

PADRÃO ISOENZIMÁTICO DA CEPA Y DO *TRYPANOSOMA CRUZI* APÓS QUIMIOTERAPIA ESPECÍFICA

ROSÂNGELA CASTRO SILVA, CHRISTIANE M. G. SANTIAGO, ALBÉLIA LIMA PONTES & SONIA G. ANDRADE

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ/UFBA, Rua Valdemar Falcão, 121 Brotas 41945 Salvador, BA, Brasil

Isoenzymatic pattern of *Trypanosoma cruzi* Y strain following specific chemotherapy – *The isoenzyme pattern of the Trypanosoma cruzi Y strain recovered from mice inoculated with 15×10^4 blood trypomastigotes and previously treated with either Bay 2502 (Nifurtimox) or Ro 7-1051 (Benzonidazol) was analyzed in the following situations: a) strain resistant to Bay 2502 and again treated with the same drug; b) strain resistant to Bay 2502 and treated with Ro 7-1051; c) strain resistant to Ro 7-1051 and treated with that same drug.*

Although marked drug resistance was noted in all cases, the isoenzyme pattern of the Y strain for GPI, PGM, ALAT and ASAT remained throughout the same. The pattern was similar to that of the Peruvian strain, which also belongs to the same strain Type of the Y strain, but differed from those of the 21 SF (Type II) and Colombian (Type III) strains.

*Thus, the appearance of drug resistance in *T. cruzi* strain was not associated with a change in its isoenzymatic pattern.*

Key words: *Trypanosoma cruzi* – isoenzymes – chemotherapy – Benzonidazol – Nifurtimox

As características morfológicas de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* têm permitido incluí-las em três diferentes tipos ou padrões, de acordo com diversos parâmetros já estabelecidos (Andrade, 1974) e recentemente recomendados pela Organização Mundial de Saúde (WHO Report, 1986). Foi possível correlacionar o comportamento biológico dos três diferentes tipos de cepas com o perfil isoenzimático em relação às enzimas PGM, GPI, ALAT e ASAT (Andrade et al., 1983). Além dos caracteres morfológicos e isoenzimáticos, os tipos biológicos de cepas diferem também quanto à resposta aos quimioterápicos hoje em uso clínico: Benzonidazol e Nifurtimox (Andrade et al., 1975; Andrade & Figueira, 1977; Andrade et al., 1985). Além disto, testes quimioterápicos feitos em cepas isoladas de camundongos, pós-tratamento, mostram não só um aumento de resistência (Andrade et al., 1977) como uma

resistência cruzada aos dois quimioterápicos referidos (Pontes & Andrade, 1984). Esta resposta aos quimioterápicos poderia estar relacionada com características genéticas das cepas. Foi sugerido em trabalho anterior (Andrade et al., 1977), que uma seleção de clones resistentes poderia explicar a persistência de parasitismo em uma percentagem dos animais após o tratamento. Com o estabelecimento de perfis eletroforéticos das isoenzimas, capazes de distinguir os diferentes tipos de cepas (Andrade et al., 1983) e diferenciar clones em uma mesma cepa (Goldberg & Silva Pereira, 1983; Dvorak et al., 1980) esta hipótese poderia ser testada.

A cepa Y do *T. cruzi*, caracterizada como de Tipo I, mostrou um grau médio de susceptibilidade ao Benzonidazol e ao Nifurtimox, sendo que, uma percentagem dos animais tratados permanece positiva, permitindo o reisolamento da cepa.

No presente trabalho, procura-se investigar se a cepa Y do *T. cruzi*, isolada de camundongos tratados e não curados, mantém as suas características isoenzimáticas ou se ocorrem modificações indicativas de alterações no padrão genético da mesma.

Este trabalho recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do UNDP/WORLD BANK WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases. (S. G. ANDRADE).

Recebido em 18 de julho de 1988.
Aceito em 25 de janeiro de 1989.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizada no presente trabalho a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, isolada de camundongos suíços submetidos a tratamento quimioterápico com as drogas Nifurtimox (Bay 2502) ou Benzonidazol (Ro 7-1051), porém sem cura parasitológica. O esquema de tratamento foi o utilizado no presente trabalho e está expresso a seguir. A duração do tratamento foi de 90 dias. A partir dos camundongos recém-nascidos inoculados para teste de cura, e que positivaram, foram feitas quatro a oito passagens em camundongos recém-nascidos e a cepa Y, assim reisolada, serviu de inóculo para novos grupos de terapêutica, constituindo os seguintes grupos experimentais:

Grupo I – Vinte camundongos suíços inoculados com a cepa Y resistente ao Nifurtimox, tratados com esta mesma droga (Bay-Y-Bay);

Grupo II – Vinte camundongos suíços inoculados com a cepa Y resistente ao Nifurtimox, tratados com o Benzonidazol (Bay-Y-Ro);

Grupo III – Vinte camundongos suíços inoculados com a cepa Y resistente ao Benzonidazol e tratados com esta mesma droga (Ro-Y-Ro).

