

## INTERAÇÃO DO *TRYPANOSOMA CRUZI* COM DIFERENTES VETORES: USO PARA O XENODIAGNÓSTICO

Nelson J. Alvarenga e Elizabeth Bronfen

*Foram estudadas as diferenças de interação (diferenciação e multiplicação) das cepas Y e CL de Trypanosoma cruzi, consideradas "polares", junto a Triatoma infestans, Panstrongylus megistus e Dipetalogaster maximus.*

*Concluiu-se que o T. infestans apresenta em suas populações cerca de 40% de indivíduos com acentuada resistência à infecção pela cepa Y. O P. megistus foi considerado um bom vetor onde se verificou pequena perda de infecção para ambas as cepas e boa diferenciação.*

*Melhor desenvolvimento e diferenciação para ambas as cepas foi observado em D. maximus e daí sua indicação para xenodiagnósticos.*

*Os autores concluem pela possibilidade da presença de fatores de resistência à infecção e também de inibidores de diferenciação como responsáveis por uma boa ou má interação parasito-vetor.*

Palavras chaves: Interação. *T. cruzi*-vetor. Xenodiagnóstico. Fator de resistência à infecção. Diferenciação.

Diferentes autores têm se preocupado em determinar o vetor ideal para o *T. cruzi* e sua aplicação em xenodiagnóstico da doença de Chagas. A crença de que as espécies locais de triatomíneos são melhores adaptadas às cepas do *T. cruzi* também locais, foi motivo para elaboração de trabalhos onde se procurou esta confirmação (Dias<sup>6</sup>, Urdaneta-Morales e Rueda<sup>18</sup>).

Recentemente Perlowagora-Szumlewicz e cols<sup>12</sup> demonstraram uma variação da suscetibilidade à infecção por diferentes espécies de triatomíneos frente à cepa Y do *T. cruzi*.

No presente trabalho estudou-se em espécies de triatomíneos provenientes de habitats diferentes a capacidade de manutenção de infecção e de metaciclogênese de duas cepas, Y e CL, consideradas como "polares" por Melo<sup>9</sup> e Brener<sup>4</sup>.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### 1. Parasitas

Foram utilizadas as cepas Y e CL do *T. cruzi* mantidas em laboratório por passagens periódicas em

camundongos por inóculo de formas sanguíneas. A cepa Y, isolada a partir de caso humano por Silva e Nussenzweig<sup>11</sup>, no Estado de São Paulo e CL, isolada por Brener e Chiari<sup>5</sup>, a partir de *T. infestans*, naturalmente infectado, proveniente do Estado do Rio Grande do Sul.

#### 2. Insetos

Foram utilizadas ninfas de 3º estágio de *T. infestans* e *P. megistus* e ninfas de 1º e 3º estágios de *D. maximus*.

Os insetos foram infectados por alimentação em camundongos apresentando parasitemia patente tendo sido previamente anestesiados com Thionembatal.

Dependendo do objetivo desejado, procedia-se à contagem de parasitas circulantes no sangue dos camundongos em câmara de Neubauer e nestes casos os triatomíneos eram pesados antes e após o repasto infectante para se calcular o número de flagelados ingeridos por cada inseto.

Os triatomíneos foram mantidos em condições ambientais ou em estufa em temperatura de 26–27°C, sendo alimentados a cada 20 dias.

Os diversos exames para verificação da positividade de infecção dos triatomíneos, foram feitos

Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, CP: 1743 – 30.000 Belo Horizonte – MG, Brasil.  
Recebido para publicação em 3/8/83.

individualmente seja por pressão abdominal, coleta de urina ou dissecação e retirada dos intestinos, conforme o objetivo do experimento. As contagens e a diferenciação das formas flageladas eram feitas em câmara de Neubauer após maceramento e suspensão em 1ml de PBS (pH 7.2) de "pool" dos intestinos dos insetos sabidamente infectados.

### 3. Avaliação estatística

Utilizou-se o teste de diferença entre duas proporções comparando-se o percentual de insetos que apresentavam-se positivos e teste do  $X^2$ .

## RESULTADOS

*T. infestans* infectados pela cepa Y e mantidos em condições ambientais por 60 dias apresentaram perda de infecção em 33% dos insetos, diferindo bastante dos resultados obtidos em *P. megistus* e *D. maximus* (Tabela 1).

