols. 1981) (7);

(3) Sensibilidade e resistência a drogas exibe correlação com cepa-Tipo (ANDRADE e cols., 1973) (3); ANDRADE e cols., 1977 (6);

(4) Cepas pertencendo ao mesmo Tipo têm padrões isoenzimáticos similares (ANDRADE e cols., 1983) (9);

(5) Quando diferentes amostras de camundongos "inbred" são usados, os cepas-Tipo de *T. cruzi* parecem ser mais importantes na determinação do curso de infecção que a carga genética do hospedeiro.

(ANDRADE e cols., 1983) (9); ANDRADE, 1985) (8).

Duas diferentes estratégias têm sido usadas para estudar as características biológicas em condições experimentais. Uma delas consiste na amplificação do parasita isolado por passagens seriadas no sangue de vertebrado e tão logo a população esteja bem estabelecida poderá se investigar vários fenômenos com os tripomastigotas tais como: curso de infecção em diferentes hospedeiros, interação parasita-hospedeiro e papel da imunidade no curso da infecção. A segunda estratégia é o estudo do *T. cruzi* nas suas características inerentes não influenciadas por manutenção em laboratório. (BRENER, 1985) (14).

Diferenças na morfologia das formas sangüíneas do *T. cruzi* foram reportadas logo na descoberta da doença por Chagas em 1909 (BRENER, 1979) (13).

Padrões morfológicos vários do *T. cruzi* no sangue correlacionado com a curva parasitêmica foram observados em hospedeiros infectados. Em duas cepas testadas, Y e CL, o pico de parasitemia foi, respectivamente, no 7o. e 12o.-14o. dia de infecção, nos quais, as formas delgadas constituíram, aproximadamente, 90% dos tripomastigotas sangüíneos da cepa Y, enquanto as formas largas predominaram na cepa CL. (BRENER, 1977) (12).

A avaliação do percentual de formas largas e delgadas de tripomastigotas no sangue periférico do camundongo infectado tem mostrado que diferentes amostras podem ser caracterizadas por este aspecto morfológico. (ANDRADE, 1974) (4).

Diferença seletiva na distribuição tecidual dos estágios intracelulares do *T.*

*cruzi*, tem sido discutida e é um dos mais importantes aspectos, para distinção das várias amostras do *T. cruzi*. Amostras com predomínio de formas delgadas no sangue apresentam maiores taxas de multiplicação e marcado parasitismo do fígado e baço (reticulotropismo), enquanto que as com predomínio de formas largas apresentam lento aumento de parasitismo e intenso miocardiotropismo. (ANDRADE e cols., 1970) (2).

A respeito do comportamento do *T. cruzi*, virulência e patogenicidade devem ser bem definidos. Virulência é a capacidade do parasita de se multiplicar dentro do hospedeiro experimental e que é geralmente influenciado por vários fatores. Patogenicidade é algo mais intrínseco e está correlacionado com a capacidade de produzir lesões teciduais e morte.

O curso de infecção no hospedeiro vertebrado avaliado pelo período pré-patente, curva de parasitismo e taxa de mortalidade podem trazer evidências do grau de virulência do parasita.

A partir de experimentos em tripomastigotas metacíclico derivado do vetor usado em xenodiagnóstico de 17 casos de D. Chagas fase crônica, as cepas puderam ser diferenciadas em três grupos: o grupo I (baixa virulência), período pré-patente longo (11-30 d.), parasitismo máximo de  $10^5$  parasitas/ml entre 21-40 dias de infecção e sem mortes; grupo II (virulência intermediária) período pré-patente de 8-18 dias, parasitismo máximo de  $6 \times 10^5$  parasitas/ml entre 23-29 dias de infecção e com todos animais sobrevivendo à fase aguda; grupo III (alta virulência) período pré-patente menor que 6-12 dias, mais alto parasitismo de  $2-3 \times 10^6$ /ml e maioria

dos animais morreram entre 20/30 dias de infecção. Este trabalho também evidencia que a virulência é, aparentemente, uma característica intrínseca da amostra e não se correlacionou com o volume do inóculo. (SCHLEMPER Jr. e cols., 1983) (33).

