

## ARTIGOS

### ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE CEPAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* APÓS PASSAGEM EM DIFERENTES ESPÉCIES DE TRIATOMÍNEOS

Juracy B. Magalhães e Sonia G. Andrade

*Foi estudada a influência da passagem em diferentes espécies de triatomíneos de cepas do T. cruzi biologicamente distintas, mantidas em camundongos. Cepas: Peruana (Tipo I), 12 SF (Tipo II), Colombiana (Tipo III). Triatomíneos: Rhodnius prolixus, Panstrongylus megistus e Triatoma infestans. Ninfas do 4º estágio foram alimentadas em camundongos infectados com as respectivas cepas e obtidos os inóculos (10<sup>4</sup> formas metacíclicas) para infecção de camundongos de 8 a 10 g. Grupos experimentais para cada cepa: I - Controles inoculados com formas sanguícolas; II, III e IV - inoculados com metacíclicos de P. megistus, T. infestans ou R. prolixus, respectivamente. Os perfis de parasitemia foram mantidos para cada cepa, com piques mais elevados nas infecções com metacíclicos do P. megistus e do R. prolixus, para a cepa Peruana, do P. megistus para a 12 SF e do R. prolixus, para a Colombiana. O histotropismo e o padrão de lesões foram mantidos para os três tipos de cepas. O grau de virulência da cepa Peruana foi idêntico em todos os grupos e variou para as cepas 12 SF e Colombiana de acordo com a espécie de triatomíneo usada, com predominância de formas delgadas, nos inoculados com formas metacíclicas o que foi interpretado como uma fase adaptativa das formas metacíclicas ao hospedeiro vertebrado.*

*Palavras-chaves: Trypanosoma cruzi. Triatomíneos. Cepas do T. cruzi. Caracteres biológicos. Vetores.*

Em trabalho anterior<sup>10</sup> tivemos a oportunidade de verificar que a passagem das cepas Y e Peruana do *T. cruzi* em diferentes meios de multiplicação (culturas acelulares, passagem em triatomíneos) ou a manutenção em criopreservação, não alteravam o comportamento morfológico destas cepas, na infecção de camundongos, de acordo com critérios previamente estabelecidos<sup>1</sup>. No referido estudo, foi utilizado exclusivamente o *R. prolixus* para avaliar o efeito da passagem em triatomíneos sem que se tenham observado alterações do comportamento das mesmas. Também Garcia e cols<sup>6</sup> verificaram que a passagem de uma cepa homogênea em triatomíneo não alterou os seus caracteres biológicos, bioquímicos e genéticos. Carvalheiro e Collares<sup>4</sup>,

fazendo uma passagem da cepa Y em *T. infestans* verificaram a manutenção da virulência da cepa com altos níveis parasitêmicos e alta mortalidade, assinalando entretanto uma diminuição do reticulotropismo, o que não foi por nós observado em relação ao *R. prolixus*. Outros autores, entretanto, comparando a infectividade de formas sanguícolas de diferentes cepas com a de formas metacíclicas dos triatomíneos encontraram maior infectividade nas primeiras, com maiores níveis parasitêmicos, bem como diferenças no viscerotropismo<sup>7,11,14</sup>. Deste modo é de interesse verificar se as características de cepas de tipos biológicos padronizados (Tipos I, II e III) de acordo com Andrade<sup>1</sup>, são mantidas após passagens em diferentes espécies de triatomíneos. Tendo em vista as diferenças geográficas de distribuição das espécies de triatomíneos na América Central e do Sul<sup>15</sup> e no Brasil<sup>9,13</sup> e levando em conta as diferenças de suscetibilidade de diferentes espécies de triatomíneos<sup>5,8,16</sup>, o papel do inseto vetor deveria ser melhor avaliado quanto à sua influência na patogenicidade e virulência das cepas do *T. cruzi*.

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA.

Apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Endereço para correspondência: Dra. Sonia G. Andrade, R. Valdemar Falcão 121 Brotas, 41945 Salvador, BA.

