

ESTUDO DA INTERAÇÃO *T. hastatus* — MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS E TENTATIVA DE INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS PELAS VÁRIAS FORMAS EVOLUTIVAS DO PARASITA

Ana Cândido Czerewuta *, Osvaldira Seabra de Oliveira ** e William Barbosa **

RESUMO:

A tentativa de infecção de macrófagos do peritônio de camundongos "in vitro", aderidos em lâmina, deu resultado negativo, bem como a tentativa de infecção em macrófagos não aderentes em tubos capilares.

Houve interação "in vitro" entre a forma tripomastigota de cultivo e macrófagos de camundongos, com infecção de 50% de macrófagos em que se verificou discreta reprodução no máximo, 4 amastigotas por macrófagos e muitas células degeneradas.

As formas não invasivas amastigotas infectaram apenas 10% dos macrófagos não havendo reprodução evidente. O número de células e o número de parasitas diminuíram com o tempo de cultura.

A tentativa de infectar camundongos com formas tripomastigotas, amastigotas de cultura ou com macrófagos infectados com elas, não obteve êxito.

UNITERMOS: *Trypanosoma hastatus*, desenvolvimento em macrófagos de camundongos. Tentativa de infecção.

INTRODUÇÃO

A infecção de animais de laboratório pelo *Trypanosoma hastatus*, não se dá, sendo esta uma das mais importantes características do parasita. A única refe-

rência de literatura é a de DIAS, que após uma centena de tentativas consecutivas, obteve uma infecção de um camundongo, transitória e fugaz.

Em trabalhos que realizamos anteriormente, desde 1979, até agora, em re-

* Profas. Assistentes do Depto. de Medicina Tropical do IPTESP. Pesquisadoras da Unidade de Investigação Gaspar Viana.

** Prof. Titular do Depto. de Medicina Tropical do IPTESP. Responsável pela Unidade de Investigação Gaspar Viana.

petidas e consecutivas tentativas, praticamente, para todos os animais de laboratório, como hamsters, cobaias, ratos, camundongos, macacos, cães, gatos e mesmo quirópteros, jamais conseguimos uma infecção do *T. hastatus*. Apenas em triatomíneos, em xenos artificiais, aparecem as formas evolutivas do tripanosoma.

Mesmo tentativas realizadas com animais depletados imunologicamente pelo uso de corticosteróides, mostarda nitrogenada (Imuran) ou a radioterapia (cobalto) não obtivemos reprodução do parasita.

O uso do tumor TG 180 em camundongos não permitiu a disseminação do parasita, que permaneceu durante algum tempo, apenas se multiplicando em suas células no peritônio do camundongo; ao contrário do *T. cruzi* que se disseminou, intensamente, com aparecimento de formas evolutivas na musculatura cardíaca do camundongo observado até pela impressão do órgão.

Como em sua cultura normal o *T. hastatus* produz elevado percentual de epimastigotas, e o xeno artificial seja trabalhoso e moroso, oferecendo ao final poucas formas metacíclicas, desenvolvemos estudo sobre a obtenção de formas tripomastigotas em culturas sem células com a finalidade de verificar a potencialidade das formas tripomastigotas de cultura de infectar animais de laboratório — o que ocorre com avidez com as cepas patogênicas do *T. cruzi* com elevados índices de infecção. Experimentamos infectar camundongos “imbread” e “outbread”.

Além disso pela razão de haver trabalhos sugestivos de que a resultante “in vitro” da interação parasita macrófago traduziria a patogenicidade das cepas do parasita, principalmente, hemoflagelatos e pela circunstância particular de pretender

comparar o *T. hastatus* ao *T. cruzi* e haver trabalhos muito criteriosos que além de comparar a cepa de *T. cruzi*, patogênica com a cepa F (MILDER e cols., 1977, MILDER e KLOTZEL, 1980), averigua o comportamento particular da cepa Y; resolvemos também analisar o desenvolvimento do *Trypanosoma hastatus* em macrófagos de camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

PARASITAS: Empregamos uma cepa de *T. hastatus* isolada do *P. hastatus hastatus* da Caverna de Fercal, DF., em 1973 e mantida em meio LIT, por repiques quinzenais, desde 1975, dois anos após seu isolamento e recentemente colocados em meios adequados à sua diferenciação.

1a. AMOSTRA: *T. hastatus* no 10o. dia de crescimento em meio RQ + Soro de galinha 10% contendo 8×10^6 cel/ml. A população se constituía exclusivamente de células amastigotas.

