

COMPORTAMENTO DA CEPA AVIRULENTA PF DO *TRYPANOSOMA* *CRUZI* NO HOSPEDEIRO INVERTEBRADO

J. C. Monteiro SANTOS (1)

RESUMO

A cepa PF do *Trypanosoma cruzi*, avirulenta para animais de laboratório, foi estudada em 110 ninfas do *R. prolixus*, através da técnica do xenodiagnóstico artificial.

Como contróle, 70 ninfas de reduvídeos da mesma espécie, foram alimentadas com sangue de ratos normais contendo a cepa Y virulenta do *T. cruzi*.

Maciça inoculação de camundongos jovens demonstra a incapacidade de infectar da primeira e o poder infetante da última, com alto grau de parasitemia e mortalidade entre os animais inoculados.

INTRODUÇÃO

A cepa Y, isolada por SILVA & NUSSENZWEIG¹⁹ de uma paciente japonesa, estudada por PEDREIRA DE FREITAS & col.⁴, após ter sido trazida por êste último para a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da USP, foi mantida no Departamento de Parasitologia através de passagens sucessivas, de camundongos a camundongos, e no meio artificial de cultivo de PACKCHANIAN¹³, durante 16 anos.

MENEZES^{5, 6, 7, 8, 9}, através de vários trabalhos, tem demonstrado que a cepa Y cultivada se tornou avirulenta para diversos hospedeiros vertebrados, do *T. cruzi*.

Para complementar os trabalhos dêste Autor, resolvemos estudar o comportamento da referida cepa, no hospedeiro invertebrado, com passagem subsequente em camundongos jovens.

MATERIAL E MÉTODOS

a) Cepa PF (MENEZES¹⁰) — mantida durante 16 anos por repiques sucessivos, cada 20 dias, no meio difásico de Packchanian.

Esta cepa foi transferida para o meio de Nöller. Após o 15.º repique neste meio, feito de 8 em 8 dias, os tripanosomas foram separados por centrifugação, lavados e suspensos em sangue heparinizado de rato normal.

b) Cepa Y — forma virulenta do *T. cruzi*, mantida em camundongos. Os tripanosomas foram obtidos através de punção cardíaca de camundongos no 8.º dia de infecção e levados para cultivo no meio líquido de Nöller.

Após o 15.º repique os flagelados foram recolhidos, lavados e centrifugados e o sedimento suspenso em sangue heparinizado de rato normal.

Com o material constituído por a e b fêz-se o xenodiagnóstico artificial, segundo a técnica descrita por NUSSENZWEIG & SONNTAG¹².

c) Triatomídeos — 180 ninfas de *R. prolixus*, utilizados no xenodiagnóstico artificial, foram divididos em dois grupos designados grupo avirulento (AV) e grupo virulento (V) constituídos respectivamente, de 110 e 70 reduvídeos.

Trabalho realizado no Departamento de Patologia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

(1) Estagiário do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da USP (Prof. Fritz Köberle)

O grupo AV através de xenodiagnóstico artificial sugou sangue heparinizado de rato normal contendo as formas avirulentas do *T. cruzi* (a).

O grupo V, pela mesma técnica se alimentou de sangue contendo as formas virulentas do *T. cruzi* (b). Este grupo foi utilizado como contrôlo.

O grupo AV foi dividido em dois subgrupos:

AV₁ — com 20 triatomídeos, dos quais 3 foram examinados no 10.º dia após o repasto e 17 no 15.º dia.

AV₂ — com 90 “barbeiros”. Dêste grupo 60 ninfas foram submetidas a exames no 20.º dia e 30 no 30.º dia, após terem sido alimentadas.

A mesma divisão foi feita para o Grupo V constituindo os subgrupos:

V₁ — possuindo 30 triatomídeos. Dêstes, 5 foram sacrificados no 10.º dia após terem sugado sangue com as formas virulentas do *T. cruzi*. Os 25 reduvídeos restantes foram examinados no 15.º dia.

V₂ — formado por 40 ninfas das quais 25 foram examinadas no 20.º dia do xeno artificial e 15 no 30.º dia.