Recebido para publicação em 14/06/91.

## MATERIAL E MÉTODOS

Camundongos suíços inoculados com  $10^5$  formas sanguícolas do *Trypanosoma cruzi* das cepas Peruana (Tipo I), 12 SF (Tipo II) ou Colombiana (Tipo III) foram utilizados para a alimentação (xenodiagnóstico) das seguintes espécies de triatomíneos: *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans*. Foram utilizadas ninfas do 4º estágio fornecidas pelo Laboratório de Parasitologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Os camundongos no 8º dia de infecção pela cepa Peruana, no 12º dia de infecção pela cepa 12 SF e no 18º dia pela cepa Colombiana foram anestesiados e submetidos ao xenodiagnóstico em grupos individualizados para cada espécie de triatomíneo utilizada. As ninfas foram mantidas por 45 dias sem posterior alimentação. Para obtenção de inóculos provenientes de cada espécie de triatomíneo, o conteúdo intestinal dos insetos foi extraído, suspenso em PBS pH 7.2 e após três lavagens por centrifugação a 1.000 g com salina tamponada, feita contagem das formas metacíclicas em câmara Neubauer. Os inóculos foram padronizados em  $10^4$  metacíclicos em 0,2 ml e inoculados em camundongos de 8 a 10g por via intraperitoneal. Para cada cepa do *T. cruzi*, foram feitos 4 grupos experimentais: Grupo I - camundongos controles, infectados com formas sanguícolas provenientes de camundongos; Grupo II - camundongos infectados com metacíclicos obtidos do *P. megistus*; Grupo III - camundongos infectados com metacíclicos provenientes do *T. infestans*; Grupo IV - camundongos inoculados com formas de *R. prolixus*.

Na Tabela 1 constam os números de animais de cada grupo. Como controles, camundongos suíços de 8 a 10 g foram inoculados com formas sanguícolas obtidas de camundongos, após três lavagens em salina tamponada e inóculos idênticos ( $10^4$ ), para as três cepas.

Os camundongos infectados, dos diversos grupos experimentais, foram acompanhados quanto à evolução de parasitemia, à morfologia dos parasitos no sangue periférico, aos índices de mortalidade e às lesões histopatológicas no curso da infecção. A parasitemia foi avaliada em 5 animais de cada grupo, no sangue periférico, entre lâmina e lamínula em 50 campos microscópicos de X400 e expressa pela média aritmética do número de parasitos

encontrado. O estudo morfológico foi feito em esfregaços de sangue periférico, corados pelo método de Giemsa, do 7º ao 14º dias pós infecção através contagem percentual de formas largas e delgadas. A mortalidade foi avaliada pela percentagem de animais que morreram durante a infecção excluídos os sacrificados. Os dados de mortalidade nos diversos grupos constam da Tabela 1.

O estudo histopatológico foi feito em camundongos sacrificados no 7º, 10º, 12º, 14º e 17º dias pós infecção com a cepa Peruana e no 7º, 12º, 15º, 20º, 25º e 30º com as cepas 12 SF ou Colombiana. Os animais sacrificados após anestesia pelo éter, foram submetidos a autópsias completas e fragmentos dos diversos órgãos fixados em formol a 10%.

## RESULTADOS

### I. Camundongos infectados com a cepa Peruana.

a. *Evolução da parasitemia.* Na Figura 1 estão expressos os níveis de parasitemia nos diversos grupos de infecção pela cepa Peruana. Em todos os grupos observou-se acentuada e precoce elevação da parasitemia, com piques elevados do 8º ao 14º dia, observando-se os níveis mais elevados nos infectados com formas do *P. megistus* e do *R. prolixus*.

b. *Os índices de mortalidade foram de 100% do*

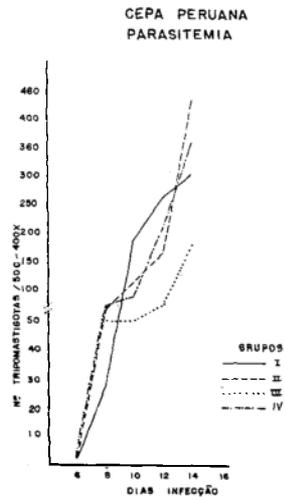


Figura 1 - Níveis de parasitemia em camundongos infectados com a cepa Peruana: Grupo I - inóculo proveniente de camundongos; Grupo II - inóculo de *P. megistus*; Grupo III - inóculo de *T. infestans*; Grupo IV - inóculo de *R. prolixus*.

