

**BIOLOGIA DO *Trypanosoma cruzi* EM *Rhodnius robustus* EXPERIMENTALMENTE INFECTADO**

Matheus Bonifacio¹, Ana Paula Abreu², Ana Paula Margioto Teston³, Felipe dos Santos Rocha⁴, Andreia Mantovani da Silva⁵, Max Jean de Ornelas Toledo⁶.

RESUMO: *Trypanosoma cruzi* que é um protozoário hemoflagelado, agente etiológico da doença de Chagas (DCh), estima-se que 6-7 milhões de pessoas estão infectadas. *T. cruzi* largamente distribuído na natureza, circulando entre insetos vetores e mamíferos silvestres. Objetivou-se com esse trabalho avaliar o comportamento biológico do *T. cruzi* IV, avaliando a taxa de metaciclogênese, em triatomíneos experimentalmente infectados. Ninfas de 5º estágios da espécie *Rhodnius robustus* foram inoculadas com sangue contaminado com a cepa AM14 pertencente à DTU TcIV, pesadas antes e após o repasto infectante no alimentador artificial e a quantidade de sangue ingeridos foi calculada para cada triatomíneo. Os insetos foram alimentados aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após infecção (dai) e tiveram as fezes coletadas para realização de contagem global e diferencial das formas parasitárias. Foram dissecadas 2 ninfas e obtido *pool* de conteúdo intestinal no 30º, 60º, 90º e 120º dai, o qual foi avaliado com as mesmas técnicas citadas anteriormente. A taxa de infeciosidade das ninfas foi de 73%. O maior número de formas parasitárias encontrado nas fezes foi no 60º dai com 75% e no conteúdo intestinal foi 30º dai com 75%, mostrando que mesmo que a quantidade de sangue ingerida pelo triatomíneo seja de 1µL, é capaz de infectar os insetos.

PALAVRAS-CHAVE: Amazonas; DTU; Triatomíneos; *Trypanosoma cruzi*.

1 INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma cruzi* protozoário hemoflagelado agente causador da doença de Chagas (DCh) (Chagas 1909). Estima-se que 6-7 milhões de pessoas estão infectadas principalmente na América Latina (WHO 2015).

Vários estudos de caracterização biológica, bioquímica e molecular, têm demonstrado que o *T. cruzi* é uma espécie heterogênea e com grande variabilidade genética (Macedo & Segato 2011). De acordo com Zingales et al. (2009) o *T. cruzi* apresenta seis unidades taxonômicas distintas (DTU) de TcI a TcVI. Estudos recentes mostram que a TcI está associado a triatomíneos e animais silvestre, principalmente aqueles pertencentes aos gêneros *Rhodnius* spp e *Didelphis* spp e, que as DTU TcI e TcIV estão relacionadas a infecções agudas humanas e surtos de infecção oral na região do Amazonas (Marcili et al. 2009; Monteiro et al. 2012).

Rhodnius robustus é a espécie de triatomíneo pertencente ao ciclo silvestre, habita várias espécies de palmeiras na região Norte do país. Devido proximidade das palmeiras das residências podem ser encontrados esses insetos no domicílio e peridomicílio atraídos pela luz. Os *R. robustus* encontrados no domicílio apresentam altas taxas de infecções por tripanosomatídeos (Barreto-Santana et al. 2011).

A metaciclogênese (MC) é o processo de transformação das formas epimastigotas (E) em tripomastigota metacíclico (TM), ocorrendo naturalmente no tubo digestivo dos vetores, sendo um importante parâmetro biológico por se tratar de um processo que envolve a transformação de uma forma não infectante em uma forma infectante (Contreras et al. 1985). Até onde se sabe, existem poucos estudos envolvendo a metaciclogênese *in vivo* utilizando as cepas pertencentes à DTU TcIV e triatomíneos da região Amazônica. Desta forma, objetivou-se com esse trabalho avaliar o comportamento biológico do *T. cruzi* IV, avaliando a taxa de metaciclogênese, em triatomíneos experimentalmente infectados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ASPECTOS ÉTICOS

O uso da cepa TcIV obtida de humano foi aprovado pelo comitê de ética da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (parecer número 360/07). O uso de camundongos foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UEM (parecer número 023/2014).

¹ Acadêmico do Curso de Farmácia. Universidade Estadual de Maringá- UEM. matheus.bonifacio@hotmail.com

² Pós-graduanda Programa Ciências da Saúde-UEM, Maringá – PR. Bolsista CNPq-UEM. ana.paula.abreu@hotmail.com

³ Pós-graduanda Programa Ciências da Saúde – UEM, Maringá – PR. Bolsista CNPq-UEM. anapeteston@hotmail.com ⁴ Acadêmico do Curso de Biomédicina. Universidade Estadual de Maringá- UEM. cthulipe@gmail.com

⁵ Pós-graduanda Programa Ciências da Saúde – UEM, Maringá – PR. andreiaferrom@hotmail.com

⁶ Pós-Doutor - Instituto Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro – RJ. mjotoledo@uem.br



2.2 AMOSTRA

Na inoculação dos triatomíneos foi utilizada a cepa AM14 da DTU TcIV proveniente do Estado do Amazonas. Foram utilizadas 13 ninfas de 5º estágio de *R. robustus* mantidas em condições ideais de temperatura e umidade. Estas ninfas foram alimentadas em alimentador artificial contendo sangue contaminado com 2800 tripomastigotas sanguíneos (TS).