Estudos relacionando virulência e mortalidade são muito difíceis de serem feitos em humanos porque isto demandaria um bom conhecimento do curso agudo de infecção bem como seguimento cuidadoso e prolongado na fase crônica.

Um estudo comparativo das diferentes amostras de *T. cruzi* mostram que quando vários parâmetros são considerados juntos, as várias amostras podem ser caracterizadas em uns poucos tipos ou padrões.

Neste estudo baseado nas evoluções da infecção, no período pré-patente, curva parasitêmica, morfologia do parasita no sangue periférico, tropismo tecidual, lesões histopatológicas e taxa de mortalidade em relação à infecção em camundongos "Swiss", pode-se dividir as cepas do *T. cruzi* em três Tipos caracterizados como se segue: ANDRADE, 1974) (4).

TIPO I – amostras com rápida taxa de multiplicação, parasitemia e mortalidade máximas de 7-12 dias de infecção, predomínio de formas delgadas e macrofagotropismo na fase aguda.

PROTÓTIPOS: Y e peruana;

TIPO II – amostras com, relativamente, baixa multiplicação, picos irregulares de parasitemia de 12-20 dias de infecção, quando a taxa de mortalidade alcança o máximo predomínio de formas

largas e envolvimento preferencial do miocárdio.

**PROTÓTIPOS:** amostra 12 SF (São Felipe-Bahia);

**TIPO III** – lenta multiplicação, com picos parasitemicos altos e tardios (20-30 dias após a infecção), baixa taxa de mortalidade e predomínio de formas largas e miotropismo com envolvimento predominante do músculo esquelético.

**PROTÓTIPOS:** amostra Colombiana.

A presença de um mesmo padrão de cepas de *T. cruzi* em uma mesma região geográfica pode ser de importância na explicação da ocorrência de determinados quadros clínico-patológicos da Doença de Chagas peculiares a determinadas áreas geográficas.

## 1.2 – Caracterização Antigênica

Um dos aspectos que parece de grande importância na separação de Tipos de cepas de *T. cruzi* é essencial para os estudos do desenvolvimento de vacina e possível correlação entre composição antigênica e variação clínico-epidemiológica da Doença de Chagas nas diferentes regiões geográficas. Entretanto, a complexidade da vida do parasita concorre para aumentar a possibilidade de heterogeneidade antigênica. (ANDRADE, 1985) (8).

Tem sido discutido por vários autores, similaridades e diferenças na composição antigênica das várias formas de desenvolvimento do *T. cruzi* e isto deve ser levado em consideração ao se estudar a variação antigênica intra-específica. (BRENER, 1979) (13).

A heterogeneidade antigênica foi demonstrada ao separarem epimastigotas de diferentes amostras de *T. cruzi* provenientes de humanos, vetores e reservatórios naturalmente infectados em três tipos imunológicos (A, B e C) correspondendo aos achados clínicos e epidemiológicos, usando testes de aglutinação, imunodifusão e hemoaglutinação. (NUSSENZWEIG e cols., 1963(30) e NUSSENZWEIG e cols., 1966(31))

O uso de recentes métodos de análise antigênica confirmaram a existência de população antigênicamente heterogênea. Análise da membrana celular de epimastigotas do *T. cruzi* de três cepas diferentes (Y, CL e MR) marcada com radioiodo permitiu identificar clara diversidade na distribuição nas faixas de eletroforese em gel SDS – Page. (ARAÚJO e cols., 1981) (10).