14º ao 17º dia pós infecção, para todos os grupos experimentais (Tabela 1).

c. O estudo morfológico (Tabela 2) mostrou predominância de formas delgadas até o 14º dia nos animais infectados com formas sanguícolas e com

inóculo proveniente do *R. prolixus*. Nos inoculados com formas derivadas do *P. megistus* e do *T. infestans* as formas delgadas predominaram até o 10º dia e no 14º predominavam as formas largas.

d. Estudo histopatológico - a infecção com

Tabela 1 - Dados Gerais - Infecção de camundongos com diferentes cepas do *T. cruzi* (formas sanguícolas e metacíclicas)

Grupos* experimentais	Cepas:		12 SF		Colombiana	
	Nº Animais	Mortalidade %	Nº Animais	Mortalidade %	Nº Animais	Mortalidade %
I. Controles	20	100	20	69	20	7
II. <i>P. megistus</i>	8	100	20	62	8	45
III. <i>T. infestans</i>	11	100	27	90	11	92
IV. <i>R. prolixus</i>	8	100	24	33,3	8	100

\* Origem do inóculo: 10<sup>4</sup> formas sanguícolas (I) e 10<sup>4</sup> metacíclicos (II, III, IV)

Tabela 2 - Cepa Peruana do *T. cruzi* - Estudo morfológico. Percentagem de formas tripomastigotas largas e delgadas no sangue periférico.

Grupos experimentais (origem inóculo)*	7º dia			10º dia			14º dia		
	L	%	D	L	%	D	L	%	D
I. Camundongos (controles)	14		56	35	65		25		76
II. <i>P. megistus</i>	38		62	37	63		65		35
III. <i>T. infestans</i>	-		-	23	77		59		41
IV. <i>R. prolixus</i>	6		94	23	77		43		57

\* I = Formas sanguícolas; II, III, IV = formas metacíclicas.

- nº insuficiente para estudo; L = largas, D = delgadas

formas sanguícolas provenientes de camundongos determinou moderado macrofagotropismo a partir do 7º dia de infecção e discreto parasitismo de músculo esquelético e de miocárdio no 10º e 12º dias. Aos 17 dias observou-se acentuado parasitismo e intenso processo inflamatório em miocárdio e músculo esquelético. Nos camundongos infectados com inóculos provenientes das três espécies de triatomíneos, o parasitismo de macrófagos só foi visto a partir do 13º dia de infecção, em baixa intensidade. Aos 13 dias observou-se discreto parasitismo e discreto processo inflamatório em miocárdio e músculo esquelético que se intensificou entre 15º e 17º dias pós infecção.

## II. Camundongos infectados com a cepa 12 SF.

a. *Evolução da parasitemia* (Figura 2). No grupo controle inoculado com formas sanguícolas, observou-se rápida elevação da parasitemia a partir do 12º dia de infecção, ocorrendo picos elevados entre o 12º e o 20º dias. Nos grupos inoculados com formas metacíclicas de triatomíneos observaram-se picos parasitêmicos entre o 18º e 24º dias. O nível mais elevado foi detectado nos infectados com inóculo do *P. megistus*.