O inóculo, nos três grupos experimentais foi de 15×10^4 formas sanguícolas. Como controles da resposta da cepa Y aos quimioterápicos, foi utilizado o grupo de tratamento previamente feito, antes do isolamento das formas resistentes, nas mesmas condições de inóculo e de esquema terapêutico.

Drogas usadas: Nifurtimox (2-metil-4-[5'-nitrofurilideno-amino]-tetrahydro-4H-1,4-thiazine-1,1 dioxina) e Benzonidazol-Acetamidado N-benzil-2-nitro-1-imidazol.

O tratamento dos animais foi feito de acordo com esquemas já estabelecidos para o Nifurtimox (quatro doses diárias de 200/mg/kg peso corporal seguidas de doses diárias de 50 mg/kg até 90 dias) e para o Benzonidazol (100 mg/kg peso corporal durante 90 dias).

Os animais tratados que sobreviveram até o final do tratamento e que apresentaram parasitemia negativas ao exame direto, foram submetidos a testes de cura parasitológica: xenodiagnóstico e subinoculação do sangue em camundongos recém-nascidos. A partir da posi-

ção do teste de subinoculação, foram feitas as hemoculturas em meio Warren e após sete repiques sucessivos neste mesmo meio foram preparados os extratos enzimáticos utilizados para a análise eletroforética das isoenzimas. Como padrão das cepas dos três diferentes tipos, foram utilizados os extratos enzimáticos das cepas Peruana (Tipo I), 21 SF (Tipo II) e Colombiana (Tipo III). Como controle do padrão isoenzimático da cepa Y foi feita a análise eletroforética de duas amostras da cepa Y, também em comparação com as cepas padrão referidas. As amostras da cepa Y tinham diferentes períodos de manutenção em cultura e estocagem em Nitrogênio líquido após a obtenção dos extratos enzimáticos: Y¹ – isolada em cultura em 1979, mantida em cultura por dois anos e obtidos extratos enzimáticos, mantidos em Nitrogênio líquido durante sete anos, até o uso; Y² – isolada em cultura em 1985 e após dois meses obtidos os extratos enzimáticos, mantidos em Nitrogênio líquido por três anos até o uso.

Análise isoenzimática: as formas de cultura do *T. cruzi* foram lavadas, submetidas a lise e extração enzimática, e armazenadas em Nitrogênio líquido como pequenas pérolas até o seu uso (Miles et al., 1977).

Eletroforese: as seguintes enzimas foram investigadas: aspartato aminotransferase (E.C.2.6.1.1 ASAT), alanina aminotransferase (E.C.2.6.1.2 ALAT), fosfoglucomutase (E.C.2.7.5.1 PGM), glucose fosfato isomerase (E.C.5.3.1.9 GPI). A eletroforese em gel de amido foi realizada com a aplicação de 20 volts/cm durante 2h e 4h30min para as enzimas PGM e GPI respectivamente e com 30 volts/cm durante 1h e 1h30min para as enzimas ASAT e ALAT. A revelação das enzimas ASAT e ALAT foi feita com tampão fosfato 0,1M e beta NAD e o revelador aplicado sobre o gel embebido em papel de filtro Whatman sendo a visualização dos padrões feita sob luz ultravioleta. Para as enzimas PGM e GPI foi usado o tampão Tris/HCl 0,3mM e NADP. A revelação foi feita pelo MTT 0,36mM (sal de Tetrazolium), gel de agar 1,2% e PMS 0,05mM (Fenazina e metassulfato).

RESULTADOS

Resultado do tratamento: os resultados do tratamento nos diversos grupos experimentais estão expressos na Tabela.

