

OBSERVAÇÕES SOBRE O COMPORTAMENTO, NOS HOSPEDEIROS VERTEBRADO E INVERTEBRADO, DE DIFERENTES CULTURAS DO *TRYPANOSOMA CRUZI*

E. CHIARI (1), W. L. TAFURI (2), N. J. ALVARENGA (3)
e S. J. SOARES (2)

RESUMO

Tripomastigotos metacíclicos das culturas "PF", "PFII" e "MR₄₄" do *Trypanosoma cruzi* foram inoculados em camundongos e estes, 30 dias após, submetidos a xenodiagnóstico. Os tripomastigotos obtidos nas fezes dos triatomíneos infetados foram inoculados em camundongos normais. Após 30 dias retirou-se o sangue destes animais para hemocultura em meio "LIT", sendo, a seguir, os mesmos sacrificados para exame anátomo-patológico. As hemoculturas foram positivas o *T. cruzi* nos três grupos de animais inoculados com fezes de triatomíneos. Somente no animal inoculado com parasitos da cultura "PF", em que a hemocultura resultara positiva, foram encontrados pseudocistos de amastigotos com inflamação focal, especialmente na musculatura lisa, cardíaca e estriada esquelética. Nos animais inoculados com os tripomastigotos das culturas "PFII" e "MR₄₄" a pesquisa de amastigotos, era negativa e, no entanto, havia inflamação crônica focal na musculatura lisa do intestino e na musculatura estriada esquelética. Uma única passagem dos parasitos pelo vector, seguida de inoculação em vertebrado, mostrou uma infecção patente. Com base nestes resultados, considera-se que, no momento atual, é desaconselhável o uso de "Vacinas Vivas" em seres humanos, mesmo de culturas consideradas atenuadas.

INTRODUÇÃO

O *T. cruzi* da cultura PF (MENEZES⁵) é considerado avirulento para o vertebrado. SANTOS¹² também demonstrou, no invertebrado, que os tripomastigotos metacíclicos da mesma cultura perderam a capacidade infetante para vertebrados CHIARI⁴, todavia, verificou que 50% dos animais inoculados se infetavam com os tripomastigotos metacíclicos da cultura PF.

Com a finalidade de obter um melhor conhecimento sobre a infectividade das chamadas culturas "avirulentas" ou "atenuadas" resolvemos estender nossas observações, comparando o comportamento das culturas PF, PFII e MR₄₄, nos hospedeiros vertebrado e invertebrado.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas no presente trabalho as seguintes amostras: Y, isoladas de um caso humano por SILVA & NUSSENZWEIG¹⁴ e MR obtida de triatomíneo naturalmente infetado, isolada por BRENER & CHIARI⁴.

Culturas de *T. cruzi* (amostra Y):

- a) Cultura PF, mantida por cerca de 16 anos por passagens sucessivas em meio de Packchanian e utilizada por MENEZES^{5, 6, 7, 8} numa série de trabalhos. Mantida sucessivamente em nosso laboratório, por cerca de 1,5 ano em meio LIT, ("liver infusion tryptose") (CARMARCO²).

(1) Departamento de Zoologia e Parasitologia. ICB — UFMG — Caixa Postal 2486 — 30.000 — Belo Horizonte — Brasil

(2) Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, UFMG.

(3) Laboratório de Parasitologia — Departamento de Biologia Animal — IB — UnB. — Brasília DF, Brasil

- b) Cultura PF^{II} re-isolada, por hemocultura em meio LIT, de animais inoculados com a cultura PF (CHIARI⁴).
- c) Cultura MR₄₄ isolada a partir de sangue de camundongos inoculados com a amostra MR, com 44 passagens quinzenais sucessivas em meio LIT durante 2 anos (CHIARI⁴).

INOCULAÇÃO EM CAMUNDONGOS

Nas culturas acima citadas, após 11 dias de crescimento em meio LIT procedeu-se à contagem em câmara de Neubauer e à determinação da percentagem de tripomastigotos metacíclicos em esfregaços corados pelo Giemsa, contando-se, aproximadamente 1000 formas.