2a. AMOSTRA: *T. hastatus* no 10o. dia de crescimento em meio RQ + Soro de pato 20% + Cloridrato de tetraciclina 0,96mg/ml contendo 7×10^6 cel/ml, 85% de tripomastigotas e 5% de amastigotas, alguns epimastigotas e formas indiferenciadas.

3a. AMOSTRA: *T. hastatus* crescendo em meio LIT, a 28°C por 10 dias, 0,5ml de 8×10^5 , constituído praticamente de epimastigotas.

MACRÓFAGOS: Foram obtidos do peritônio de camundongos Swiss “outbread”, que após anestesiados, foram sangradas por decaptação (para evitar “contaminação” por sangue, dos macrófagos). Injetou-se então 6ml de RPMI + Soro fetal bovino a 20% e 100µ de penicili-

na/ na cavidade peritoneal, após ligeira massagem por 3 minutos retira-se o líquido peritoneal, contendo cerca de 2×10^6 cel/ml, contada em câmara de Neubauer.

EXPERIMENTO A: Verificação da potencialidade de formas do *T. hastatus* infectar os macrófagos “in vivo”.

Seis camundongos Swiss estimulados com injeção de 1ml de tioglicolato por via intraperitoneal, 2 dias seqüencialmente, foram inoculados no 3o. dia, pela mesma via, com 0,5ml de formas epimastigotas de cultivo em LIT a 28°C, 6×10^5 foi retirado o líquido peritoneal e examinado na segunda, quarta e sexta hora de 3 camundongos e examinados um de cada grupo de três, na segunda, quarta e sexta hora.

EXPERIMENTO B: Verificação da potencialidade de formas do *T. hastatus* infectarem os macrófagos “in vitro”.

EXPERIMENTO 1: Observações em tubos capilares. Uma mistura de líquido peritoneal, contendo 2×10^5 macrófagos, 8×10^5 epimastigotas cultivados em LIT, lavados em RPMI e diluídos em RPMI + Soro fetal bovino 20% foi distribuído em vários tubos capilares de vidro siliconizados, após “laqueados”, foram incubados a 35°C e à temperatura ambiente, e observados ao microscópio após, 1, 3, 5, 8, 12, 24, 48, 72 e 98 horas, depois de fixados em lâminas, corados pelo Giemsa e azultripan (diluído 1/10 da solução mãe). No exame de 72 horas, foram também reinoculados em LIT a 28°C.

EXPERIMENTO 2: Realizado com macrófagos aderidos a lamínulas.

Macrófagos recolhidos do peritônio de camundongos, ajustado para 2×10^6 em ml de meio RPMI + 20% de S.F.B., foram

colocados em tubo chato siliconizado contendo uma lamínula, em seguida, inoculou-se uma alíquota de 1ml 8×10^6 *T. hastatus* cultivados por 10 dias em RQ + Soro de pato 20% + cloridrato de tetraciclina 0,96mg/ml contendo 85% de tripomastigotas, alguns amastigotas e poucos epimastigotas. (Fig. 1). O tubo foi incubado em câmara de CO₂ a 35°C, úmida (dissecador).

A leitura da lamínula foi realizada 24 horas depois, após lavada, fixada e corada pelo Giemsa. Muitos cultivos foram lidos até 96 horas. Por contagem de 100 células se determinou o índice de infecção.

Esta mesma experiência foi repetida com inóculo de *T. hastatus* crescido em meio RQ mais soro de galinha, contendo 95% de amastigotas em 24 horas.

EXPERIMENTO 3 — A: Dez camundongos Swiss “outbread” foram inoculados por vias subcutâneas, intraperitoneal e/ou intracardíaca, ao acaso, com as formas tripo e amastigotas de cultura e com macrófagos infectados por *T. hastatus*.

B): Dez camundongos CH3 “imbread” foram inoculados por vias subcutâneas, intraperitoneal e/ou intracardíaca, ao acaso, com formas tripo e amastigotas de cultura e com macrófagos infectados.

O acompanhamento foi seguido pelo exame direto, por dez dias, de sangue da cauda, procurando o parasita e através de necrópsia de dez dias em diante, até trinta dias.