Usando aglutinação com soro homólogo e heterólogo, algumas amostras de *T. cruzi* foram agrupadas em três tipos: a) aquelas cujos parasitas foram marcadamente aglutinados e lisados com anti-soros homólogo e heterólogo (Y e B); b) aqueles com tripomastigotas que não foram aglutinados (CL e T); c) parcialmente aglutinados (FL). (KRETTLI e cols., 1976) (22). As cepas Y e Brasil mostraram-se antigênicamente diferentes ao teste imunofluorescência usando os antígenos das formas epimastigotas e tripomastigotas. (KLOETZEL e cols., 1976) (21).

Os protótipos dos três tipos de *T. cruzi* descritos por ANDRADE (1974) (4) ao serem examinadas por imuno-eletroforese contra imunossoro homólogo e heterólogo obtido de coelhos revelaram-se clara-

mente diferentes nos padrões eletroforéticos. Os resultados sugerem que além de antígenos com secções cruzadas entre os Tipos, a amostra Colombiana apresentou determinantes antigênicos próprios. (ANDRADE e cols., 1981) (7).

Os resultados dos diferentes grupos de pesquisa indicam que: a) existe heterogeneidade intra-específica, que pode ser demonstrada tanto em isolados de origem conhecida como populações clonadas; b) esta heterogeneidade incluiu os parasitas obtidos de pacientes, hospedeiros mamíferos e vetores; c) tem-se mostrado com epimastigotas e tripomastigotas. (SEGURA e cols., 1985) (32)).

As possibilidades de estudo da heterogeneidade antigênica intra-específica do *T. cruzi* têm sido consideravelmente ampliadas após a introdução de anticorpos monoclonais. (BRENER, 1985) (14); (SEGURA e cols., 1985) (32)).

Resultados preliminares demonstraram boa correlação entre grupos taxonômicos definidos por padrão eletroforético de isoenzimas (Z1, Z2 e Z3) e aqueles definidos por reação com anticorpos monoclonais. Com base na análise auto-radio-gráfica de treze anticorpos monoclonais preparados contra três populações clonadas de *T. cruzi*. Sugere-se neste estudo que os anticorpos monoclonais poderiam discriminar Zimodemas Z1 e Z2 do *T. cruzi* e que os anticorpos Zimodema específicos poderiam ter grande aplicação na classificação das amostras para estudos epidemiológicos de Doença de Chagas. (FLINT e cols., 1984) (18).

## 1.3 – Caracterização Bioquímica

### 1.3.1 – Ligação às Lectinas

Os oligossacárides presentes na superfície das células desempenham papel relevante na relação da célula com o ambiente e estes sacárides podem se constituir num meio valioso para caracterização das amostras do parasita. Poderia ser interessante se descobrir se certo padrão de sacáride pode se correlacionar com o comportamento biológico particular de uma dada amostra. Por meio de lectinas alguns oligossacárides têm sido detectados. (CAPPA e cols., 1985) (15).

Em 1974, com a intenção de achar um marcador de estágio do *T. cruzi*, pela primeira vez foi usado este método. Usando epimastigotas de amostra Y, eles determinaram que havia pronta aglutinação com baixa concentração de Concanavalina A (con-A) enquanto a aglutinação não ocorre mesmo com altas concentrações com tripomastigotas sanguíneos. (ALVES e cols., 1974)(1). Em 1978 Chiari e cols. 1978 (in CAPPA e cols., 1985) (15) usaram pela primeira vez o critério de aglutinabilidade das lectinas para comparar várias amostras de *T. cruzi*. Usando concanavalina-A e formas epimastigotas e tripomastigotas de cultura celular em camundongo infectado, dois isolados de doentes em fase aguda (Y e Gilmar) e dois de *Triatoma infestans* naturalmente infectados (CL e FL), os resultados foram positivos, mesmo para baixas concentrações de concanavalina A (Con-A).