Tabela 1 – Observação, por dissecação, da manutenção e perda de infecção em três espécies de triatomíneos infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e mantidas em condições ambientais por 60 dias.

Espécie	Número	Positivos(%)	Negativos(%)
<i>T. infestans</i>	58	40 (67)*	18 (33)
<i>D. maximus</i>	70	67 (96)	3 (4)
<i>P. megistus</i>	58	57 (98)	1 (2)

(\*) Diferença significativa para  $\infty = 0.05\%$ .

Um acompanhamento entre os 60 a 150 dias de *T. infestans* infectados pelas cepas Y e CL mostrou que sua perda de infecção apresenta índices relativamente constantes para ambas as cepas (Tabela 2). O tratamento estatístico mostrou diferença de proporção de infecção somente aos 60 dias, não se considerando diferentes os dados observados aos 90, 120 e 150 dias.

O estudo das populações de flagelados obtidos de intestinos de *P. megistus* e *D. maximus* infectados pelas duas cepas demonstrou que ambas as espécies de triatomíneos se infectam bem. Considerando-se o percentual de obtenção de tripomastigotas metacíclicos nota-se um melhor rendimento por parte de *D. maximus* assim como também uma população muito maior de epimastigotas (Tabela 3).

Tabela 2 – Manutenção e perda de infecção de *T. infestans* infectados pelas cepas Y e CL do *T. cruzi* mantidos em condições ambientais e observados por dissecação em diferentes períodos pós-infecção.

Dias	Cepa	Número	Positivos(%)	Negativos(%)
60*	Y	20	13 (65)	7 (35)
	CL	20	20 (100)	—
90	Y	24	16 (66.6)	8 (33.3)
	CL	20	18 (90)	2 (20)
120	Y	12	8 (66.6)	4 (33.3)
	CL	12	11 (91.6)	1 (8.33)
150	Y	15	9 (60)	6 (40)
	CL	15	13 (85)	2 (15)

(\*) Diferença estatisticamente significativa somente aos 60 dias.

Tabela 3 – Número de flagelados observados no trato digestivo de *P. megistus* e *D. maximus* infectados pelas cepas Y e CL do *T. cruzi* e mantidos a 27°C por 60 dias.

Espécie	Número	Cepa	Metacíclicos/ mililitro (%)	Epimastigotas/ mililitro
<i>P. megistus</i>	20	Y	50.000 (3.9)	1.280.000
	20	CL	100.000 (4.1)	2.400.000
<i>D. maximus</i>	20	Y	840.000* (11.4)	7.360.000
	20	CL	900.000* (15.5)	5.800.000

(\*) Valores estatisticamente significativos:  $X^2_{1gl} p < 0.05$ .

Tomando-se somente a metaciclogênese como parâmetro para medida de melhores condições de adaptação do *T. cruzi* observa-se, em *T. infestans* e *D. maximus*, infectados pela cepa Y e examinados aos 30, 60 e 90 dias, que o número de flagelados obtidos de *D. maximus* é muito superior ao de *T. infestans* chegando-se a obter um número de metacíclicos 13,5 vezes maior na primeira espécie (Tabela 4). Os resultados mostrados nas Tabelas 3 e 4, analisados através do teste do  $X^2$  com 1gl para  $p < 0.05$  demonstraram ser significativos a favor das infecções encontradas em *D. maximus*.

Para se verificar se o número de metacíclicos presentes nos intestinos dos insetos teria relação com o número de formas sanguíneas ingeridas no momento da infecção, foram examinadas ninfas de 1º e 3º estádios de *D. maximus* (20 de cada) infectadas pela cepa Y e mantidas por 60 dias nas mesmas condições.

Tabela 4 – Número de flagelados observados no trato digestivo de *T. infestans* e *D. maximus* infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e mantidos por diferentes períodos em temperatura ambiente.

Dias	Espécie	Número	Metacíclicos/ mililitro (%)	Epimastigotas/ mililitro
30	<i>T. infestans</i>	20	5.000 (1)	500.000
	<i>D. maximus</i>	20	22.000* (1.7)	1.300.000
60	<i>T. infestans</i>	20	40.000 (2.5)	1.560.000
	<i>D. maximus</i>	20	540.000* (11.7)	4.600.000
90	<i>T. infestans</i>	20	90.000	não feito
	<i>D. maximus</i>	20	720.000*	não feito

(\* ) Valores estatisticamente significativos:  $X^2$  1gl  $p < 0.05$ .