Os inóculos foram ajustados para $2,5 \times 10^6$ tripomastigotos metacíclicos por camundongo, macho, com 14-16 g, usando-se a via intraperitoneal.

XENODIAGNÓSTICO

Trinta dias após a inoculação, nesses animais foi feito o xenodiagnóstico após prévia anestesia com Tionembutal (0,83 mg/animal). Para cada animal foram utilizadas ninfas (4.º e 5.º estádios) de *Triatoma infestans* depois conservadas em câmara úmida, à temperatura média de 26°C.

EXAME DOS TRIATOMÍNEOS E INOCULAÇÃO EM CAMUNDONGOS

Trinta dias após a refeição infetante obtiveram-se, dos insetos, por compressão, as fezes que eram examinadas ao microscópio, sob aumento médio. O material, contendo epimastigotos e tripomastigotos metacíclicos, foi inoculado (via intraperitoneal) em 3 grupos de camundongos normais, machos, com 14-16 g de peso.

EXAME DOS ANIMAIS

Trinta dias depois, após prévia anestesia, foi colhido sangue para hemocultura em meio LIT. Sucessivamente, os animais eram sacrificados e fixados em formol a 10%, sendo feito o exame anátomo-patológico nos pulmões, fígado, intestinos delgado e grosso, cérebro, cerebelo, medula espinhal, testículo, baço,

pâncreas, rim, coração, musculatura esquelética, língua e pele.

RESULTADOS

Os resultados do xenodiagnóstico constam da Tabela I, que mostra diferentes proporções das três culturas (PF, PF^{II}, MR₄₄) que apresentaram exames positivos para o *T. cruzi*.

TABELA I

Resultados do xenodiagnóstico 30 dias após o repasto sanguíneo em camundongos inoculados com $2,5 \times 10^6$ tripomastigotos metacíclicos das culturas PF, PF^{II}, MR₄₄

Culturas	Número de Triatomíneos alimentados/número de Triatomíneos positivos para o <i>T. cruzi</i>
PF	25/8
PF ^{II}	20/1
MR ₄₄	10/1

As hemoculturas foram positivas nos três grupos de animais inoculados com tripomastigotos metacíclicos de fezes dos triatomíneos (Tabela II).

TABELA II

Resultados da inoculação de tripomastigotos metacíclicos de fezes de Triatomíneos que se alimentaram em camundongos previamente inoculados com *T. cruzi* das culturas PF, PF^{II} e MR₄₄

Culturas	Camundongo N.º	Hemocultura
PF	1	—
PF	2	+
PF	3	—
PF	4	encontrado morto
PF ^{II}	5	+
PF ^{II}	6	+
MR ₄₄	7	+
MR ₄₄	8	encontrado morto

Os resultados dos exames anátomo-patológicos foram os seguintes:

CULTURA "PF" — Em geral, as lesões eram muito discretas. De todos os órgãos examinados, apenas no intestino e na mus-

culatura esquelética havia miosite crônica focal com exsudato linfo-plasmo-histiocitário. Em dois cortes de intestino delgado foram encontrados ninhos de amastigotos ora com reação inflamatória em torno, ora sem reação inflamatória (Fig. 1).