Desde então vários estudos têm avançado no uso da capacidade de ligação das lectinas ao parasita, distinguir *T. cruzi*

de formas similares ao *T. cruzi* e de outros tripanosomatídeos, bem como determinar a presença de certos sacarídeos na superfície do parasita facilitando a caracterização do estágio e da amostra do parasita. Infelizmente, as discrepâncias na literatura indicam que as limitações das técnicas de aglutinação e fluorescência deve-se a, respectivamente, à baixa sensibilidade do método e ao erro da visão humana. Neste sentido, o uso da técnica de lectinas ligadas a material radioativo poderia ser de mais utilidade na avaliação da caracterização das amostras de *T. cruzi* através de lectinas, de vez que, até o momento, existe correlação entre amostras clonadas e lectinas. (CAPPA e cols. 1985) (15).

### 1.3.2 — Padrão Isoenzimático:

A técnica de eletroforese de enzimas tem sido largamente usada para caracterização do *T. cruzi*. Consiste em técnica muito simples e que se desenvolve sob condições controladas, as diferenças entre perfis de isoenzimas implica em diferenças genéticas entre as populações do organismo testado. A ausência de diferenças implica em relação íntima entre as amostras.

O número de isoenzimas usado é limitado apenas por fatores de ordem técnica na execução dos procedimentos de coloração. A maioria dos trabalhos em caracterização isoenzimática do *T. cruzi* tem se baseado em número muito restrito de enzimas. (MILES, 1985) (28).

A possibilidade de que a amostra possa ser mistura de amostras ou de diferentes gêneros e espécies deve ser consi-

derada para evitar confusão nos resultados.

Por análise intuitiva, comparando as faixas das enzimas na eletroforese, normalmente as amostras são separadas em grupos homogêneos e a separação delas é feita ao se estabelecer o número de enzimas que as distingue. Se muitas enzimas separam grupos de organismos, eles são considerados, radicalmente, diferentes, (MILES, 1985) (28).

Os seguintes objetivos são obtidos pela coleção e análise dos dados de isoenzimas: (1) a definição de extensão da heterogeneidade dentro de populações do *T. cruzi* a nível de distribuição geográfica; das variantes genéticas para ciclo de transmissão particular; da heterogeneidade genética dentro de um hospedeiro mamífero ou vetor pela análise das alterações regulatórias na expressão genética nas diferentes formas do *T. cruzi* ou sob diferentes condições ambientais; (2) determinar se o organismo é sexuado ou assexuado, de espécies politípicas únicas ou espécies complexas; e (3) determinar se genótipos radicalmente não similares são associados com diferentes formas de doença no homem e com resistência aos quimioterápicos. (MILES, 1985) (28).

Até o presente momento a análise das isoenzimas tem trazido alguns esclarecimentos em epidemiologia da infecção pelo *T. cruzi*.

Os dados de isoenzimas são disponíveis na América Central (KREUTZER e cols., 1981) (23) e América do Sul, inclusive o Brasil (ANDRADE e cols., 1983) (9); MILES, 1983 (26); TYBAYRENC e cols., 1983(34).

Os três principais zimodemas (Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub> e Z<sub>3</sub>) parece incluir a grande variação dentro do taxon conhecido como *T. cruzi*. (BARRET e cols., 1980) (11).

Parece haver relações entre zimodema e tipo de ciclo de transmissão. O zimodema Z<sub>1</sub> está relacionado no Chile e Brasil, com ciclo silvestre (MILES, 1983) (26); MILES e cols., 1984 (27). Os três zimodemas podem infectar o homem, mas até agora, raramente o Tipo Z<sub>3</sub> causa doença aguda (MILES, 1985) (28).

Características isoenzimáticas são particularmente diversas entre áreas centradas e sul da América do Sul, onde padrões "heterozigous" são comuns. Este padrão sugere que o *T. cruzi* é diplóide, mas não há ainda evidências de troca de gens entre os zimodemas (MILES e cols., 1984) (27).