O exame realizado demonstrou praticamente não haver diferenças quanto ao número de metacíclicos obtidos de um e outro lote de insetos (900.000 e 750.000 por mililitro, respectivamente) confirmando observações anteriores<sup>2</sup>. Também o exame de ninfas de 1º estágio de *D. maximus*, separadas em dois lotes (10 em cada), em que um deles ingeriu o dobro de parasitas, ao final de 60 dias apresentaram aproximadamente o mesmo número de tripomastigotas metacíclicos (540.000 e 400.000 por mililitro).

## DISCUSSÃO

A se julgar pelos habitats ou mesmo pela distribuição geográfica das três espécies de triatomíneos teria sido viável supor-se o *T. infestans* como um vetor ideal para as duas cepas do *T. cruzi* aqui estudadas, por ser um inseto sabidamente domiciliar e de amplo espectro habitacional, dadas as características das diversas regiões geográficas onde é encontrado<sup>15</sup>.

*O. P. megistus* é uma espécie com características de maior exigência climática, encontrando-se tanto em domicílio como no peri-domicílio<sup>15</sup>. Seria considerada talvez como uma espécie com melhores condições de infecção pela cepa Y por ser encontrado no Estado de São Paulo, onde a cepa foi isolada.

*O. D. maximus*, espécie mexicana, cujo habitat é essencialmente silvestre, de região semi-árida<sup>8 10</sup>, pelos conceitos citados deveria ser a espécie de triatomíneo da qual não se poderia esperar bons resul-

tados de infecção uma vez que as referidas cepas do *T. cruzi* são provenientes da região sul do Brasil.

Urdaneta-Morales e Rueda<sup>14</sup> embora acreditando que a melhor combinação parasita-vetor deva se dar entre indivíduos de mesma área geográfica, não deixam de assinalar que certamente deva-se levar em conta as diferenças existentes entre os vetores. Os resultados dos experimentos realizados nos levam a admitir que realmente existem tais diferenças e mais, que existem também diferenças de interação entre as diversas cepas do *T. cruzi* e os diversos vetores.

Os dados nos levam a acreditar que deva haver realmente um mecanismo de controle de diferenciação do *T. cruzi* nos vetores, como proposto por Sher e Snary<sup>13</sup>, e também um de resistência à infecção o qual se faria manifestar pelo repertório nutricional existente no trato digestivo destes vetores permitindo ou não um maior desenvolvimento do parasita. Acreditamos que tais fatores se fazem sentir com maior ou menor intensidade, dependendo serem encontrados em maior ou menor volume no trato digestivo dos insetos, devendo-se levar também em consideração a capacidade de reconhecimento por parte do parasita.

Por tal hipótese e também com base nos dados de Alvarenga e Brener<sup>1</sup>, que demonstraram a capacidade de evolução do *T. cruzi* no trato intestinal de triatomíneos na ausência de sangue, concluímos que, o *T. infestans* seja uma espécie de triatomíneo que apresenta de maneira acentuada, em até 40% de seus indivíduos, o fator de resistência à infecção pelo *T. cruzi* uma vez que não foram consideradas significativas as diferenças de perda de infecção desta espécie pelas cepas em estudo, após 60 dias de infecção.

Quanto ao *P. megistus* consideramos como um vetor apto a receber as duas amostras do *T. cruzi*. Pela hipótese proposta pode-se dizer que trata-se de uma espécie onde o fator regulador de diferenciação se apresenta com características semelhantes ao observado em *T. infestans* mas com o fator de resistência à infecção presente de tal forma que permita a implantação das diferentes cepas havendo um baixo índice de perda de infecção. O número de flagelados bem como o percentual de tripomastigotas metacíclicos obtidos a partir de material colhido de *D. maximus* nos levam a admitir que nesta espécie o fator ou fatores que regulam a diferenciação e infecção apresentam-se reduzidos. Esta redução dos fatores permitiria maior diferenciação e menor resistência à implantação dos parasitas.

Os dados obtidos sugerem a necessidade de estudos mais aprofundados da fisiologia de triatomíneos associados à relação parasita-hospedeiro.