TABELA

Resultados do tratamento da infecção experimental de amostras da cepa Y resistentes ao Nifurtimox e ao Benzonidazol

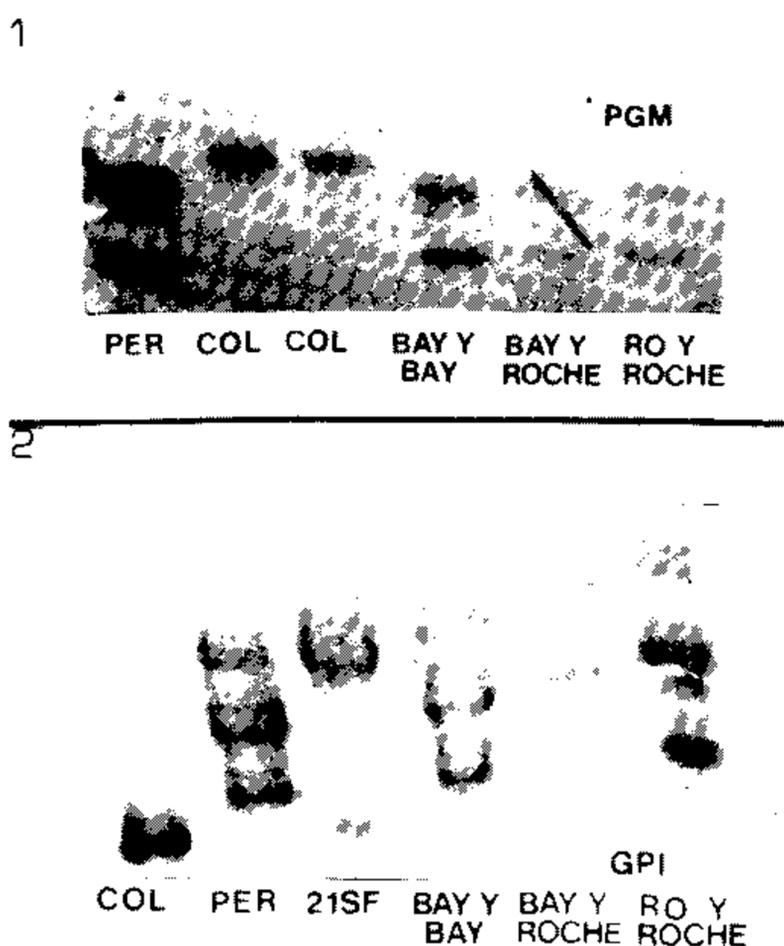
Amostras da cepa Y	Tratamento	Índices de cura
Resistente ao Nifurtimox	I - Nifurtimox (Bay-Y-Bay)	13,0%
	II - Benzonidazol (Bay-Y-Ro)	28,5%
Resistente ao Benzonidazol	III - Benzonidazol (Ro-Y-Ro)	33,3%
Não pré-tratadas	Nifurtimox	35,0%
	Benzonidazol	50,0%

Os camundongos do Grupo I, inoculados com a cepa Y resistente ao Nifurtimox e tratados com a mesma droga, tiveram um índice de cura de 13%. Os camundongos do Grupo II, inoculados com a cepa Y resistente ao Nifurtimox e tratados com o Benzonidazol, tiveram um índice de cura de 28,5%. Os animais de Grupo III infectados com a cepa Y resistente ao Benzonidazol e tratados com a mesma droga, apresentaram o índice de cura de 33,3%. Os resultados do tratamento da cepa Y não previamente tratada foram os seguintes: Benzonidazol 50% e Nifurtimox 35% de cura.