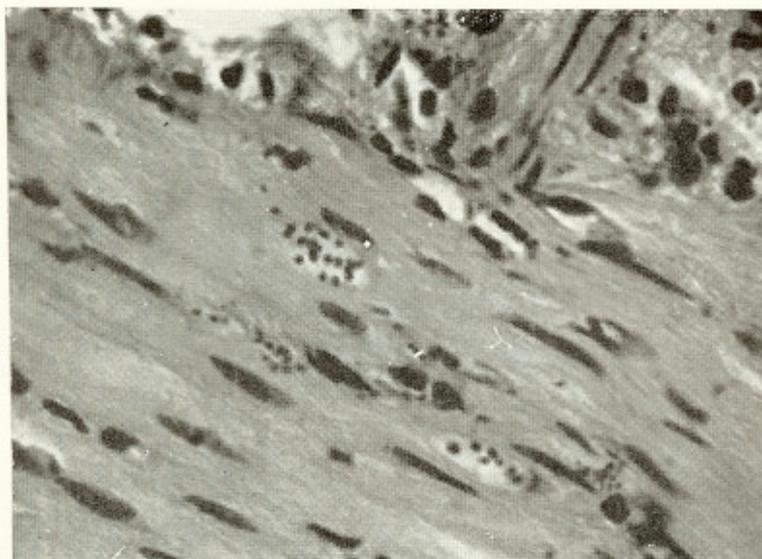


Fig. 1 — Cultura PF — Intestino delgado do camundongo n.º 2 com hemocultura positiva. Vários ninhos de amastigotos na espessura das células musculares lisas, sem reação inflamatória em torno (320 x)

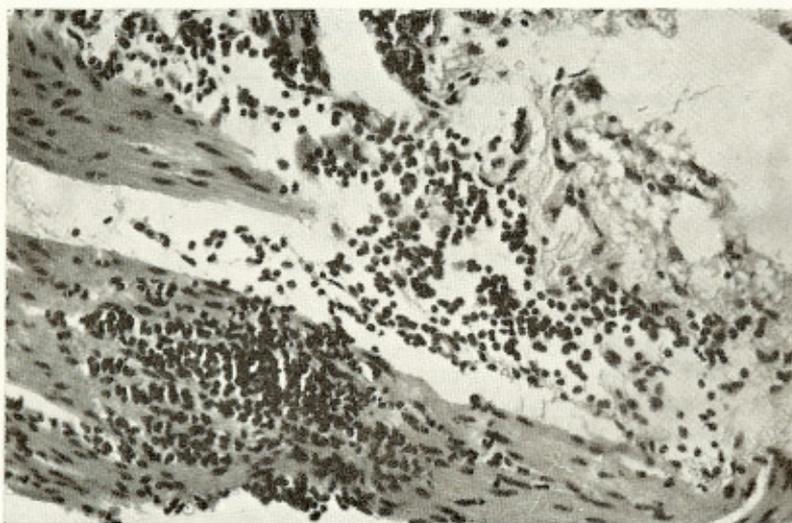


Fig. 2 — Cultura PF^{II}. Intestino grosso do camundongo n.º 5, com hemocultura positiva. Intensa miosite focal, com exsudação predominantemente linfo-plasmo-histiocitária (160 x)

CULTURA "PF^{II}" — Miosite crônica em focos na parede do intestino delgado e grosso e na musculatura estriada esquelética (Fig. 2) — Negativa a pesquisa de amastigotos. Nos demais órgãos, o aspecto histológico era normal.

CULTURA "MR₁₄" — Miocardite crônica focal com exsudação linfo-plasmo-histiocitária. Miosite crônica focal no intestino (Fig. 3) e músculos esqueléticos, mais intensa nos últimos. Em todos os órgãos foi negativa a pesquisa de ninhos de amastigotos.