As ninfas foram pesadas antes e após o repasto infectante, considerando que 1 mg = 1 µL. Como critério para determinar se as ninfas postas para alimentar no sangue infectado, foi considerado alimentadas aqueles insetos que tiveram ganho de peso ≥ 1 mg durante o repasto infectante.

Durante o repasto sanguíneo individual foram coletados 15 µL de fezes/urina para realização do exame à fresco em microscópio óptico com aumento de 400X. Um esfregaço corado pelo Giemsa era confeccionado para confirmar a infecção e determinar o número de TM e EP por inseto.

Os triatomíneos foram alimentados a cada 20 dias com sangue de camundongo sadio. Após 30, 60, 90 e 120 dias foram dissecados 2 exemplares e seus intestinos retirados e macerados em *pool* de 100 µl de PBS 0,15M. A partir das amostras de fezes/urina coletadas após a alimentação de cada ninfa e do *pool* de conteúdo intestinal foi realizada a contagem global no exame à fresco (Brenner 1962) e a contagem diferencial em esfregaço corado com Giemsa.

Foram avaliados os seguintes parâmetros: percentagem de triatomíneos alimentados (%TA), percentagem de infecciosidade (%INF), percentagem de formas epimastigotas (%EP) e percentagem de formas tripomastigotas metacíclicas (%TM).

2.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos serão digitados em planilha do programa Microsoft Excel 2010 e analisados estatisticamente pelo programa Bioestat® versão 5.3. A normalidade dos dados será verificada pelo teste Shapiro Wilk. Os testes do Qui-quadrado ou Fisher foram usados para verificar diferenças nas proporções (%TA, %INF, %EP e %TM). O teste Mann-Whitney será utilizado para verificar diferença no peso das ninfas antes e após o repasto sanguíneo infectante. O nível de significância adotado nos testes será de 5%, ou seja, serão consideradas significativas as associações onde $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Dados preliminares mostram que durante a inoculação dos triatomíneos foi observado que das 13 ninfas de 5º estágio de *R. robustus* alimentadas em alimentador artificial, apenas 11 ninfas tiveram ganho de peso ≥ 1 mg (%TA= 84,61). Considerando as oito ninfas que se alimentaram a %INF foi de 73 % (8/11).

As ninfas de 5º estágio ingeriram em média de 153 mg de sangue que corresponde em média 4284 TS/ µl sangue (28-7780).

Fezes/urina

A quantidade média de parasitos eliminados nas fezes/urina observadas na diferencial 0,25 parasito/ µl EP e 0,69 parasito/ µl TM e no conteúdo intestinal foi de 1,4 parasitos/µl de EP e 0,5 parasitos/µl.

No 20º dia após infecção (dai), já foi possível observar as formas parasitárias (33,33%) nas fezes/urina com a contagem diferencial, mantendo se estáveis até o 40º dai. No 60º dai foi observado uma tendência no aumento das formas parasitárias (75%) (Gráfico 1). No 80º e 100º dai, não foram encontradas formas do parasito nas fezes/urina.

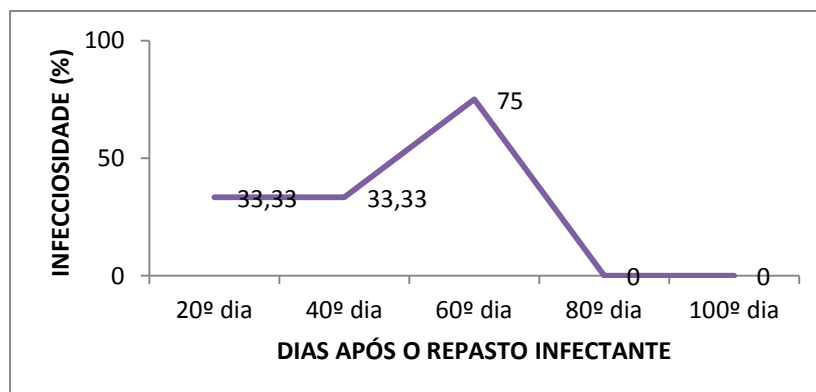


Gráfico1. Taxa de infecciosidade nas fezes/urina dos triatomíneos após o repasto infectante



Conteúdo intestinal

A maior positividade (75%) foi observada no 30º dai, mantendo-se positiva até o 120º dai (50%) (Gráfico 2).