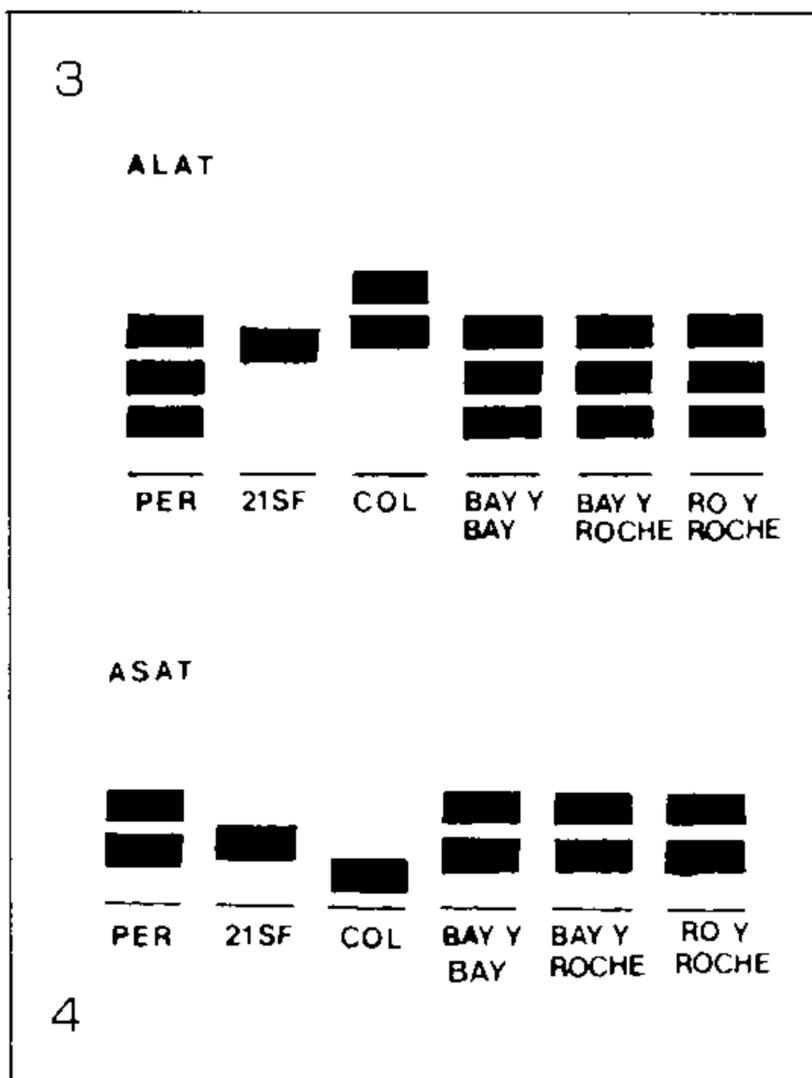
Estudo isoenzimático: nas Figs. 1 a 4 estão representados os padrões isoenzimáticos obtidos com as diferentes amostras da cepa Y, representativas dos grupos experimentais I, II e III analisados em relação às enzimas PGM, GPI, ALAT e ASAT, bem como os padrões das cepas Peruana (Tipo I), 21 SF (Tipo II) e Colombiana (Tipo III).

Nas Figs. 5 a 8 são vistos os padrões dos controles da cepa Y em dois diferentes períodos de manutenção, também em comparação com os três protótipos de cepas.

As diversas amostras da cepa Y, tanto as isoladas após quimioterapia como os controles em diferentes períodos de manutenção no laboratório, em cultura e em criopreservação dos extratos enzimáticos, apresentaram perfis eletroforéticos para as enzimas PGM, GPI, ALAT e ASAT idênticos entre si e correspondentes ao padrão da cepa Peruana (Tipo I).

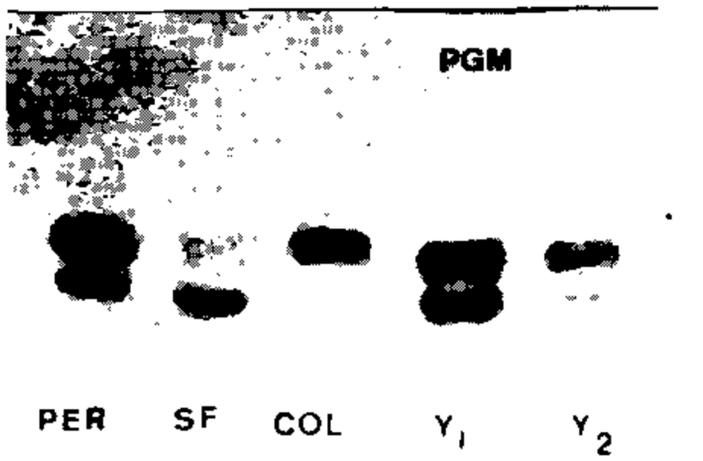


Figs. 1 e 2: PGM e GPI - Comparação do padrão eletroforético da cepa Y resistente ao tratamento (três amostras) com o das cepas padrão (Peruana, 21 SF e Col.). Observam-se padrões idênticos entre as três amostras correspondendo ao da cepa Peruana (Tipo I).