Atualmente, estuda-se o padrão de isoenzimas em conjunto com outros parâmetros a fim de se comparar as características isoenzimáticas e reação com anticorpos monoclonais (MILES, 1985) (28). Existe uma inquestionável associação entre a expressão de um determinante antigênico imunodominante, glicoproteína de PM 72.000 e zimodema Z<sub>1</sub>. (CHAPMAN e cols., 1984) (16).

Estudos complexos e em colaboração são necessários para resolver o problemático estudo genético do *T. cruzi*. Além disso, é necessário padronizar os termos e definições para se ter a mesma linguagem entre os que trabalham no assunto.

### 1.3.3 — Análise de esquizodema

Esta técnica foi introduzida em 1980 por Morel e cols. com o intento de

caracterizar os tripanosomatídeos hemoflagelados a nível genético. (MOREL e cols., 1980) (29). Baseia-se na digestão do kDNA por enzimas (endonucleases de restrição) e comparação eletroforética dos fragmentos resultantes. Estes são marcadores bioquímicos que permitem a classificação dos kinetoplastídeos em esquizodema — grupo de parasitas com similares padrões de restrição do seu kDNA.

A complexidade dos padrões eletroforéticos torna esta técnica muito discriminatória e capaz de detectar diferenças evolutivas mínimas não prontamente observadas em outras técnicas. Por isso, a possibilidade de dois organismos distintos apresentarem esquizodemas idênticos por convergência evolutiva é praticamente inexistente (GONÇALVES e cols. 1985) (19).

Após estudar mais de 500 amostras de *T. cruzi* de várias áreas da América Latina, é biologicamente significativa a complexidade natural de populações deste parasita e cuidadosa análise de esquizodema pode gerar informações úteis (GONÇALVES e cols., 1985) (19).

Amostras de três tipos biológicos foram submetidas à análise de esquizodema no Instituto Oswaldo Cruz por MOREL & GONÇALVES (in ANDRADE, 1985) (8) e os resultados mostraram que: 1) todas as amostras diferiram no perfil do kDNA; 2) amostras de mesmo Tipo biológico parecem ter fragmentos de macrociclos similares.

Desde a introdução da técnica (MOREL e cols. 1980) (29) a análise das amostras de *T. cruzi* tem permitido concluir que o método é estável no propósito

### QUADRO I: Caracteres usados no momento para classificação e identificação do *T. cruzi*

#### 1. CARACTERES BIOLÓGICOS

- Morfologia dos Tripomastigotas no sangue periférico
- Curva de Parasitemia
- Infectividade para células das formas sangüíneas
- Características da infecção "in vitro".
- Suscetibilidade das formas sangüíneas a soro imune.
- Virulência e mortalidade
- Sensibilidade a drogas.

#### 2. CARACTERES ANTIGÊNICOS

#### 3. CARACTERES BIOQUÍMICOS

- Ligação às Lectinas
- Padrão isoenzimático
- Análise de esquizodema
- DNA "probes"

de tipagem de amostra (GONÇALVES e cols., 1985 (19) diferentemente do que havia pensado anteriormente.

O poder discriminatório da análise de esquizodema permite que seja usada para detectar contaminação das amostras, fato passível de ocorrer em laboratório (DEANE e cols., 1974 (17).

Ainda que a quantidade de perfis de restrição seja grande, a técnica é promissora e pode ser usada para identificar um dado clone ou amostra em grupos que possam ter significados biológico, clínico, diagnóstico e epidemiológico.

#### 2 – COMENTÁRIOS

Desde que a existência de variação intra-espécie do *T. cruzi* foi reconhecida, os pesquisadores, insistentemente, têm procurado desvendar este intrigante fenômeno e sua repercussão nos aspectos clínico, diagnóstico e epidemiológico da Doença de Chagas nas áreas endêmicas.

A par de um volume de dados sobre o comportamento biológico do parasita, recentes avanços na Bioquímica e Imunologia têm trazido imensa contribuição para caracterização das amostras isoladas a nível molecular, de modo que a taxo-

nomia e classificação do *T. cruzi* têm sido, recentemente, revistas.