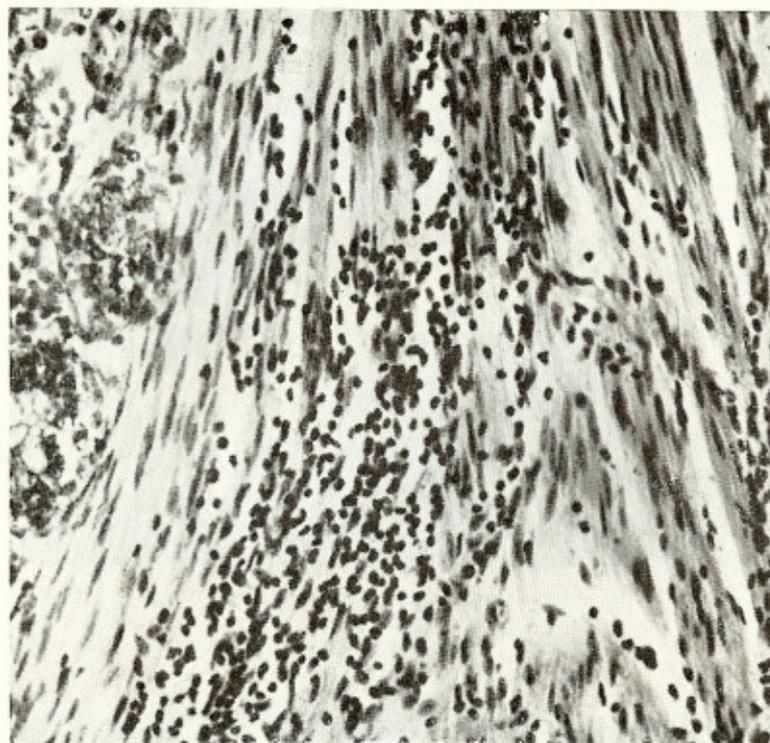


Fig. 3 — Cultura MR₁₄. Intestino grosso do camundongo n.º 8, com hemocultura positiva. Miosite crônica focal com exsudato linfo-plasmo-histiocitário (160 ×)

DISCUSSÃO

O trabalho de SCHILING¹³ demonstrou que a virulência do *T. cruzi*, aumentada por passagens sucessivas em camundongos, era revertida ao nível inicial após única passagem pelo vector. RÊGO & GARHAM¹¹ confirmaram os resultados de SCHILING¹³ na amostra Y (SILVA & NUSSENZWEIG¹⁴). CARVALHEIRO & COLLARES⁵, utilizando também a amostra Y, observaram que a passagem única por *T. infestans* não alterava de modo fundamental a agressividade para camundongos da forma sanguínea que continuou a produzir infecções graves, alta parasitemia e elevada taxa

de mortalidade. Contudo, tinha ocorrido redução acentuada do viscerotropismo, principalmente do reticulotropismo.

PHILIPS¹⁰ confirmou as observações de RÊGO & GARHAM¹¹, de que a subcultura obtida de fezes de triatomídeos provoca infecções esparsas, e que a infecção permaneceu crônica e, aparentemente, benigna. Por passagens seriadas em camundongos recém-nascidos, o Autor conseguiu reativar a virulência da amostra Y, e sugeriu que a patogenicidade desta amostra se relaciona com sua dispersão e intensa multiplicação dos parasitos.

MENEZES^{5, 6, 7, 8} repetidamente assinalou a avirulência de uma cultura da amostra Y, que denominou de PF. Recentemente, SANTOS¹² concluiu que a passagem da cultura PF através de vectores não foi capaz de restabelecer a virulência para camundongos. Mostrou, ainda, que os "tripanosomas" avirulentos da cultura PF, sugados pelos triatomíneos por xenodiagnóstico artificial, parecem ter perdido a capacidade de se reproduzir no hospedeiro invertebrado. Analisando estes resultados, julgamos conveniente utilizar o xenodiagnóstico convencional a fim de verificar possíveis diferenças no comportamento das culturas PF, PF^{II} e MR₄₄ em condições mais naturais.

Nos camundongos inoculados com as culturas PF, PF^{II} e MR₄₄ foi feito o xenodiagnóstico. Após 30 dias, os triatomíneos mostraram flagelados nas fezes em proporções de 32%, 5% e 10%, respectivamente para PF, PF^{II} e MR₄₄. A cultura obtida a partir das fezes dos triatomíneos, inoculadas em novos animais, comprovou, pela hemocultura em LIT e os exames anátomo-patológicos, a presença de amastigotos (PF) (Fig. 1) e de focos inflamatórios (PF^{II} e MR₄₄) (Figs. 2 e 3).

Este conjunto de observações nos permite concluir que a discordância de nossos resultados com os de SANTOS¹² se deve provavelmente ao fato de que procuramos reproduzir as diferentes etapas do ciclo evolutivo do *T. cruzi* em condições naturais, isto é, fazendo com que os triatomíneos sugassem as formas sanguíneas e não as formas de cultura.