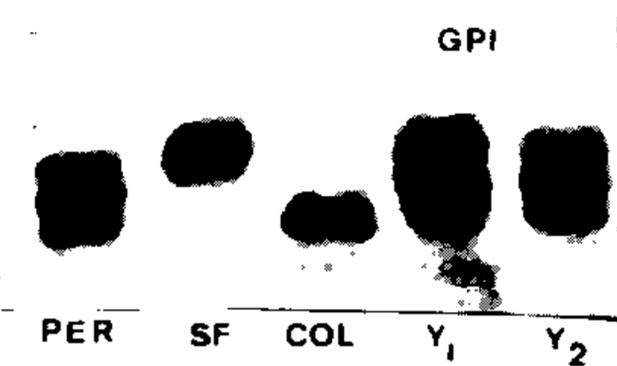


Figs. 3 e 4: ASAT e ALAT - Perfis eletroforéticos semelhantes entre as cepas resistentes ao tratamento e o padrão de Tipo I (Peruana).

5

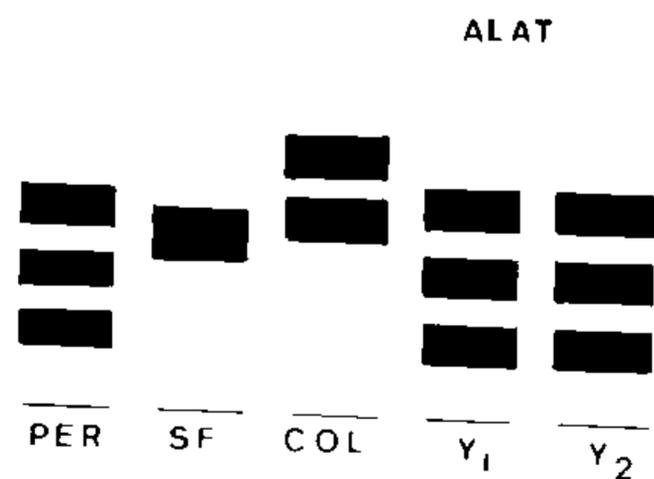


6

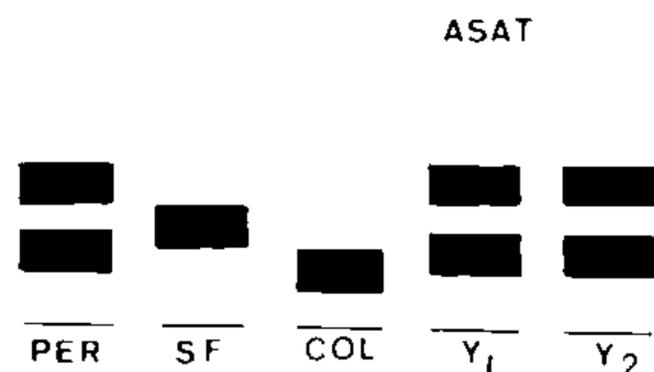


Figs. 5 e 6: PGM e GPI – Controle do padrão eletroforético da cepa Y em diferentes períodos de manutenção, idêntico ao padrão do Tipo I (Peruana).

7



8



Figs. 7 e 8: ASAT e ALAT – Padrões eletroforéticos da cepa Y com diferentes períodos de manutenção idênticos ao padrão de Tipo I (Peruana).

DISCUSSÃO

Isolando-se o *T. cruzi* de camundongos infectados com a cepa Y, tratados e não curados, procurou-se verificar se os seus caracteres isoenzimáticos diferiam da cepa de origem. Pôde-se verificar, entretanto, que as amostras isoladas de animais resistentes ao tratamento e submetidas a novo tratamento, não apresentaram modificações no seu padrão isoenzimático, nas enzimas que permitem distinguir os tipos biológicos de cepas (Tipos I, II, III) (Andrade, 1974; WHO Report, 1986). A resposta aos quimioterápicos tem sido considerada como um bom elemento para distinguir as cepas classificadas em diferentes tipos morfológicos. Entretanto, em cepas consideradas suscetíveis como as de Tipo I (Y, Peruana e AWP), como anteriormente estudado (Andrade et al., 1985), uma certa porcentagem de animais persiste positiva. Por outro lado, foi bem comprovado nos resultados obtidos no presente trabalho, o aumento da resistência da cepa Y aos quimioterápicos, quando comparado com os índices observados nos controles inoculados com cepa Y não previamente submetida aos quimioterápicos: 50% de cura com o Benzonidazol e 35% com o Nifurtimox, enquanto que, nos animais inoculados com as cepas resistentes ao Nifurtimox os índices de cura foram respectivamente de 28,8% e 13,0% e na cepa Y resistente ao Benzonidazol o índice de cura com esta mesma droga foi de 33,3%. Isto poderia sugerir que clones não suscetíveis aos quimioterápicos tenham sobrevivido e se multiplicado no animal não curado.