A primeira conclusão é que se faz necessária uma padronização de técnicas e nomenclaturas entre os estudiosos do assunto. Até o presente, os termos "amostras", "isolado", "cepa" são confusos e são usados para denominar populações de parasitas isolados de uma fonte conhecida e estudada em laboratório.

Várias técnicas para estudo imunológico e bioquímico da superfície do parasita têm sido desenvolvidas na última década e estas técnicas têm permitido precisar melhor e com mais sensibilidade a heterogeneidade antigênica intra-específica do *T. cruzi*.

Este polimorfismo demonstrado por análise de isoenzimas e esquizodemas reflete a natureza altamente heterogênea das amostras do parasita a nível genético.

Da experiência acumulada no assunto e reportada aqui, deduz-se que somente um estudo multidisciplinar, tanto no aspecto biológico quanto antigênico e bioquímico do parasita poderá clarear as correlações entre amostras-Tipo e dados clínico-epidemiológicos.

De acordo com as amostras, enquanto o padrão de esquizodema é útil para detectar diferenças mínimas entre as populações estudadas, a hibridização do kDNA, aparentemente, é mais adequada para agrupar parasitas similares apesar das variações nas seqüências dos minicírculos (DNA "probes") (BRENER 1985).

Algumas evidências de correlação existem entre os vários métodos, detectados por alguns pesquisadores. Os Tipos

morfológicos de ANDRADE, 1974(4) correlacionaram-se com os esquizodemas de MILES e cols., 1980 (25). Os grupos taxonômicos definidos por isoenzimas Z(1), Z(2), Z(3) e Z(4) e aqueles definidos por anticorpos monoclonais (FLINT e cols., 1984) (18) também se correlacionaram.

Em relação às lectinas, ainda não está clara se existe correlação entre a amostra e um possível padrão de aglutinação dos açúcares de superfície (CAPPA e cols., 1985) (15).

No momento, os estudiosos do assunto chamam a atenção para a necessidade de mais pesquisas, principalmente, a nível molecular, pois este é o caminho principal para resolver o problema da classificação e taxonomia do *T. cruzi* e que se encontra em fase inicial de pesquisa.

Pesquisa básica no genoma do *T. cruzi* por novos métodos de eletroforese e usando tecnologia do DNA recombinante facilitará o mapeamento genético das amostras do *T. cruzi*, bem como agilizará as tentativas de correlação entre os cariótipos moleculares e outros métodos de caracterização (GIBSON e cols., in preparação in MILES, 1985) (28).

#### SUMMARY

#### Notes about taxonomy and classification of *Trypanosoma Cruzii*

After the intraspecific variation of *T. cruzi* has been recognized several authors tried to show its correlation with epidemiology, diagnoses and clinical

forms of Chagas' disease in endemic areas

Recent advances in the field of Biochemistry and Immunology brought a great contribution for the characterization of isolated stocks of *T. cruzi* and only a multidisciplinary study of biological, antigenic and biochemical behaviour of the parasite would make it possible to solve taxonomic and classification problems of *T. cruzi* and their clinical-epidemiological implications in Chagas' disease.

Since the discovery of the disease by C. Chagas several authors tried to obtain criteria for differentiate the parasite as the morphological and biological criteria, isoenzymic patterns and kDNA characterization.

Some conclusions from this studies have been done: 1 – A particular strain type may predominate in a particular geographical area; 2 – Strains of different types show different antigenic composition; 3 – There is a correlation between drug sensibility and Strain type; 4 – Strains of the same type have similar isoenzymic patterns; 5 – the differences in the strain types are more important in determining the course of infection than the genetic background of the host.