No que se refere à escolha de insetos para emprego em xenodiagnósticos da doença de Chagas, acreditamos que *D. maximus* seja a espécie indicada, por nossas observações e também as de Barreto e cols<sup>3</sup>, Marsden e cols<sup>8</sup> e Cuba e cols<sup>7</sup> onde são relatadas a capacidade de infecção por diferentes amostras do *T. cruzi* e ainda as facilidades que oferece por sua utilização desde seu primeiro estágio ninfal.

### SUMMARY

Data showing differences in the interaction (differentiation and multiplication) of *Trypanosoma cruzi* Y and CL strains ("polar strains"), in *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* and *Dipetalogaster maximus* are presented. It is concluded that with *T. infestans* 40% of the individual bugs have accentuated resistance to infection with the Y strain of *T. cruzi*. *P. megistus* was found to be a good vector to the studied strains presenting good development and differentiation of the parasites with low percentage of rejection of infection. Better development and differentiation is shown by *D. maximus* which is indicated for xenodiagnosis in Chagas' disease.

The authors suggest the presence of two factors responsible for this vector-parasite interaction: a resistance factor to infection, perhaps related to the presence of nutrients, and also a factor that regulates differentiation to metacyclic forms of *T. cruzi*.

Key words: *Trypanosoma cruzi*-vector interaction. Xenodiagnosis. Infection resistance factor. Differentiation.

### AGRADECIMENTO

Ao Dr. Philip D. Marsden pelas sugestões apresentadas e à Dra. Vânia A. Soares pela análise estatística.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvarenga NJ. Development of *Trypanosoma cruzi* in the vector. Congresso Internacional sobre Doença de Chagas, Rio de Janeiro, p. E3-E5, 1979.
2. Alvarenga NJ, Brener Z. Development of *Trypanosoma cruzi* in the vector in the absence of blood. Acta Tropica 35: 315-317, 1978.
3. Barreto AC, Marsden PD, Cuba CC, Alvarenga NJ. Estudo preliminar sobre o emprego do *Dipetalogaster maximus* (Uhler, 1894) (Triatominae) na técnica do xenodiagnóstico em forma crônica da doença de Chagas. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 20: 183-189, 1978.
4. Brener Z. Intraspecific variation in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasitic populations presenting distinct features. PAHO Scientific Publication nº 347: 11-21, 1977.
5. Brener Z, Chiari E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 5: 220-224, 1963.
6. Dias E. A comparative study of the susceptibility of four natural vectors to experimental development of *Schizotrypanum cruzi*. III International Congress of Microbiology, New York, p. 421-422, 1940.
7. Cuba CC, Alvarenga NJ, Barreto AC, Marsden PD, Chiari C. Nuevos estudios comparativos entre *Dipetalogaster maximus* y *Triatoma infestans* en el xenodiagnóstico de la infección chagásica crónica humana. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 20: 145-151, 1978.
8. Marsden PD, Cuba CC, Alvarenga NJ, Barreto AC. Report on a field collection of *Dipetalogaster maximus* (Hemiptera: Triatominae) (Uhler, 1894). Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 21: 202-206, 1979.
9. Melo RC. Distribuição de parasitas intracelulares em animais inoculados com diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*. Tese. Universidade Federal de Minas Gerais, 1977.
10. Ryckman RE, Ryckman AE. Epizootiology of *Trypanosoma cruzi* in Southwestern North American. Part X. The biosystematics of *Dipetalogaster maximus* in Mexico (Hemiptera: Reduviidae) (Kinetoplastida: Trypanosomidae). Journal of Medical Entomology 4: 180-188, 1967.
11. Silva LHP, Nussenzweig V. Sobre uma cepa do *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folia Clinica et Biologica (São Paulo) 20: 191-207, 1953.
12. Perlowagora-Szumlewicz A, Müller CA. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of host with Chagas' disease. 1. Comparatives xenodiagnosis with nine triatomine species of animals with acute infection by *Trypanosoma cruzi*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 77: 37-53, 1982.

13. Sher A, Snary D. Specific inhibition of the morphogenesis of *Trypanosoma cruzi* by a monoclonal antibody. *Nature* 300: 639-640, 1982.
14. Urdaneta-Morales S, Rueda IG. A comparative study of the behavior of Venezuelan and Brazilian strains of *Trypanosoma cruzi* in the Venezuelan invertebrate host (*Rhodnius prolixus*). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 19: 241-250, 1977.
15. Zeledón R. Los vectores de la enfermedad de Chagas en America. *Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas*, Buenos Aires, p. 327-345, 1972.