

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA EM CAMUNDONGOS (*Mus musculus*) E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE CEPAS DE *Trypanosoma cruzi* (KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE) ISOLADAS DE TRIATOMÍNEOS SELVÁTICOS DA REGIÃO AMAZÔNICA.

José Luciano Pontes SOUZA JÚNIOR¹; Paulo Edson Santos da SILVA²; Luanda de Paula FIGUEIRA³; Alexandra Priscilla TREGUE-COSTA³; José Ribamar ARAÚJO⁴; Maricleide de Farias NAIFF⁵.

¹Bolsista, PIBIC/CNPq/INPA; ²Técnico CPCS/ INPA; ³Pesquisador CPCS/ INPA; ⁴Pesquisador FMT-AM; ⁵Orientadora CPCS/ INPA.

1. Introdução

A Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é uma das maiores endemias da América Latina (Araújo-Jorge e de Castro, 2000). Sua epidemiologia está condicionada pelos vetores, os triatomíneos; pelo agente etiológico, *Trypanosoma cruzi* e pelos reservatórios silvestres e domésticos, os mamíferos. Fatores sociais associados aos fatores econômicos, tais como desenvolvimento industrial, crescimento populacional e a colonização de áreas rurais, que atuam diretamente no equilíbrio ecológico, proporcionam condições favoráveis para o estabelecimento da doença, já que são detectados inúmeros vetores e reservatórios naturalmente infectados em vastas extensões (Gonçalves, 2000). Classicamente admitem-se dois ciclos de transmissão: o ciclo doméstico (urbano e rural) que envolve o homem, animais sinantrópicos e domésticos, além de triatomíneos domiciliados; e o ciclo silvestre envolvendo mamíferos silvestres considerados reservatórios naturais e triatomíneos hospedeiros. Os triatomíneos pertencem a Ordem Hemiptera: Heteroptera, Família: Reduviidae, Sub-Família: Triatominae. Devido à similaridade de comportamento e fisiologia, todas as espécies de triatomíneos devem ser consideradas como potenciais vetores da doença de Chagas (Schofield, 1994). O *T. cruzi* é um protozoário flagelado, digenético, sendo um dos parasitos de maior e mais bem-sucedida distribuição na natureza, pois é encontrado parasitando um amplo espectro de mamíferos e os mais variados tecidos desses hospedeiros, além de possuir um ciclo de vida extremamente complexo, apresentando diversas variações morfológicas que se alternam entre dois tipos de hospedeiros: invertebrados (insetos triatomíneos) e vertebrados (mamíferos, incluindo o homem) (Araújo-Jorge e Castro, 2000). Há dois tipos de formas replicativas do parasito, os amastigotas, que se replicam no interior das células infectadas do hospedeiro mamífero, e os epimastigotas, que se replicam no interior do trato digestivo dos insetos vetores. Estas formas replicativas se transformam nas formas tripomastigotas infectivas, não-replicativas, que são encontradas no sangue dos mamíferos infectados (tripomastigotas sanguíneos) ou na porção posterior do trato digestivo dos insetos vetores triatomíneos (tripomastigotas metacíclicas) (Araújo-Jorge e Castro, 2000). Ao fazer o repasto sanguíneo no hospedeiro mamífero infectado, o inseto acaba adquirindo as formas tripomastigotas sanguíneas, que posteriormente evoluem para forma epimastigota, que em seguida no tubo digestivo do inseto se transformam na forma tripomastigota metacíclica. Logo após um novo repasto sanguíneo, o inseto libera dejeções contendo essa forma infectiva, as quais penetram no local da picada infectando o hospedeiro mamífero. Assim o *T. cruzi* invade o sistema mononuclear fagocítico e evoluem para a forma amastigota, que em seguida forçam a lise das células com a forma tripomastigota sanguínea (Neves, 2005). Para estudos sobre a inter-relação inseto-parasito, cepas isoladas de humanos, reservatórios naturais e/ou de triatomíneos são mantidas em laboratório em meio de cultura sofrendo passagens sucessivas. Diversos autores relatam que as passagens sucessivas de *T. cruzi* em laboratório produzem mudanças ou até mesmo perda da sua infectividade para seus hospedeiros (Mello *et al.*, 1979; Mello e Teixeira, 1984; Martinez *et al.*, 2003). A análise de isoenzimas (enzimas com mesma função, porém com estrutura e carga elétrica distinta) tem sido largamente empregada como complemento em análises morfológicas em estudos taxonômicos e de caracterização de *T. cruzi*, de cepas obtidas de diferentes hospedeiros e/ou de regiões geográficas, pois permite determinar o grau de similaridade entre organismos, sendo a metodologia empregada em estudos de relação fenética/genética. A subdivisão da espécie *T. cruzi* em três linhagens principais, tendo sido oficializada uma nomenclatura inicial de Zimodemas *T. cruzi* Z-I, correlacionado ao ciclo silvestre, e *T. cruzi* Z-II, *T. cruzi* Z-III, compreendendo cepas do ciclo doméstico da doença (Miles *et al.*, 1983).