C: Foram inoculados dez camundongos adultos com peso de 15 a 25g e dez camundongos recém-nascidos, de ambos os sexos, com 5×10^6 e 3×10^6 , respectivamente, formas amastigotas por ml de *T. hastatus* crescendo em meio 199 +

Extrato de Barbeiro com inóculo de 0,6 ml para cada camundongo.

Também foram inoculados dez camundongos adultos e dez recém-nascidos com *T. hastatus* em cultura de 199 + SFB com vinte dias, cerca de 45% de tripomastigotas. Cada camundongo recebeu 0,6ml do inóculo com 8×10^6 formas tripomastigotas.

RESULTADOS:

EXPERIMENTO 1: Macrófago "in vivo".

A leitura de duas horas do líquido peritoneal de ambos os camundongos mostraram presença de alguns epimastigotas livres e macrófagos não parasitados. Com quatro horas, havia diminuição do número de epimastigotas e macrófagos não parasitados. Com seis horas, não foram vistos epimastigotas no líquido peritoneal e nem macrófagos parasitados.

Quando o *T. hastatus* foi inoculado intraperitonealmente em camundongos observou-se que o líquido retirado da cavidade peritoneal a intervalos regulares, apresentava uma crescente diminuição dos parasitas, que não são vistos, mesmo quando o líquido é colocado para adesão em lamínulas no tubo, em cultura a 35°C.

EXPERIMENTO 1: Macrófagos em tubos capilares "in vitro".

O exame do cultivo foi feito na primeira e terceira hora, foi praticamente o mesmo, verificamos amastigotas e esferomastigotas envolvendo os macrófagos e raros epimastigotas livres. Na quinta hora, a maioria era de amastigota em volta dos macrófagos e os epimastigotas alongados com flagelo curto, arredondados com di-

visão do núcleo e cinetoplasto; em todos os demais apareciam formas degeneradas.

Na oitava hora, mesmo aspecto anterior, com divisão nuclear dos amastigotas. Na décima segunda hora, divisão de amastigotas.

Na vigésima quarta e quadragésima oitava horas, amastigotas em divisão envolvendo os macrófagos que diminuem de número, 72 horas, idem, com poucos macrófagos. O material foi reinoculado em LIT fresco a 28°C, as formas amastigotas voltaram a epimastigota no terceiro dia de cultivo.

98 horas não se encontra macrófagos, só se observa amastigotas, coráveis pelo azul trypan.

EXPERIMENTO 2: Experimento de macrófagos aderidos em lamínulas.

A) Macrófagos postos a incubar em culturas onde havia 85% de tripomastigotas revelou após as primeiras 24 horas que alguns macrófagos estavam infectados com poucos amastigotas e a forma tripomastigotas estavam livres, aderidos ao macrófago, ou com a parte anterior dentro dele (sendo fagocitado). (FIGURAS 1 e 2).

A contagem de 100 macrófagos evidenciam que tinha interiorizado 1 amastigota, não havendo aparente multiplicação dentro do macrófago, como já observamos em *Leishmania* ou *T. cruzi*, e além disso estavam presentes formas degeneradas.

B) Os macrófagos postos a inocular com formas de amastigotas predominantes, cultivados em RQ + Soro de galinha estavam infectados na ordem 10 para cada 100 tendo interiorizado 1 ou 2 amastigotas. Com 48 e 72 horas o aspecto era mais ou menos idêntico não havendo

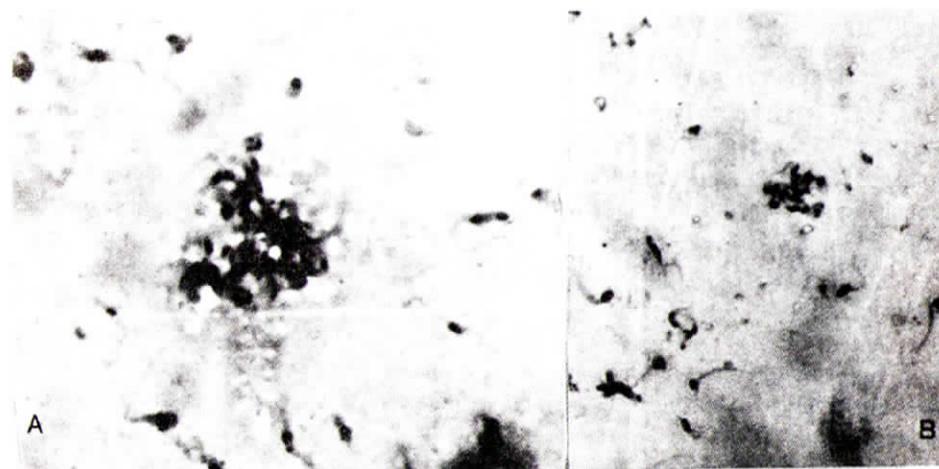


Fig. 1 - A e B - Formas de cultivo vendo-se amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas, estas culturas constituindo um "clump".