Todos os triatomídeos (grupo AV e grupo V) foram examinados segundo a técnica habitual de xenodiagnóstico e a seguinte nomenclatura foi adotada para quantificar o parasitismo intestinal dos mesmos:

- ± menos de 5 flagelados em tôda extensão da lamínula (22 mm x 22 mm)
- 1+ de 5 a 16 parasitas em 100 campos microscópicos (oc. 10 x obj. 40 x)
- 2+ de 30 a 100 parasitas em 100 campos
- 3+ de 2 a 4 parasitas por campo
- 4+ mais de 4 até 5 por campo
- 5+ mais de 5 até 6 por campo
- 6+ mais de 6 por campo

d) Camundongos — Os flagelados encontrados nos intestinos dos triatomídeos, na época dos exames, foram inoculados em 85 camundongos jovens (15 dias), machos, provenientes de uma mesma linhagem mantida há vários anos no biotério da FMRPUSP.

Os camundongos foram separados em dois grupos. O primeiro, com 56 camundongos, foi denominado C_a. Estes camundongos receberam, por inoculação, os flagelados provenientes dos triatomídeos o grupo AV. Conseqüentemente foram divididos em quatro subgrupos — C_a⁰ (6 camun.), C_a¹ (17 camun.), C_a² (18 camun.) e C_a³ (15 camun.) que receberam, respectivamente flagelados colhidos no 10.º, 15.º, 20.º e 30.º dia do xeno artificial.

O segundo grupo de camundongos, formado por 29 animais, recebeu a denominação genérica de C_v. Tendo sido inoculado com *T. cruzi* proveniente dos intestinos dos triatomídeos do grupo V, foram subdivididos em 3 grupos: C_v⁰ (6 camun.), C_v¹ (10 camun.) e C_v² (13 camun.) e receberam parasitas colhidos no 10.º, 15.º e 20.º dia respectivamente.

Todos os camundongos (Grupo C_a e C_v) foram submetidos a exames parasitêmicos pela técnica de PIZZI & BRENER¹, no 8.º dia da inoculação.

e) Inóculo — O macerado visceral dos triatomídeos, após a avaliação do número de flagelados contido, foi suspenso em solução salina e 0,2 ml, desta, injetada, via peritoneal a cada um dos camundongos dos subgrupos correspondentes. O volume de solução, no qual era suspenso o macerado visceral dos “barbeiros”, sempre variou de acôrdo com o número de flagelado avaliado, de tal modo que os camundongos receberam relativamente o mesmo número de parasitas.

RESULTADOS

O xenodiagnóstico do grupo AV apresentou valores de 6+, 1+, 1+ e ± para os exames feitos no 10.º, 15.º, 20.º e 30.º dia respectivamente (Tabela I). O xenodiagnóstico do Grupo V apresentou valores de 6+, 3+, 3+ e 5+ para os exames efetuados no 10.º, 15.º, 20.º e 30.º dia, respectivamente (Tabela I). Estes dados estão coligidos no Gráfico 1.

Todos os camundongos do grupo C_a tiveram parasitemias negativas e um percentual de 5,3% de mortalidade, até o 20.º dia, após a infecção. Todos os camundongos do grupo C_v tiveram exames parasitêmicos positi-

T A B E L A I

Resultados do xenodiagnóstico artificial e exames parasitêmicos no 8.º dia da inoculação

Aves e os xodops Cepas	Número de Ninfas (n) e parasitismo infestinal após xeno-artificial				Grupos de camundongos e parasitemia 8 dias após inoculação				camund.
	10º dia	15º dia	20º dia	30º dia	C	C ¹	C ²	C ³	Grupos
Cepa Y vir. 70 (n)	5n 6	25n 3	25n 3	15n 5	C _v (6) 2,4 x 10 ⁵ Tc/ml	C _v ¹ (10) 6,9 x 10 ⁵ Tc/ml	C _v ² (13) 7 x 10 ⁵ Tc/ml	(0)	C _v (29)
Cepa Y Avir. PF 110 (n)	3n 6+	17n 1+	60n 1+	30n ±	C _a (6) —	C _a ¹ (17) —	C _a ² (18) —	C _a ³ (15) —	C _a (56)
Total 180 n	8 n	42 n	85 n	45 n	12 c	27 c	31 c	15 c	Total 85 c