Assim temos como objetivo identificar a ocorrência do parasitismo tecidual através de métodos histológicos; caracterizar através de técnicas bioquímicas, cepas *T. cruzi* isoladas de triatomíneos selváticos oriundas do município Rio Preto da Eva; criopreservar os respectivos isolados em nitrogênio líquido (- 196°C).

2. Material e métodos

Foram estudadas cepas de *T. cruzi* isoladas de triatomíneos selváticos, mantidas no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas da CPCS/INPA tendo sido coletadas no município de Rio Preto da Eva, Amazonas. Os isolados foram cultivados em meio bifásico NNN (Ágar-sangue), por passagens sucessivas e em animais de laboratório. Antes de cada repique foram feitas leituras no microscópio óptico, em lâminas e lamínulas, amostra da cultura com solução salina para observação da presença ou não dos parasitos nas formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Utilizamos camundongos jovens (entre 16 e 18 dias) da espécie *Mus musculus*, provenientes do Biotério do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Antes da inoculação os camundongos, registramos em fichas cadastrais individuais onde anotamos os seguintes dados: sexo, peso, idade e o tipo de marcação. As inoculações nos camundongos foram intraperitoneal. Obedecendo a um inóculo com 0,1 mL de cultura contendo parasitos na forma exponencial 10^6 de flagelados/ml de *T. cruzi*, sendo que um animal não sofreu inóculo para servir de controle. A preparação do inóculo foi feita com os parasitos que obtivemos das cepas mantidas em meio de cultivo NNN. Os parasitos foram quantificados através da contagem em câmara de Neubauer para obtenção da concentração estipulada. Para avaliação biológica, realizamos exame de sangue direto, através de punção da extremidade da cauda do animal, por sangue cultivado em meio de cultura NNN. Durante três dias que se seguiram às inoculações, iniciamos exames diários de sangue dos animais infectados, para observar a presença do parasito. Após a primeira detecção de tripomastigotas sanguíneas, os exames passaram a ser realizados em dias alternados com a contagem dos parasitos para seguir a evolução da parasitemia. A contagem dos parasitos foi feita em câmara de Neubauer. A parasitemia foi acompanhada durante 60 dias após as inoculações. O período de manutenção dos animais inoculados que sobreviveram à infecção ou nos quais não foram observados infectados por exame de sangue foi de 90 dias. Para os animais infectados, em conformidade com os óbitos, tiveram suas vísceras retiradas para avaliação do parasitismo tecidual. Coletou-se fragmentos do coração, fígado, baço, esôfago e cólon e incluídos em parafina e as seções de 5 μ m coradas pela hematoxilina-eosina e analisadas em microscópio óptico no laboratório de parasitologia e patologia da Universidade do Estado do Amazonas - UEA. Para caracterização bioquímica fez-se necessário à formação de massa parasitária que consiste em produzir uma grande quantidade de parasitos. Dessa forma, os estoques estabilizados "in vitro" foram expandidos em meio líquido LIT contendo 10% de Soro Fetal Bovino inativado (SFBi) e mantidos em estufa a 28°C. Após nove dias foi acrescido de mais meio LIT. Esse processo continuou até que se alcançou a quantidade desejada de parasitos. As amostras foram preparadas segundo protocolo padronizado por Momen (1984), seguindo com tripomastigotas da cultura estacionada que foram centrifugadas a 2500 Xg, por 15 minutos, na temperatura de 4°C. Retirado o sobrenadante, lavamos duas vezes com 1 mL de solução de NaCl 0,85% acrescida de 0,01M de EDTA (ácido etilenodiaminotetracíclico) pH 8.0 e centrifugadas na mesma condição. Desprezamos o sobrenadante, as amostras foram mantidas no nitrogênio líquido até sua utilização na corrida eletroforética, objetivando-se analisar a diversidade populacional de *T. cruzi*. Para estocar as massas parasitárias das quatro cepas e para caracterizar bioquimicamente as isoenzimas usou-se criopreservação em nitrogênio líquido. Na caracterização bioquímica, utilizamos cepas de referência de *T. cruzi* (Cepa Y e Colombiana) e seus perfis isoenzimáticos foram comparados com os das amostras isoladas. Utilizou-se seis sistemas enzimáticos: Glicose-6-fosfato Desidrogenase G6PDH (E.C.1.1.1.49), Glicose-6-Fosfato Isomerase GPI (E.C.5.3.1.9), Malato Desidrogenase MDH (E.C.1.1.1.37), 6-Fosfogluconato Desidrogenase 6PGDH (E.C.1.1.1.44), Fosfoglucomutase PGM (E.C.2.7.5.1) e Enzima Málica ME (E.C.1.1.1.40).