Feitas embora as ressalvas às extrapolações de resultados de um gênero animal para outro, os nossos resultados, a nosso modo de ver, desaconselhariam no momento atual a utilização de amostras de *T. cruzi* ditas atenuadas como vacinas vivas na imunoprofilaxia da doença de Chagas, como a usada por MENEZES⁸. Por outro lado, é lógico imaginar em consequência de nossos resultados, indivíduos "vacinação" poderão contribuir para o aumento da população chagásica, tanto porque eles mesmos se tornam infetados, quanto porque a população "vacinação" pode funcionar como fonte de infecção para os triatomíneos.

SUMMARY

Observation on the behaviour in vertebrate and invertebrate hosts of different cultures of Trypanosoma cruzi

The "PF", "PF^{II}" and "MR₄₄" cultures of *T. cruzi* were inoculated in normal albino mice; 30 days later these animals were submitted to xenodiagnosis with fifth stage *Triatoma infestans* nymphs. The feces of triatomids presenting metacyclics trypomastigotes were inoculated intraperitoneally into normal young mice. These groups of animals were submitted after 30 days to hemocultures and histological studies. Flagellates of *T. cruzi* in hemocultures were detected in all three groups of animals. The group of animals inoculated with PF trypomastigotes showed in the anatomic-pathological studies, amastigotes mainly in smooth, cardiac and skeletal muscles. The groups of animals inoculated with "PF^{II}" and "MR₄₄", although negative for amastigotes tissue forms, presented some focal chronic myositis in smooth muscle of intestine and in skeletal muscles. Living vaccines "or attenuated" culture forms are, therefore, at the present time, not recommended as a safe procedure in Chagas' disease control programs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRENER, Z. & CHIARI, E. — Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 5:220-224, 1963.
2. CAMARGO, E. P. — Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I — Origin of metacyclic tripanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 6:93-100, 1964.
3. CARVALHEIRO, J. R. & COLLARES, E. P. — Estudos sobre o comportamento em camundongos de uma amostra virulenta de *Trypanosoma cruzi*, (amostra Y) após passagem em triatomíneos, ratos e culturas. *Rev. Brasil. Biol.* 25:169-175, 1965.
4. CHIARI, E. — *Crescimento, diferenciação e infectividade de formas de cultura do Trypanosoma cruzi mantidas em laboratório por diferentes períodos*. Tese de Mestrado, 72 páginas. Belo Horizonte, 1971.
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. — Imunizações de camundongos com vacina avirulenta de *Trypanosoma cruzi*. I — Ensaio da avaliação do menor inóculo eficiente. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 3:297-303, 1969.
7. MENEZES, H. — Imunização de camundongos com "Vacina Viva" avirulenta de *Trypanosoma cruzi* — V. Ensaio de novos esquemas de vacinação. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 5:1-15, 1970.
8. MENEZES, H. — Aplicação de vacina viva avirulenta de *Trypanosoma cruzi* em seres humanos. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 13:144-154, 1971.
9. MUNIZ, J. & BRIELLO, A. — Estudo sobre a ação lítica de diferentes soros sobre as formas de cultura e sanguícola do *Schizotrypanum cruzi*. *Rev. Brasil. Biol.* 5:563-576, 1945.
10. PHILIPS, N. R. — Experimental studies on quantitative transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 54:60-70, 1960.
11. RÊGO, S. M. & GARHAM, P. C. C. — The "Y" strain of *Trypanosoma cruzi*; leishmanial development in the spleen of mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.* 50:229-300, 1956.
12. SANTOS, J. C. M. — Comportamento da cepa avirulenta PF do *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro invertebrado. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 13:279-284, 1971.
13. SCHILING, G. — Spontaneous and experimental infection. *J. Trop. Med. & Hyg.* 33:334-336, 1930 (in SANTOS²²).
14. SILVA, L. H. P. & NUSSENZWEIG, V. — Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.* 3:191-208, 1953.
15. TAFURI, W. L. & BRENER, Z. — Lesões do sistema nervoso autônomo no camundongo albino na fase aguda da tripanossomiase *cruzi* experimental. *Hospital (Rio)* 69:371-383, 1968.

Recebido para publicação em 19/6/1973.