n = ninfa, c = camundongo

vos com resultados de $2,5 \times 10^5$, tripanosomas por ml, $6,9 \times 10^5$ tripanosomas por ml e 7×10^5 tripanosomas por ml em média, para os subgrupos C_v⁰, C_v¹, C_v², respectivamente. No grupo C_v a mortalidade atingiu o valor de 78,2%, até o 20.º dia da infecção.

DISCUSSÃO

A cepa Y do *Trypanosoma cruzi* tem sido amplamente estudada por diversos Autores^{3, 14, 15, 16, 19}, desde que foi isolada de um caso agudo humano estudado por PEDREIRA DE FREITAS & col.⁴.

Parece contudo que coube a MENEZES^{5, 9} demonstrar a avirulência dessa cepa, mantida em cultura por longo tempo. A esta variante, que se supõe tratar de um mutante da cepa primitiva, êste Autor sugeriu a denominação PF (MENEZES¹⁰) em homenagem a Pedreira de Freitas, que estudou a paciente de quem se isolou o parasita.

Sabe-se que o *T. cruzi* tem sua virulência atenuada quando cultivado em meio artificial.

PIZZI & PRAGER¹⁴, em 1952, parecem ter sido os primeiros a demonstrar que as formas de cultivo protegiam camundongos contra uma posterior infecção virulenta.

Porém a cepa Tulahuen utilizada por êstes Autores chilenos, mostrou-se capaz de retomar sua virulência primitiva, uma vez que o mamífero infetado com ela, recebesse, simultaneamente, altas doses de corticóides (RUBIO¹⁶), e o que não acontece com a cepa PF estudada por MENEZES⁸.

O comportamento de tripanosomas quanto à virulência após a passagem em hospedeiros invertebrados foi observado por vários Autores.

SCHILLING¹⁸ verificou que a virulência exarcebada do *T. cruzi* por passagem sucessivas em camundongos, revertia ao nível inicial, por uma simples passagem no seu vector.

RÊGO & GRANHAM¹⁵ fizeram *T. infestans* sugar camundongos infetados com *T. cruzi*, cepa Y. Os flagelados colhidos do intestino posterior dos triatomídeos foram inoculados em camundongos jovens que “desenvolveram