3. Resultados e discussão

- *Caracterização Biológica e Infecção em camundongos*- Os exames biológicos foram realizados em análise de lâminas de fezes dos 10 barbeiros da espécie *R. pictipes*, com observação da presença de parasitos. Esse material foi inoculado em camundongos e após cinco dias foi observada a presença de *Trypanosoma* sp. no sangue desses animais, além de alterações no comportamento dos animais, como pêlos eriçados, morbidez e baixa motilidade. Após 14 dias de infecção, os animais morreram o que pode indicar alta virulência da cepa isolada. Essa cepa foi registrada com a identificação IM-5451. Nas análises das fezes dos dois triatomíneos da espécie *R. robustus*, também foi observada a presença de parasitos. Após inoculação em camundongos foram observadas características comportamentais nos animais, semelhantes às aquelas apresentadas para os animais inoculados com a cepa 5451, porém o tempo para manifestação dos sintomas agudos e o tempo de sobrevivência foi superior. As cepas criopreservadas em freezer -80°C foram: IM--2731; IM- 3228; IM-3590; IM-3622; IM-3869; IM-4166; IM-4174; IM-4178; IM-4426; IM-5093 foram inoculadas em camundongos com inóculos de diferentes concentrações (10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6} parasitos /mL). Para todas as concentrações testadas, não foram observadas a presença de parasito, nem por meio de exame direto de sangue, pelo período de 90 dias, nem por xenodiagnóstico e cultura

de tecidos. Os métodos de avaliação da infectividade por tripanosomatídeos em animais de laboratório são bastante diversificados. Mello e Teixeira (1984) observaram a infectividade de *Leishmania donovani chagasi*, em uma espécie de roedor, de diferentes maneiras, relatando que na avaliação por análise de sangue não foram observados parasitos, mas que métodos mais acurados como o cultivo, mostraram resultados de positividade de até 67%.

- *Caracterização Bioquímica*- As cepas identificadas IM- 5451; IM-5480; IM-2731; IM- 3228; IM- 3590; IM-3622; IM-3869; IM-4166; IM-4174; IM-4178; IM-4426; IM-5093 foram expandidas em meio de cultura LIT e encontram-se criopreservadas em freezer - 80 °C, assim como as cepas de referência numeradas 1625, 5045, Y e Colombiana, fornecidas pelo Instituto Evandro Chagas (Belém - PA). Para a análise bioquímica foram utilizados seis sistemas enzimáticos: Glicose-6-fosfato Desidrogenase G6PDH (E.C.1.1.1.49), Glicose-6-Fosfato Isomerase GPI (E.C..5.3.1.9), Malato Desidrogenase MDH (E.C.1.1.1.37), 6-Fosfogluconato Desidrogenase 6PGDH(E.C.1.1.1.44), Fosfoglucomutase PGM (E.C.2.7.5.1) e Enzima Málica ME (E.C.1.1.1.40). A análise de isoenzimas demonstrou que as amostras testadas são *T. cruzi*. Sendo que a cepa IM-5093 ficou no zimodema a próxima a cepa Y e as cepas IM-4174, IM-4178 e IM-4426 foram agrupadas no zimodema b próximas a cepa colombiana.

- *Infecção em Rhodnius sp.*- Para estudos de curso da infecção em triatomíneos foram separados dois grupos de insetos, um contendo 14 ninfas de 1^o instar recém eclodidas da espécie *Rhodnius robustus* e outro com 14 ninfas de 1^o instar recém eclodidas da espécie *Rhodnius pictipes*. Esses insetos foram alimentados em camundongos infectados com a cepa IM-5451 e acompanhados do 1^o ao 4^o instar para se observar o curso da infecção ao longo do desenvolvimento dos insetos. A partir da primeira alimentação em camundongos infectados as alimentações seguintes ocorreram a cada 15 dias com utilização de camundongos limpos. A cada alimentação foi realizada lâmina de fezes de cada triatomíneo para observação da presença de *T. cruzi*. Nas lâminas de fezes de todos os triatomíneos observados, tanto da espécie *R. robustus* quanto da espécie *R. pictipes*, em todos os estágios de desenvolvimento foi observada a presença de *T. cruzi*. O que indica que uma vez infectado o inseto pode levar a infecção por todo o seu ciclo de desenvolvimento. Barreto & Albuquerque (1969) já destacavam que ninfas de triatomíneos uma vez infectadas levam a infecção por todo seu ciclo de vida. A cepa IM-5451 na primeira passagem para camundongos mostrou ter virulência maior que a da segunda passagem, fato que pode ser ocasionado ou pela perda da infectividade no decorrer do tempo ou por ter sido passada na segunda vez para *R. robustus*, uma vez que a cepa tem como origem *R. pictipes*. Diversos autores relatam que as passagens sucessivas de *T. cruzi* em laboratório produzem mudanças ou até mesmo perda da sua infectividade para seus hospedeiros (Mello *et al.*, 1979; Mello e Teixeira, 1984; Martinez *et al.*, 2003).