Fig. 2 - Visualização de macrófago com tripomastigotas penetrando-o.

multiplicação intensa ou diferenciação dos amastigotas e muitas formas degeneradas. (FIGURA 3 e TABELA 1).

EXPERIMENTO 3: Não houve infecção de camundongos com formas tripomastigotas ou amastigotas de culturas inoculados diretamente, nem pelo "macrófago" infectado por *T. hastatus*.

COMENTÁRIOS:

O estudo da inter-relação entre *T. cruzi* e macrófagos peritoneais de animais de laboratório "in vitro" já tem sido feito por muitos autores, seja com epimastigotas de cultura, amastigotas ou com tripomastigotas de sangue periférico de camundongos infectados (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 e 11) em microscopia ótica e ou eletrônica.

Tendo se observado que as cepas de *T. cruzi* virulentas penetram por fagocitose, com maior ou menor intensidade, sofrem ação do fagossoma por algumas horas, depois se libertam ganhando o citoplasma do macrófago, diferenciam-se e se multiplicam, até se liberarem no meio, enquanto cepas avirulentas como a F (6) tem a maioria dos seus parasitas destruídos em duas horas de infecção (4 e 6).

Tendo se observado que as cepas de *T. cruzi* virulentas penetram por fagocitose, com maior ou menor intensidade, sofrem ação do fagossoma por algumas horas, depois se libertam ganhando o citoplasma do macrófago, diferenciam-se e se multiplicam, até se liberarem no meio, enquanto cepas avirulentas como a F (6) tem a maioria dos seus parasitas destruídos em duas horas de infecção (4 e 6).

TABELA 1: *T. hastatus* – Infecção de macrófagos aderidos e não aderidos

EXPER.	RELAC. DE PARAS. P/ MACROF.	TEMPO INFECC/ HORA	MACRÓFAGOS NÃO ADERENTES		MACRÓFAGOS ADERENTES	
			% C. INFECC. P/MACR.	% CEL.	% C. INFECC. P/MACR.	% CEL.
1	4:1	1-3	0*	0	-	-
		5-8	0*	0	-	-
		12	0*	0	-	-
		24	0*	0	-	-
2a	4:1	24	-	-	40-50	1-1,5**
		48	-	-	40-50	1-2
		72	-	-	50-52	1-2
2b	4:1	24	-	-	8-10	1-2***
		48	-	-	8-10	1-2
		72	-	-	6-10	1-2

* - Em tubo capilar observou-se amastigotas dos macrófagos da 5a. até a 72a. horas, com divisão de amastigotas e evolução de epimastigota e subcultivo em LIT fresco a 28 graus Celcius, normal após 72 horas.