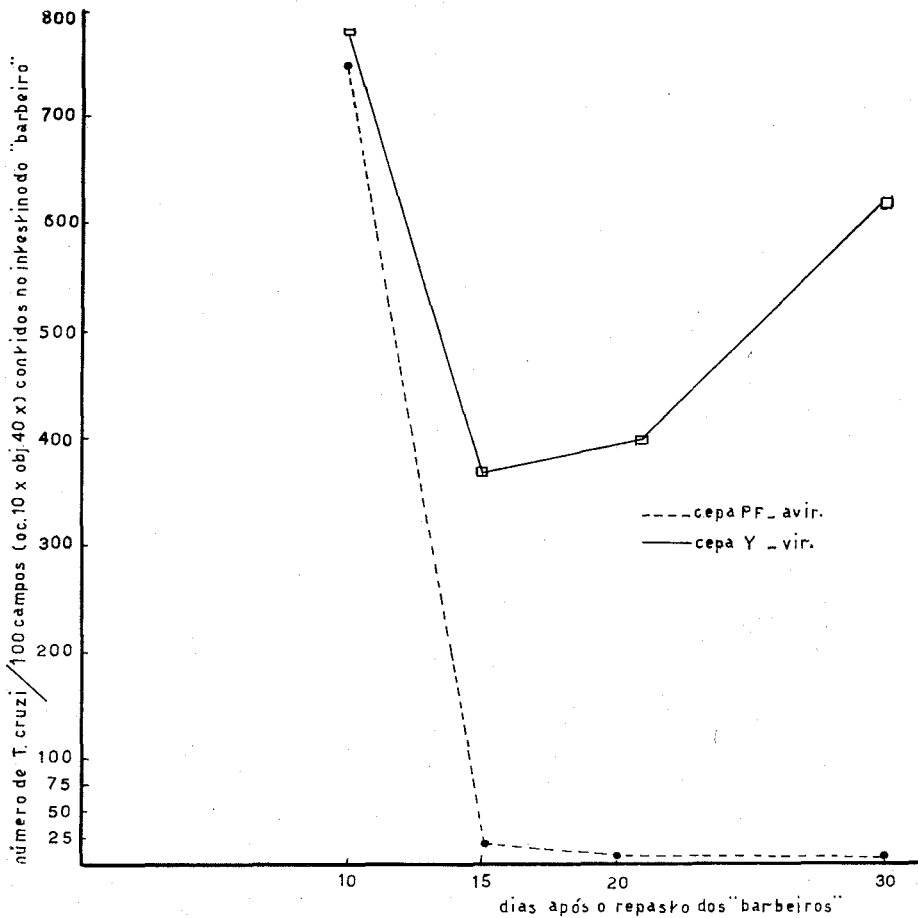


Gráfico 1

uma leve infecção com nenhuma invasão óbvia de órgãos. Subseqüentes passagens em camundongos jovens mostraram o mesmo tipo suave de infecção”.

CARVALHEIRO & COLLARES³ não confirmaram estas observações quanto à parasitemia, verificando porém diminuição do acentuado viscerotropismo, peculiar a cepa Y mantida em camundongos, após ter sido esta passada no hospedeiro invertebrado. Isto talvez se deva ao fato de que, como já foi observado por BRUMPT², os “triplanosomas metacíclicos dos invertebrados não possuem a mesma propriedade infetante dos triplanosomas sanguíneos”.

Em nosso experimento, dos 29 camundongos (grupo C_v) que foram inoculados com

triplanosomas colhidos dos triatomídeos do grupo V, i.e., que sugaram sangue contendo as formas virulentas do *T. cruzi*, 78,2% morreram dentro dos 20 dias que se seguiram à inoculação.

A parasitemia média no 8.º dia foi de $5,5 \times 10^5$ triplanosomas por ml de sangue.

Tanto a mortalidade quanto o nível parasitêmico desses animais pouco diferem do que se verifica em animais da mesma idade, inoculados com a cepa Y de *T. cruzi* mantida em camundongos.

Considera-se ainda que a amostra da cepa Y com a qual chegamos aos resultados acima, provém do 15.º repique em meio artificial que sabidamente modifica a virulência do *Trypanosoma cruzi*.

Nos 56 animais que constituíam os grupos C_a, isto é, que foram inoculados com parasitas colhidos do intestino dos triatomídeos do grupo AV, alimentados com sangue contendo tripanosomas da cepa PF, a parasitemia foi sempre negativa e o percentual de mortalidade de apenas 5,3%. Esta, diante dos exames negativos, foi considerada como devida a outras causas que não à parasitose.

Concluimos que a passagem, através de um de seus vectores não foi capaz de estabelecer a virulência, para camundongos, da cepa PF. Os tripanosomas avirulentos (cepa PF), sugados pelos reduvídeos parecem ter perdido a capacidade de se reproduzir no hospedeiro invertebrado, uma vez que seu número vai decrescendo com o passar do tempo, enquanto aquêles virulentos (cepa Y) do grupo controle tem seu número aumentado a partir do 15.º dia (Gráfico 1).

Êstes dados nos parecem de grande importância quando se cogita uma aplicação prática da "vacina" estudada por Menezes.

S U M M A R Y

The behaviour of the avirulent PF strain of Trypanosoma cruzi in the invertebrate host

The PF avirulent strain of *T. cruzi* was studied in 110 *Rhodnius prolixus*, through artificial xenodiagnosis.

As controls 70 reduviid bugs of the same species were fed on normal rat blood with the virulent Y strain of *T. cruzi*. As shown in Graph I, the number of parasites in the hind gut of the bugs decreases progressively in the PF avirulent strain and increases in the Y virulent one. Several inoculations in baby mice demonstrate the uninfectivity of the first and the infective power of the latter, with high parasitemia and mortality rate among the inoculated animals.