- *Análise Histopatológica*- No exame histopatológico através de fragmentos teciduais do coração, fígado, baço, esôfago, cólon e do cérebro dos animais infectados não foram evidenciados a presença de estruturas parasitárias, o que se sugere a aplicação de testes de imunohistoquímicos para a complementação das análises. Martins *et al.* (2003) destaca a importância das análises histopatológicas já que assim podemos observar diferenças comportamentais tanto biológicas como clínicas estejam relacionadas à heterogeneidade das subpopulações das cepas de *T. cruzi* observadas no estudo dos clones.

4. Conclusão

O projeto apresentou contribuição significativa, pois esses estudos mostraram a necessidade de se intensificar as atividades com relação a coletas e estudos biológicos relativos à Doença de Chagas na região de Rio Preto da Eva, Amazonas. A intensificação dos trabalhos nessa região pode contribuir com medidas preventivas no controle da Doença, já que os triatomíneos foram coletados em uma área na entrada da cidade e se apresentaram infectados por *T. cruzi* com cepas de alta virulência. Exames Complementares, tais como cultura de tecidos a partir de necropsia dos animais infectados assim como testes imunohistoquímicos destes tecidos, serão necessários para obtenção de maior acurácia dos estudos.

5. Referências

Araújo-Jorge, T. C.; Castro, S. L. 2000. Doença de Chagas. Manual para experimentação animal. Rio de Janeiro. Editora FIOCRUZ / Instituto Oswaldo Cruz. 368 p.

Barreto, M. P. ; Albuquerque, R.D.R. 1969. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXXIII - Infecção Experimental e Natural do *Psamolestes tertius* Lent & Jurberg, 1965 pelo *T. cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 11(3): 165-168.

- Gonçalves, T.C.M. 2000. Aspectos ecológicos de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera: Reduviidae), com caracterização das amostras de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Tripanosomatidae) isoladas deste triatomíneo, no município de Santa Maria Madalena, Estado do Rio de Janeiro. FIOCRUZ/RJ. Teses de Doutorado. 125p.
- Martinez, E.M.; Neves, R.H.; Oliveira, R.M.F.; Machado-Silva, J.R. & Rey, J. 2003. Características biológicas e morfológicas de cepas brasileiras de *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36(5): 557-564.
- Martins, L.P.A.; Castanho, R.E.P.; Rosa, J.A.; Silva, L.C.; Godoy, C.A.P.; Rosa, R.M. 2003. Caracterização biológica, histopatológica e análise de ácido nucléico de uma cepa *Trypanosoma cruzi* da região de Marília, SP. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 36(1):35-39.
- Mello, D.A., Valin, E. & Teixeira, M.L. 1979. Alguns aspectos do comportamento de cepas silvestres de *Trypanosoma cruzi* em camundongos e *Calomys Callosus* (Rodentia). *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, 13:314-25.
- Mello, D.A.; Teixeira, M.L. 1984. Infecção experimental de *Calomys callosus* (Rodentia-Cricetidae) com *Leishmania donovani chagasi* (Laison, 1982). *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, 18:337-41.
- Miles, MA., Pova, MM., de Souza, AA., Lainson, R., Shaw, JJ. 1983. Some methods for the enzyme characterization of Latin-American *Leishmania*, with particular reference to *Leishmania mexicana amazonensis* and subspecies of *Leishmania hertigi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 74: 243-252.
- Momen, H. Parasite characterization by zymodeme analysis. In: Morel C.M. (ed.). *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual*. Rio de Janeiro, UNDP/World Bank/WHO-FINEP-CNPq-FIOCRUZ, p.111-120, 1984.
- Neves, D. F. 2005 *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: Lana, M. de; Tafuri, W. L. *Parasitologia Humana*. Vol. único. Ed. Atheneu. p. 85-108.
- Schofield, C.J. 2004. Apparent distribution of Triatominae in the Amazon Region. In: Guhl, F. & Schofield, C.J. 2004. Proceedings of the ECLAT-AMCHA International Workshop on Chagas disease surveillance in the Amazon Region, Palmari, Brazil. Universidad de Los Andes, Bogotá. 174pp.