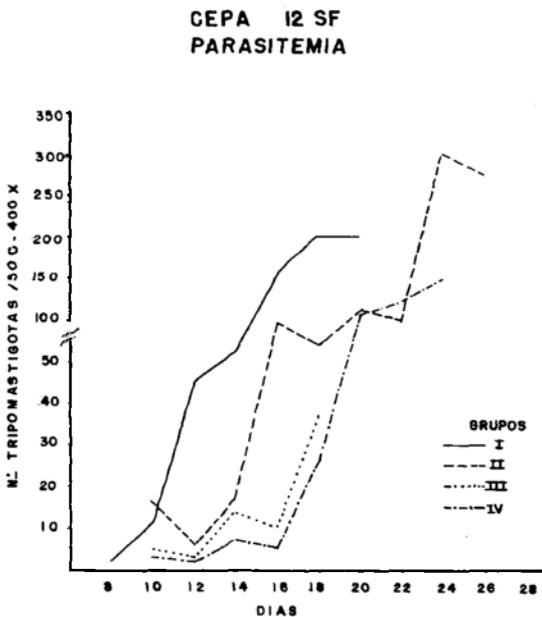


Figura 2 - Níveis de parasitemia em camundongos infectados com a cepa 12 SF: Grupo I - inóculo proveniente de camundongos; Grupo II - inóculo de *P. megistus*; Grupo III - inóculo de *T. infestans*; Grupo IV - inóculo de *R. prolixus*.

b. *Os índices de mortalidade* até o 20º dia de infecção estão expressos na Tabela 1, observando-se o índice mais elevado nos infectados com a cepa proveniente do *T. infestans* (90%) e o menos elevado com o inóculo do *R. prolixus* (33,3%).

c. *Estudo morfológico* (Tabela 3) mostrou predominância de formas largas nos camundongos inoculados com formas sanguícolas e de formas delgadas nos inoculados com formas provenientes das três espécies de triatomíneos.

d. *Estudo histopatológico*. Nos camundongos controles, infectados com formas sanguícolas da cepa 12 SF, observou-se aos 13 dias, moderado parasitismo de miocárdio, que se intensificou no 16º dia, tornando-se muito intenso no 24º dia de infecção, acompanhado do infiltrado inflamatório mononuclear de moderada intensidade. Também em músculo esquelético o parasitismo variou de discreto a moderado no 16º e 24º dias com moderada inflamação. Aos 16 dias as lesões determinadas pelo inóculo proveniente do *P. megistus* foram semelhantes às dos controles inoculados com formas sanguícolas, enquanto com os inóculos do *T. infestans* e do *R. prolixus*, o parasitismo era menor. Aos 24 dias de infecção observou-se parasitismo intenso de miocárdio, acompanhado de acentuado processo inflamatório em todos os grupos inoculados com formas provenientes de triatomíneos idênticos aos determinados por formas sanguícolas.

## III. Camundongos infectados com cepa Colombiana.

a. *Evolução da parasitemia*. (Figura 3). Tanto nos camundongos infectados com formas sanguícolas como nos infectados com formas metacíclicas das três espécies de triatomíneos, os picos de parasitemia ocorreram entre o 24º e o 30º dias de infecção, com uma evolução mais precoce nos inoculados com formas sanguícolas e pique máximo nos infectados com formas do *R. prolixus*.

b. *Os índices de mortalidade* (Tabela 1) foram variáveis para os 4 grupos e mais elevados nos inoculados com formas do *T. infestans* (92%) e do *R. prolixus* (100%) até o 26º dia de infecção.

c. *Ao estudo morfológico* houve predominância de formas largas no grupo controle e nos inoculados com formas de *P. megistus* e predominância de formas delgadas nos inoculados com formas

Tabela 3 - Cepas 12 SF e Colombiana do *T. cruzi* - Estudo morfológico. Percentagem de formas tripomastigotas largas e delgadas do *T. cruzi* no sangue periférico.