** - Ausência de multiplicação dentro do macrófago.

*** - Falta de multiplicação e diferenciação e muitas formas de generadas.

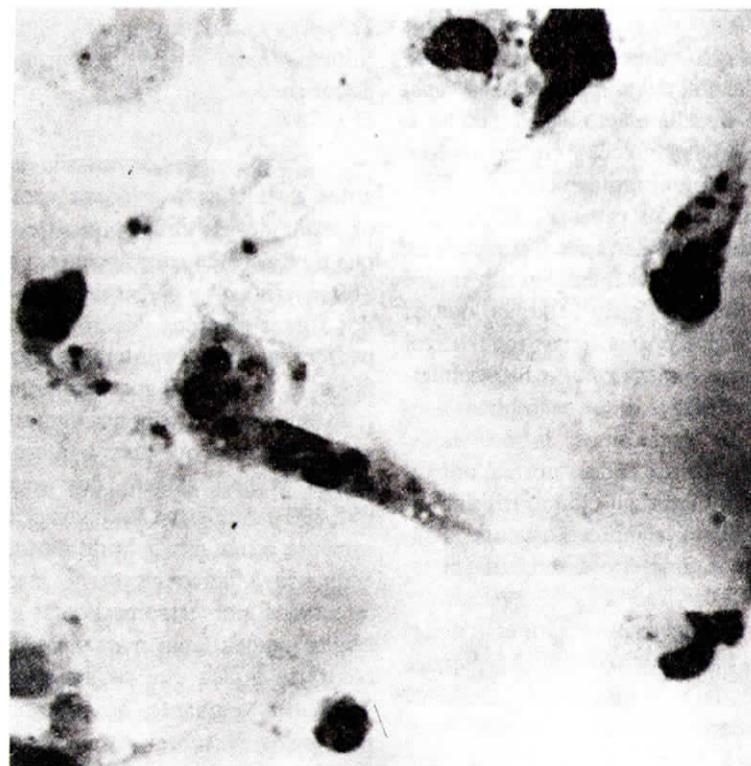


Fig. 3 – Macrófagos infectados com *T. hastatus*.

Ao que parece também, mesmo as cepas virulentas, podem ser mortas "in vitro" por macrófagos peritoneais de camundongos sensibilizados por *T. cruzi* ou BCG embora isto não signifique imunidade cruzada "in vivo" à infecção por esta mesma cepa (2).

Em um dos nossos experimentos usando macrófagos livres não aderidos verificamos evolução de formas epimastigotas para amastigotas quase total, na oitava hora, que circunscreveram e se fixaram à superfície dos macrófagos livres, sem adentrá-los, aparentemente. Embora se mantivessem viáveis e capazes de se reproduzirem, normalmente em LIT, por 72

horas eram coráveis pelo azul trypan até 96 horas; ao mesmo tempo pareciam lesivos para os macrófagos que foram destruídos rapidamente, as 72 horas, ainda que livres de parasitas em seu interior.

NACY e DIGGSS (1981) estudando a comparação de replicação de amastigotas de *Leishmania tropica* em macrófagos aderentes e não aderentes obtiveram melhores resultados em tubos de 12mmx 75mm com macrófagos não aderentes, havendo intensa replicação da leishmania dentro dos macrófagos. A falha de penetração dos nossos amastigotas nos macrófagos não tem explicação. MCCABE RE e cols. (1984) verificaram que amas-

tigotas obtidas de baço de camundongos infestados com diferentes cepas de *T. cruzi* foram examinados quanto à sua capacidade de invadir macrófagos e células L 929 para iniciar infecção em camundongos. Ambos foram rapidamente invadidos por organismos das cepas Y, MR e Tulahuen. Organismos de cepas CL, penetram ambos os tipos de células em um índice significativamente, mais baixo do que os organismos das outras cepas: todavia, todas as cepas multiplicam-se intracelularmente. Macrófagos ativados inibiram a replicação de organismos intracelulares. Tratamento do macrófago normal por Citochalasin B, Tripsina, Quimo-tripsina ou pronase inibem, significativamente, a fagocitose mas, o efeito inibitório foi reversível (3).

Camundongos infestados com amastigotas do baço desenvolvem parasitemias e morrem da infecção. Estes resultados demonstraram que amastigotas do baço são capazes de infectarem, sobreviverem e replicarem-se dentro dos fagócitos e de iniciarem infecção "in vivo". A interiorização de amastigotas de baço por fagocitose depende de um receptor sobre a superfície da célula do macrófago hospedeiro protease sensível.

VILLALTA e cols. (1984), examinando por microscopia eletrônica e cinética a inter-relação entre macrófagos do peritônio de camundongos com formas amastigotas de *T. cruzi* demonstraram que tão somente, 5 minutos após serem colocados em contato os amastigotas já foram vistos presos à superfície do macrófago e com 8 minutos dentro do macrófago, os amastigotas permaneceram dentro dos vacúolos fagocíticos. Sinais de lesão dos amastigotas apareceram após 4 horas com desintegração por volta de

12 horas do contato inicial. Similares resultados foram observados em monócitos do sangue humano (8).

Estes padrões de entrada de amastigotas e destruição estão de acordo com os resultados de ensaios quantitativos em que o número de amastigotas contidos em 200 macrófagos e percentagem de infectados foram medidos. Na comparação dos padrões mútuos da interação dos macrófagos de camundongos com amastigotas (não invasivos) e tripomastigotas (invasivos) mostraram que após a internalização ambas as percentagens dos amastigotas por 200 macrófagos declinavam dramaticamente acima de 72 horas de incubação enquanto a percentagem de macrófagos infectados por tripomastigotas por 200 células aumentaram marcadamente. Este contraste indica que os amastigotas são destruídos enquanto os tripomastigotas têm meios de sobreviverem transformando-se em amastigotas e multiplicando-se dentro do macrófago (8).