A G R A D E C I M E N T O S

Ao Prof. Humberto Menezes, pela orientação no desenvolvimento dêste trabalho e ao técnico Hélio R. Rocha, por sua colaboração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRENER, Z. — *Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas*. Tese Docência-Livre. Belo Horizonte, Fac. Farm. e Odont. Universidade de Minas Gerais, 1961.
2. BRUMPT, E. — Immunité partielle dans les infections à *Trypanosoma cruzi*, transmission de ce trypanosoma par *Cimex rotundatus*: rôle régulateur des hôtes intermédiaires; passage à travers la peau. *Bull. Path. Exot.* 6:172-176, 1913.
3. CARVALHEIRO, J. R. & COLLARES, E. F. — Estudos sobre o comportamento, em camundongos de uma amostra altamente virulenta de "*Trypanosoma cruzi*" (amostra Y), após passagens em triatomídeos, ratos e culturas. *Rev. Brasil. Biol.* 25:169-175, 1965.
4. FREITAS, J. L. P.; LION, N. F. & TARTARI, J. T. A. — Resultados de uma investigação sobre a moléstia de Chagas realizada no Município de Marília e outros, com estudo clínico de dois casos agudos da doença. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. Univ. São Paulo* 8:81-92, 1953.
5. MENEZES, H. — Protective effect of an avirulent (cultivated) strain of *Trypanosoma cruzi*, against experimental infection in mice. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 10:1-4, 1968.
6. MENEZES, H. — Active immunization of dogs with a nonvirulent strain of *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 11:258-263, 1969.
7. MENEZES, H. — Active immunization of mice with avirulent Y strain of *T. cruzi* against heterologous virulent strain of the same parasite. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 11:335-342, 1969.
8. MENEZES, H. — I — The avirulence of the cultivated Y — Strain of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 12:64-68, 1970.
9. MENEZES, H. — II — The avirulence of the cultivated Y strain of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 12:129-135, 1970.
10. MENEZES, H. & ALBUQUERQUE, R. D. R. — Imunização de camundongos com "vacina" viva, avirulenta de *T. cruzi*. III — Variação do meio de cultura. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* (No prelo).
11. NÖLLER, W. — Blut und Insektenflagellaten Züchtung auf Platten. *Arch. Schiffs. u. Tropen. Hyg.* 21:53-94, 1917.

12. NUSSENZWEIG, V. & SONNTAG, R. — Xenodiagnóstico artificial. Novo processo — Primeiros resultados positivos. *Rev. Paul. Med.* 40:41-43, 1952.
13. PACKCHANIAN, A. — On the cultivation of seven species of *Trypanosomas in vitro*. *Science* 80:407-408, 1934.
14. PIZZI, T. & PRAGER, R. — Inmunidad a la sobre infección indusida mediante cultivos de *T. cruzi* de virulencia atenuada. *Bol. Int. Parasit. (Chilena)* 7:20-21, 1952.
15. RÊGO, S. M. — Estudos das lesões provocadas pelo *T. cruzi* Chagas 1909, no baço e no figado do camundongo branco ("*Mus musculus*") com diversos graus de resistência. *J. Brasil. Med.* 5:599-674, 1959.
16. RÊGO, S. M. & GRANHAM, P. C. C. — The "Y" strain of *Trypanosoma cruzi*; Leishmanial development in the spleen of mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.* 50:299-300, 1956.
17. RUBIO, M. — Estudio de los factores que intervienen la virulencia de una cepa de *T. cruzi* — Acción de la Cortisona en la capacidad de invasión y multiplicación del parasito. *Biologica* 20:89-114, 1955.
18. SCHILLING, G. — Spontaneous and experimental infection. *J. Trop. Med. & Hyg.* 33:334-336, 1930.
19. SILVA, L. H. P. & NUSSENZWEIG, B. — Sobre uma cepa *T. cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol. (São Paulo)* 20:191-208, 1953.

Recebido para publicação em 3/4/1970.