Grupos* experimentais (origem inóculo)	Cepas:		12 SF			Colombiana		
			10º dia		14º dia		14º dia	
	L	%	L	%	D	L	%	D
I. Camundongos (controles)	53		47		56	44	58	42
II. <i>P. megistus</i>	-		-		34	66	55	45
III. <i>T. infestans</i>	31		69		57	43	35	65
IV. <i>R. prolixus</i>	22		78		35	65	17	83

\* I = Formas sanguícolas; II, III, IV = formas metacíclicas; L = largas; D = delgadas  
- nº insuficiente para estudo.

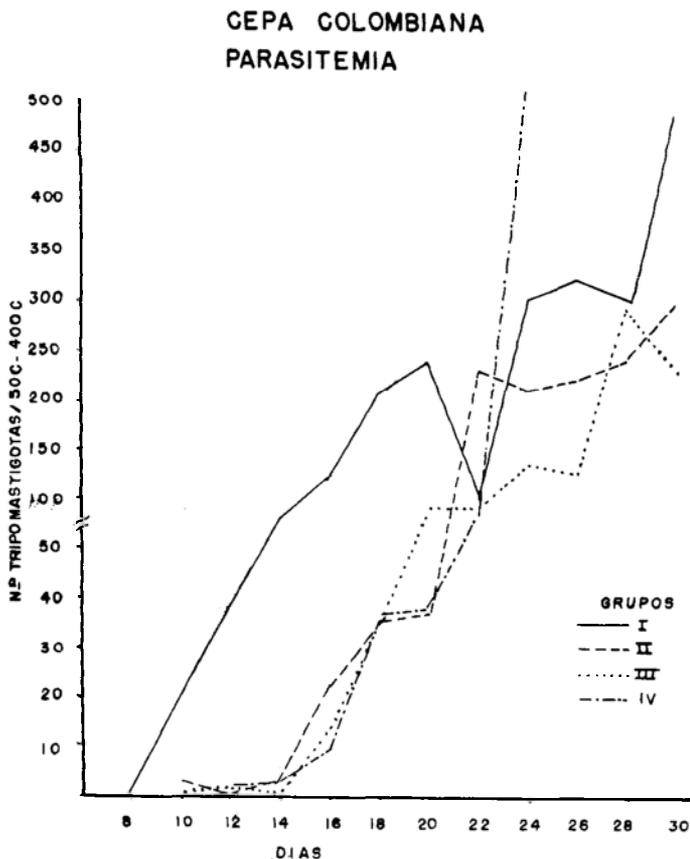


Figura 3 - Níveis de parasitemia em camundongos infectados com a cepa Colombiana: Grupo I - inóculo proveniente de camundongos; Grupo II - inóculo de *P. megistus*; Grupo III - inóculo de *T. infestans*; Grupo IV - inóculo de *R. prolixus*.

provenientes do *T. infestans* e *R. prolixus* (Tabela 3).

d. *Estudo histopatológico.* Nos controles infectados com formas sanguícolas da cepa Colombiana, observou-se presença de parasitos e moderado processo inflamatório em miocárdio e músculo esquelético a partir do 15º dia de infecção, o que se acentuou no 20º, 25º e 30º dias. O infiltrado inflamatório nesta fase era idêntico em miocárdio e músculo esquelético, variando de moderado a intenso e o parasitismo era de moderada intensidade. Aos 35 dias, observou-se intensa miocardite e miosite, com escassos parasitos. As lesões observadas com o inóculo obtido do *T. infestans* foram idênticas às observadas nos controles inoculados com formas sanguícolas. Na infecção com metacíclicos provenientes do *P. megistus* e do *R. prolixus* as lesões e o parasitismo foram mais intensos.