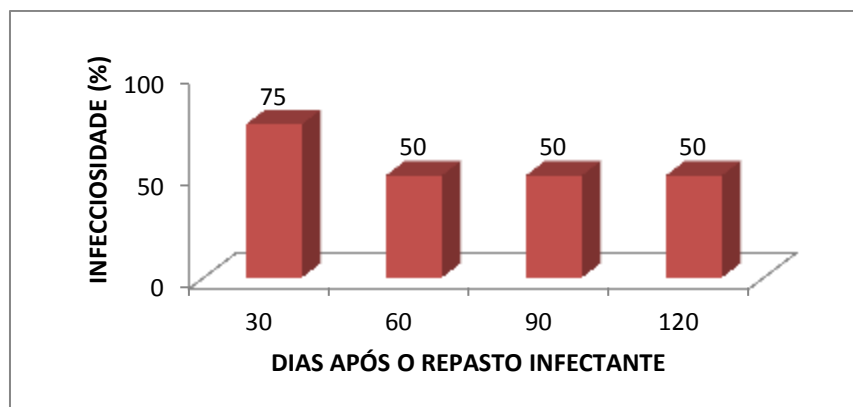


Gráfico 2. Taxa de infeciosidade no conteúdo intestinal dos triatomíneos após o repasto infectante.

O estudo da DTU TcIV e a interação com o vetor é importante por estar relacionada com surtos de infecção oral na região Amazonas (Marcili et al. 2009) esse comportamento parasito/vetor tem sido pouco estudada.

Ao conhecer o simpatria entre o triatomíneo e *T. cruzi*, é importante para verificar a capacidade de infectar mamíferos e, dependendo dessa interação uma cepa poderá se distribuir com maior facilidade na natureza (Barreto-Santana et al. 2011).

A espécie *R. robustus* está associada ao ciclo silvestre do *T. cruzi*, tendo ampla distribuição na região Amazonas. Segundo Barreto-Santana (2011), há relatos de triatomíneos adultos infectados pelo *T. cruzi* invadido habitações humanas.

Diante deste contexto, os resultados obtidos ao considerar alimentadas aquelas ninfas que tiveram pelo menos 1 mg de ganho de peso, foi possível observar que independe da quantidade de sangue ingerido pelas ninfas, é capaz de infecta-las. As taxas de infeciosidade confirma a simpatia entre as cepas TcIV e o *R. robustus*. Fato confirmado pela presença das formas parasitaria nas fezes/urina dos triatomíneos ao logo aos 20 dai. No conteúdo intestinal foi possível observar o protozoário desde 30 dai. Por outro lado, a quantidade de formas encontradas tanto nas fezes/urina quanto no conteúdo intestinal foi baixa podendo estar relacionada à concentração de TS no sangue infectado.

Houve uma tendência no aumento das formas do parasitarias na fezes/urina com aumento no 60º dai. Porém no conteúdo intestinal o aumento ocorreu no 30 dai, após esse período a população do protozoário se estabilizou. Esse fato pode ser explicado por no lúmen intestinal do triatomíneo existem mecanismo imunológicos, que atuam na eliminação do parasito (Alvarenga & Brofen 1997).

4 CONCLUSÃO

A interação parasita/vetor está relacionada com as alterações fisiológicas que ocorrem no trato gastrointestinal do inseto, o parasita além de se nutrir com as substâncias presente no tubo digestivo, podem também auxiliar na diferenciação ou inibição do desenvolvimento deste parasito. 1991). Essa dependência *Trypanosoma cruzi*/Triatomíneo contribui para a dispersão do parasito na natureza, mesmo que a quantidade de sague ingerida seja de 1µL é capaz de infectar os triatomíneos.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA NJ, Bronfen E. Metaciclôgenese do *Trypanosoma cruzi* como parâmetro de interação do parasita com o triatomíneo vetor. Rev. Soc. Bras. Med. Trop, v. 30, n. 3, p.247-250, mai 1997.

BARRETO-SANTANA, Daniella et al . Biologia comparativa e comportamento alimentar de *Rhodnius neglectus* e *Rhodnius robustus* (Triatominae) sob condições de laboratório. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba , v. 44, n. 4, p. 490-495, Aug. 2011.

BRENER, Z. Intraespecific variation in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting disting characteristics. *PAHO Sci. Publ.*, v.347, p.11-21. 1977.



CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, v. 1, p. 159-218, 1909.

CONTERAS V.T, et al. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol*. 16: 315-27, 1985.

MACEDO, A.M. SEGATTO, M. Implications of *Trypanosoma cruzi* intraspecific diversity in the pathogenesis of Chagas disease. In: TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. (Eds.). *American Trypanosomiasis – Chagas Disease: One Hundred Years of Research*. Elsevier Insights, Paris, pp. 489-508, 2011.

MARCILI, Arlei et al . *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int J Parasitol* v 39, 615-23 2009.

MONTEIRO, Wuelton et al . *Trypanosoma cruzi* I and IV Stocks from Brazilian Amazon Are Divergent in Terms of Biological and Medical Properties in Mice. *PLoS Negl Trop Dis*, v 7, e 2069, 2013.

ZINGALES, Bianca et al . A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 7, p.1051-1054, nov. 2009.

World Health Organization: WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em:< <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> >. Acesso em 11 de fev. 2014.