Os resultados obtidos nestes experimentos demonstraram que o *T. hastatus* é capaz de penetrar os macrófagos de peritônio de camundongo "in vitro", principalmente em sua forma ativa (tripomastigotas) na proporção de 40 a 50% se reproduzindo muito discretamente, e apresentando muitas células degeneradas, e na leitura de 24 horas em infecções por amastigotas apenas 10% de macrófagos se mostram infectados.

O *T. hastatus* se comporta em relação à infecção do macrófago como uma cepa de *T. cruzi* pouco virulenta, atenuada.

SUMMARY

Investigation about of the attempt to infect with amastigote and tripomastigote form of *T. cruzi* peritoneal macrophages of mouse and itself

Attempt to infect peritoneal macrophages mouse in vivo was negative. As well as, the attempt to infect macrophages in vitro was not exitous.

In contrast, there were interaction between tripomastigotes culture forms and mouse macrophages with infection of 50% of cells in monolayers and the number of intracellular amastigotes is very scarce: 2 or 4; no replication of the parasite was observed. Various degenerate cells were observed.

The no invasives (amastigotes) forms infected only 10% of macrophages, and replication was not observed.

Both the percentage of cells infected and the number of intracellular amastigotes decreased with time in culture.

The attempt to infect mice with culture forms (amastigotes of tripomastigotes) and with macrophages infected was not exitous.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - BEMBEHANI, K. - Developmental cycles of "*Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*" (Chagas, 1909) in mouse peritoneal macrophages in vitro. *Parasitology* 66: 343-353, 1973.
- 02 - DVORAK, J. R. & SCHMUNIS, G. A. - "*Trypanosoma cruzi*": interaction with mouse peritoneal macrophages from mice immunized with "*Trypanosoma*

cruzi" or BCG, and absence of cross immunity on challenge in vivo. *J. Exp. Med.* 142: 299-311, 1975.

- 03 - MAC CABE, R. E.; REMINGTON, J. S.; & ARAÚJO, F. G. - Mechanisms of invasion and replication of the intracellular stage in "*Trypanosoma cruzi*". *Infect Immun.* 46(2): 372-376, 1984.
- 04 - MILDNER, R.; KLOETZEL, J. & DEANE, M. - Observation on the interaction of peritoneal macrophages with "*Trypanosoma cruzi*". I. Initial phase of the relationship with blood stream and culture forms in vitro. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 15: 386-392, 1973.
- 05 - MILDNER, R.; KLOETZEL, J. & DEANE, M. - Observation on the interaction of peritoneal macrophages with "*Trypanosoma cruzi*". II. Intracellular fate of bloodstream forms. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 19: 313-322, 1977.
- 06 - MILDNER, R. & KLOETZEL, J. - The development of "*Trypanosoma cruzi*" in macrophages in vitro. Interaction with lysosomes and host cell fate. *Parasitology* 80: 139-145, 1980.
- 07 - NACY, C. A. & DIGGS, C. L. - Intracellular replication of "*Leishmania tropica*" in mouse peritoneal macrophages: comparison of amastigote replication in adherent and nonadherent macrophages. *Infection and Immunity* Oct. 310-313, 1981.
- 08 - NOGUEIRA, N. - Host and parasite factors affecting the invasion of mononuclear phagocytes by "*Trypanosoma cruzi*". *Ciba Found Symp.* 99: 52-73, 1983.
- 09 - TANOWITZ, H.; WITTNER, M.; KRESS, Y. & BLOOM, B. - Studies of in vitro infection by "*trypanosoma cruzi*". II. Ultrastructural studies on the invasion of macrophages and L. cells. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 24: 25-33, 1975.

- 10 - VILLALTA, F.; KIERSZENBAUM, F. - Role of inflammatory cells in chagas' disease. II. Interaction of mouse macrophages and human monocytes with intracellular forms of "Trypanosoma cruzi": uptake and mechanism of destruction. *J. Immunol.*, 133(6): 3338-3343, 1984.
- 11 - ZENIAN, A.; KIERSZENBAUM, F. - "Trypanosoma cruzi": differences in cell surface interaction of circulating (trypomastigote) and culture (epimastigote) forms with macrophages. *J. Parasitol.*, 69(4): 660-665, 1983.