In relation with the antigenic composition results indicate that: 1 – There is intraspecific heterogeneity in original sample and in cloned populations; 2 – This heterogeneity includes parasite obtained from patients, mammals and vectors; 3 – It happens with epimastigotes and trypomastigotes.

The molecular analysis of components and metabolic products of parasite

as lectin binding, isoenzyme patterns and schizodeme analysis have had a great improvement in the last decade. Even with technical limitations, it can be concluded from this studies that: 1 – There seems to be correlation between zymodeme and epidemiological type of cycle; 2 – A correlation between cloned sample and lectins have been shown; 3 – All there zymodemes (Z1, Z2 e Z3) can infected human beings and cause acute disease, but it is unfrequent with Z3; 4 – Heterozygous patterns are common in South America suggesting that *T. cruzi* may be diploid. There is no evidence of gene interchange between zymodemes; 5 – There is a clear association between the expression of a surface glycoprotein (GP 72000 kd) and Z1.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 – ALVES, M. J. & COLLI, W. – Agglutination of *Trypanosoma cruzi* by Concanavalin A. J. protozool., 21: 575-578, 1974.
- 02 – ANDRADE, S. G.; CARVALHO, M. L.; FIGUEIRA, R. M. – Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. Gazeta Médica Bahia, 70: 32-42, 1970.
- 03 – ANDRADE, S.G.; FIGUEIRA, R.M.; CARVALHO, M.L.; GORINI, D.F. – Influência da cepa do *Trypanosoma cruzi* na resposta terapêutica pelo Bay 2502 (resultados de tratamento a longo prazo). Rev. Instituto de Medicina Tropical, São Paulo, 15: 421-430, 1973.
- 04 – ANDRADE, S.G. – Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isolados no

- Recôncavo Baiano. Rev. Patologia Tropical, 3: 65-121, 1974.
- 05 – ANDRADE, S. G. – Tentative for grouping different *Trypanosoma cruzi* strain in some types. Rev. Inst. Med. Tropical, São Paulo, 18: 140-141, 1976.
- 06 – ANDRADE, S. G. & FIGUEIRA, R. M. – Estudo experimental sobre ação terapêutica da droga Ro 7-1051 na infecção por diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo, 19: 335-341, 1977.
- 07 – ANDRADE, S.G.; ANDRADE, V.; ROCHA FILHO, F.D.; BARRAL NETO, M. – Análise antigênica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo, 23: 245-250, 1981.
- 08 – ANDRADE, S. G. – Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 18: 39-46, 1985. Suplemento.
- 09 – ANDRADE, V.; BRODSKYN, C.; ANDRADE, S. G. – Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 77: 796-799, 1983.
- 10 – ARAÚJO, F. G. & REMINGTON, J. S. – Characterization of stages and strains of *Trypanosoma cruzi* by analysis of cell membrane components. J. Immunol., 127: 855-859, 1981.
- 11 – BARRET, T. V.; HOFF, R. H.; MOTT, K. E.; MILES, M. A.; GODFREY, D. G.; TEIXEIRA, R.; SOUZA, J.A.A.; SHERLOCK, I. A. – A Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodeme in Bahia State, Brazil. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 74: 84-90, 1980.
- 12 – BRENER, Z. – Intraspecific variations in *Trypanosoma cruzi*: Two Types of parasite populations presenting distinct characteristic. In: Scientific Publication n. 347. Chagas Livrare, PAMO, 11-21, 1977.
- 13 – BRENER, Z. – O parasito: relações hospedeiro-parasita. In: BRENER, Z. & ANDRADE, Z. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 1979. p. 1-41.
- 14 – BRENER, Z. – General review on *Trypanosoma cruzi* classification and Taxonomy. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 18: 1-8, 1985. Suplemento.
- 15 – CAPPA, S. M. G.; KATZIN, A. M. – *Trypanosoma cruzi* – Lectin interaction: analysis. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 18: 61-65, 1985. Suplemento.
- 16 – CHAPMAN, M. D.; SNARDY, D.; MILES, M. A. – Quantitative difference in the expression of a 72.000 molecular weight cell surface glycoprotein (GP 72) in *Trypanosoma cruzi* zymodemes. J. Immunol., 132: 3149-3153, 1984.
- 17 – DEANE, M. P.; KLOETZEL, J. – Lack protection against *Trypanosoma cruzi* by multiple doses of *T. lewisi* culture forms A discussion on some strains of *T. lewisi*. Exp. Parasitol., 35: 406-410, 1974.
- 18 – FLINT, J. E.; SCHECHTER, M.; CHAPMAN, M. D.; MILES, M. A. – Zymodeme and species specificities of monoclonal antibodies raised against *Trypanosoma cruzi*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 78: 193-202, 1984.
- 19 – GONÇALVES, A.M.; NEHME, N.S.; MOREL, C. – Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 18: 67-73, 1985. Suplemento.