Os caracteres isoenzimáticos de uma cepa são dependentes do seu padrão genético (Miles, 1985) e permitem distinguir clones diversos que entram na composição das cepas (Goldberg & Silva Pereira, 1983; Dvorak et al., 1980). Em estudos realizados com diversas cepas, pela análise dos esquizodemas, foi também verificada a heterogeneidade de populações de *T. cruzi* isoladas do vertebrado ou do inseto vetor (Gonçalves et al., 1985).

A cepa Y do *T. cruzi*, isolada por Silva & Nussenzweig (1953), vem sendo largamente utilizada em trabalhos experimentais. Embora a análise do esquizodema da cepa Y de diferentes proveniências tenha mostrado perfis variados (Gonçalves et al., 1985), as características da cepa Y utilizada neste trabalho são idênticas às inicialmente descritas por Brener (1965), sem ter mostrado modificações no curso de sua ma-

nutenção. Os estudos de Brener (1965) e de Brener & Chiari (1963) estabeleceram como caracteres predominantes desta cepa a presença de formas delgadas e os piques precoces de parasitemia com alta mortalidade, sendo também descrito o acentuado macrofagotropismo desta cepa (Andrade & Andrade, 1966; Andrade, 1974; Melo & Brener, 1978). O estudo histopatológico em camundongos permitiu determinar diferenças de tropismo tissular em relação à cepa Colombiana (Andrade & Andrade, 1966) e a caracterização morfológica desta cepa mostrou que a mesma, juntamente com a cepa Peruana, são representativas do Tipo I, de acordo com Andrade (1974). Os caracteres referidos têm-se mantido constantes após longo tempo de manutenção por passagens sucessivas em camundongos, tendo sido demonstrado em estudo de Magalhães et al. (1985) a conservação destas características mesmo após passagem em diferentes meios, isto é, em culturas axênicas, em triatomíneos e em criopreservação. A análise isoenzimática (Andrade et al., 1983) demonstrou um zimodema característico para as cepas de Tipo I, incluindo a Y, sem correspondência com os zimodemas estabelecidos por Miles et al. (1980). Nas amostras da cepa Y analisadas como controles, no presente trabalho, foi vista a manutenção do padrão isoenzimático desta cepa, de acordo com o já descrito por Andrade et al. (1983), apesar dos diferentes períodos de manutenção em cultura e da conservação dos extratos por período prolongado em Nitrogênio líquido. Estudos feitos com clonagem desta cepa, por Goldberg & Silva (1983), mostraram nos clones e subclones obtidos um mesmo padrão isoenzimático, correspondendo ao zimodema C de Romanha (1982). A comparação através da prova de aglutinação com anticorpos monoclonais, da amostra da cepa Y mantida em nosso laboratório, com amostra desta cepa proveniente da Universidade de Harvard, Boston, mostrou identidade das reações (Hoff, R. e Andrade S. G., dados não publicados). Os fatos acima descritos falam de uma identidade e de uma manutenção de caracteres da cepa Y. Deste modo quaisquer fatores que pudessem interferir na composição de sua população poderiam levar a uma mudança de seus padrões de comportamento biológico e/ou isoenzimático.

Parece-nos importante assinalar, com base nos resultados obtidos no presente trabalho, o fato de que os caracteres de uma cepa podem se manter estáveis, mesmo quando submetida à ação de quimioterápicos capazes de destruir as

formas parasitárias intracelulares, e, conseqüentemente, promover uma alteração da população parasitária.