## DISCUSSÃO

A proposta do presente trabalho foi de verificar se cepas do *T. cruzi* mantidas em laboratório por passagens sucessivas em camundongos teriam modificado o seu comportamento biológico após a passagem em diferentes espécies de triatomíneos. Recentemente, Perlowagora-Szumlewicz e cols.<sup>12</sup> mostraram nítidas diferenças na infectividade de cepas do *T. cruzi* para diferentes espécies de triatomíneos, na dependência do tipo biológico e isoenzimático da cepa. Neste particular chamam a atenção estes autores, para alta infectividade da cepa São Felipe (Tipo II e zimodema 2) e a baixa infectividade da cepa Colombiana (Tipo III e zimodema 1). Deste modo, parece interessante investigar se a passagem em triatomíneos das cepas com características biológicas e isoenzimáticas definidas<sup>3</sup> poderia determinar alterações na sua evolução, virulência e patogenicidade para o animal experimental, especificamente o camundongo. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que as diversas cepas mantiveram os caracteres biológicos, avaliados de acordo com parâmetros já bem estabelecido<sup>1</sup>, mantendo os perfis de parasitemia, embora com um retardo na evolução, nas cepas 12 SF e Colombiana provenientes de triatomíneos, mantendo também o mesmo tropismo tissular e a mesma patogenicidade. O retardo na evolução da parasitemia correspondeu a um menor

grau de parasitismo nas fases iniciais de infecção, quando comparados aos controles infectados com formas sanguícolas. Foi observada entretanto, na evolução posterior, nítida elevação dos níveis parasitêmicos das diversas cepas provenientes de triatomíneos, por vezes atingindo níveis mais elevados do que os observados nos controles. Do mesmo modo, as lesões tissulares, que foram mais tardias, atingiram a mesma intensidade na fase final de observação na maioria dos grupos, podendo mesmo ser mais intensas, como foi observado com a cepa Colombiana proveniente do *P. megistus* e do *R. prolixus*. Vale assinalar que o comportamento de cada espécie de triatomíneo não foi uniforme em relação aos três tipos de cepas no que diz respeito à virulência do inóculo obtido. Um exemplo disto é o *R. prolixus*, cujo inóculo da cepa Colombiana determinou o mais alto índice de mortalidade (100%) enquanto com a cepa 12 SF, o inóculo proveniente do *R. prolixus* determinou o menor índice de mortalidade para esta cepa (33,3%). Comparando a virulência das diferentes cepas do *T. cruzi* após passagem nas três espécies de triatomíneos verificou-se que a cepa 12 SF é mais virulenta quando proveniente do *P. megistus* e do *T. infestans* e a cepa Colombiana, do *P. megistus* e do *R. prolixus*. A cepa Peruana mostrou virulência atenuada em todos os grupos, quando comparada com os padrões descritos anteriormente<sup>12</sup>. Isto foi atribuído ao baixo inóculo pois, como foi demonstrado em trabalho anterior<sup>10</sup>, com as cepas de Tipo I, houve nítida influência do inóculo quando se utilizaram inóculos de 10<sup>4</sup> ou 5 x 10<sup>4</sup>. A cepa Peruana manteve a predominância de formas delgadas em todos os grupos. Entretanto observou-se que após a passagem em triatomíneos, passaram a predominar as formas delgadas na infecção pela cepa 12 SF o mesmo acontecendo com a cepa Colombiana proveniente do *R. prolixus* e do *T. infestans*. O aparecimento de formas delgadas nas cepas passadas em triatomíneos, juntamente com retardo verificando na evolução da parasitemia e do parasitismo tissular poderiam representar uma fase adaptativa das formas provenientes do vetor no hospedeiro vertebrado.

## SUMMARY

To study the influence of the intermediate host

stage on the course of mouse infection, *Trypanosoma cruzi* belonging to the Peruvian (Type I), 12 SF (Type II) and Colombian (Type III) strains were passaged through either *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* or *Triatoma infestans*. *T. cruzi* metacyclic forms (dose 10<sup>6</sup>) from the different strains were obtained from each bug and inoculated into 8-10 gm mice. Comparison was made in mice inoculated with blood forms. Parasitaemia curves were plotted in the peripheral blood for each strain, reaching more elevated peaks with Peruvian strain parasites from *P. prolixus* and *R. prolixus*, 12 SF strain from *P. megistus* and Colombian strain from *R. prolixus*. Tissue tropism and histopathological patterns were those usually seen in mice infected with each respective strain type. Peruvian virulence was the same for all groups. Slender forms predominate among mice inoculated with