- 20 - HOARE, C.A. & WALLACE, F. G. - Developmental stages of Trypanosomatid flagellates: a new terminology. Nature (London) 212: 1385-1389, 1966.
- 21 - KLOETZEL, J. & CAMARGO, M. - Immunological typing of *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo, 18: 142-145, 1976.
- 22 - KRETTLY, A. V.; BRENER, Z. - Antigenic variation in bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* from different strain. Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo, 18: 134-135, 1976.
- 23 - KREUTZER, R. D.; SOUSA, O. E. - Biochemical characterization of *Trypanosoma spp* by isozyme eletrophoresis. Am J. Tropical, Hyg., 30: 308-317, 1981.
- 24 - LUMSDEN, W. H. R. - Biological aspects of Trypanosomiasis research, 1965; a retrospect 1969. Adv. Parasitol., 8: 228-249.
- 25 - MILES, M. A.; LANHAM, S. M.; SOUZA, A.A.; POUPA, M. - Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi*. Trans. Roy Soc. Trop. Med. Hyg., 74: 221-223, 1980.
- 26 - MILES, M. A. - The epidemiology of South American Trypanosomiasis - biochemical and imunological approaches and their relevance to control. Trou. Roy Soc. Trop. Med. Hyg., 77: 5-23, 1983.
- 27 - MILES, M. A.; APT, W.B.; WIDMER, C.; POVOA, M.; SCHOFIELD, C. J. - Isozyme heterogeneity and numerical taxonomy of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chile. Trans. Roy Soc. Trop. Med. Hyg., 78: 526-535, 1984.
- 28 - MILES, M. A. - Isozyme characterizations Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 18: 53-59, 1985. Suplemento.
- 29 - MOREL, C. & SIMPSON, L. - Characterization of pathogenic trypanosomatidae by restriction endonuclease finger-printing of kinetoplast DNA minicircles. Am. J. Trop. Hyg., 29: 1070-1074, 1980. Suplemento.
- 30 - NUSSENZWEIG, V.; DEANE, L.M.; KLOETZEL, J. - Differences in antigenic constitution of strain of *Trypanosoma cruzi* Exp. Parasitol., 14: 221-227, 1963.
- 31 - NUSSENZWEIG, V. & GOBLE, F. C. - Further studies on the antigenic constitution of strain of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. Exp. Parasitol., 18: 224-228, 1966.
- 32 - SEGURA, E.L.; CAZZULO, J. J. - Antigenic Characterization of *Trypanosoma cruzi*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 18: 47-51, 1985. Suplemento.
- 33 - SCHELEMPER Jr, B.R.; ÁVILA, C. M.; COURA, J.R.; BRENER, Z. - Course of infection and histopathological lesions im mice infected with seventeen *T. cruzi* strains isolated from chronic patients. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 16: 23-30, 1983.
- 34 - TYBAYRENC, M.; MILES, M.A. - A genetic comparison between Brazilian and Bolivian Zymodemes of *Trypanosoma cruzi*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 77: 76-83, 1983.