RESUMO

Padrão isoenzimático da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* após quimioterapia específica — Foi estudado o perfil isoenzimático da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* isolada de camundongos tratados e não curados com o Nifurtimox (Bay 2502) ou com o Benzonidazol (Ro 7.1051), submetida à passagens em camundongos recém-nascidos e a seguir inoculada nos seguintes grupos experimentais: I — camundongos inoculados com a cepa Y resistente ao Nifurtimox e tratados com esta mesma droga; II — camundongos inoculados com a cepa Y resistente ao Nifurtimox e tratados com o Benzonidazol e III — camundongos resistentes ao tratamento com o Benzonidazol e tratados com esta mesma droga. Os inóculos foram de 15×10^4 tripomastigotas sanguícolas. Houve aumento de resistência em relação à cepa original com a mesma droga e resistência cruzada. A cepa Y isolada dos animais não curados foi passada em cultura em meio Warren e preparados os extratos enzimáticos para a eletroforese das seguintes enzimas: GPI, PGM, ALAT e ASAT. Como controle isoenzimático foram utilizadas as cepas Peruana (Tipo I), 21 SF (Tipo II) e Colombiana (Tipo III) e duas amostras da cepa Y mantidas por diferentes períodos em cultura e em criopreservação dos extratos enzimáticos. Não houve modificações do perfil isoenzimático da cepa Y, que se manteve idêntico ao padrão das cepas de Tipo I (Peruana) e ao padrão das amostras da cepa Y com diferentes períodos de manutenção.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi* — isoenzimas — quimioterapia — Benzonidazol — Nifurtimox

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, S. G., 1974. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Baiano. *Rev. Patol. Trop.*, 3: 65-121.
- ANDRADE, S. G. & ANDRADE, Z. A., 1966. Estudo histopatológico comparativo das lesões produzidas por duas cepas do *Trypanosoma cruzi*. *O Hospital* (Rio de Janeiro), 70: 1268-1278.
- ANDRADE, S. G.; ANDRADE, Z. A. & FIGUEIRA, R. M., 1977. Estudo experimental sobre a resistência de uma cepa do *Trypanosoma cruzi* ao Bay 2502. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 19: 124-129.
- ANDRADE, S. G. & FIGUEIRA, R. M., 1977. Estudo experimental sobre a ação terapêutica da droga Ro 7-1051 sobre a infecção por diferentes cepas do

- Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 19: 335-341.
- ANDRADE, S. G.; FIGUEIRA, R. M.; CARVALHO, M. L. & GORINI, D. F., 1975. Influência da cepa do *Trypanosoma cruzi* na resposta à terapêutica pelo Bay 2502 (Resultados de tratamento a longo prazo). *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 17: 380-389.
- ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B. & PONTES, A. L., 1985. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox, in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull. WHO*, 63: 721-726.
- ANDRADE, V.; BRODSKYN, C. & ANDRADE, S. G., 1983. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77: 796-799.
- BRENER, Z., 1965. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 59: 19-26.
- BRENER, Z. & CHIARI, E., 1963. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 5: 128-132.
- DVORAK, J. A.; HARTMAN, D. H. & MILES, M. A., 1980. *Trypanosoma cruzi*: correlation of growth kinetics to zymodeme type in clones derived from various sources. *J. Protozool.*, 27: 472-474.
- GOLDBERG, S. S. & SILVA PEREIRA, A., 1983. Enzyme variation among clones of *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.*, 69: 91-96.
- GONÇALVES, A. M.; NEHME, N. S. & MOREL, C. M., 1985. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 18: 67-73.
- MAGALHÃES, J. B.; PONTES, A. L. & ANDRADE, S. G., 1985. Comportamento das cepas Y e Peruana do *Trypanosoma cruzi* no camundongo, após passagem em diferentes meios. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 80: 41-50.
- MELO, R. C. & BRENER, Z., 1978. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J. Parasitol.*, 64: 475-482.
- MILES, M. A., 1985. Isozyme characterization. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 18 (Supl.): 53-59.
- MILES, M. A.; LANHAM, S. M.; SOUZA, A. A. & POVOA, M., 1980. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 74: 221-237.
- MILES, M. A.; TOYE, P. J.; OSWALD, S. C. & GODFREY, D. G., 1977. The identification by isoenzyme patterns of two distinct groups of *Trypanosoma cruzi* circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 74: 217-225.
- PONTES, A. L. & ANDRADE, S. G., 1984. Resposta à quimioterapia com o benznidazol e o nifurtimox em camundongos inoculados com cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas de animais previamente tratados. In: Resumos do XX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Salvador, Bahia, 5-9 fev. p. 25.
- ROMANHA, A. J., 1982. *Heterogeneidade isoenzimática em Trypanosoma cruzi*. Tese, Belo Horizonte, MG.
- SILVA, L. H. P. & NUSSENZWEIG, V., 1953. Sobre uma cepa do *T. cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.*, 20: 191-208.
- WHO, 1986. Report of the Steering Committees. Research activities of the Scientific Working Group (SWG) on Chaga's disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 81 (Suppl): 181.244.