metacyclic forms of Colombian and 12 SF strains, probably an adaptative parasite change related to the intermediate host.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*. *Triatominae*. *T. cruzi* strains. Biological characters. Vectors.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Italo Sherlock Chefe do Laboratório de Parasitologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ/UFBA, pelo constante apoio no fornecimento das espécies de triatomíneos utilizadas no presente trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andrade SG. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. Revista de Patologia Tropical 3:65-121, 1974.
2. Andrade SG, Carvalho ML, Figueira RM. Caracterização morfo-biológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. Gazeta Médica da Bahia 70:32-42, 1970.
3. Andrade V, Brodskyn C, Andrade SG. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 77:796-799, 1983.
4. Carvalheiro JR, Collares EF. Estudos sobre o comportamento em camundongos de uma amostra altamente virulenta de *Trypanosoma cruzi* (amostra Y), após passagem em triatomíneos, ratos e culturas. Revista Brasileira de Biologia 25:169-175, 1965.
5. Cerisola JA, Rohwedder RW, Del Prado CE. Rendimiento del xenodiagnostico en la infeccion chagásica cronica humana utilizando ninfas de diferentes especies de triatomíneos. Boletín Chileno de Parasitología 26:57-58, 1971.
6. Garcia ES, Vieira E, Gonçalves A, Morel CM, Colli MAW. A strain of *Trypanosoma cruzi* and its biochemical characterization after passage through different invertebrate hosts. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 80:361-363, 1986.
7. Lammel EL, Muller LA, Isola ELD, Gonzalez Cappa SM. Effect of vector on infectivity of *Trypanosoma cruzi*. Acta Tropica 42:149-155, 1985.
8. Little JW, Tay J, Biagi F. A study on the susceptibility of triatomid bugs to some Mexican strains of *Trypanosoma cruzi*. Journal of Medicine and Entomology 3:252-255, 1966.
9. Lucena DT. Ecologia dos triatomíneos do Brasil. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais 11:577-635, 1959.
10. Magalhães JB, Pontes AL, Andrade SG. Comportamento das cepas Y e Peruana do *Trypanosoma cruzi* no camundongo, após passagem em diferentes meios. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 80:41-50, 1985.
11. Neal RA, Mc Hardy M. Comparison of infectivity of *Trypanosoma cruzi* blood stream trypomastigotes and metacyclic trypomastigote from *Rhodnius prolixus*. Acta Tropica 34:79-85, 1977.
12. Perlowagora-Szumlewicz A, Muller CA, Moreira CJC. Studies in search of suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 4 - The reflection of parasite stock in the responsiveness of different vector species to chronic infection with different *Trypanosoma cruzi* stocks. Revista de Saúde Pública de São Paulo 24:165-177, 1990.
13. Sherlock IA, Serafim EM. Fauna triatominae do Estado da Bahia, Brasil. VI - prevalência geográfica da infecção dos triatomíneos por *T. cruzi*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 8:129-142, 1974.
14. Tay J, Schetino PMS, Ontiveros D. El comportamiento en el ratón blanco de una cepa de

Magalhães JB, Andrade SG. Estudo do comportamento de cepas do *Trypanosoma cruzi* após passagem em diferentes espécies de triatomíneos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 24:209-216, out-dez, 1991

*Trypanosoma cruzi* mediante pases sucesivos en diferentes especies de triatomas. *Revista Latino Americana de Microbiologia e Parasitologia* 11:79-89, 1969.

15. Zeledon R. Los vectores de la enfermedad de Chagas en America. In: *Anais do Simpósio*

*Internacional de Doença de Chagas*, Buenos Aires p.327-345, 1972.

16. Zeledon R, Vieto E. Susceptibilidad de varias especies de triatomíneos a una cepa costarricense de *Schizotrypanum cruzi*, Chagas. 1901. *Revista de Biología Tropical* 5:195-199, 1957.