

INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE MACACOS *CEBUS APELLA* SP  
PELO *TRYPANOSOMA CRUZI*  
II — REISOLAMENTO DE CEPAS E ESTUDO DE SUAS  
CARACTERÍSTICAS EM CAMUNDONGOS ALBINOS

Maria Regina Navarro RASSY (1), Judith KLOETZEL (2), Sérgio Luiz NOGAROTO (1), Sílvio dos Santos CARVALHAL (3), Eros Antonio de ALMEIDA (3) e Geraldo CHAIA (1)

R E S U M O

De macacos *Cebus apella* sp, na fase crônica da doença de Chagas, foram reisoladas as cepas Y, Yr, 200 e 339 por intermédio de xenodiagnóstico (*Triatoma infestans*) e a cepa 245 também por inóculo direto de sangue do macaco em camundongos (formas tripomastigotas). Após o reisolamento, as referidas cepas foram inoculados em camundongos albinos machos (Swiss), e tiveram novamente estudadas suas características biológicas. Os Autores concluem que as cepas mantiveram suas características, já anteriormente conhecidas, e discutem ainda o conceito de virulência de cepa durante sua manutenção em laboratório através de sucessivas passagens por camundongos, sugerindo o macaco *Cebus apella* sp como um hospedeiro para a manutenção de cepas *in vivo*, por longo período, sem que as mesmas aumentem sua virulência.

I N T R O D U Ç Ã O

Inúmeros são os pesquisadores que se dedicam ao isolamento de novas cepas de *Trypanosoma cruzi*, estudando suas características biológicas<sup>1,3,7,12,14,19,21</sup>, preocupando-se principalmente com o grau de virulência das mesmas<sup>9,16,18,22,23,26</sup>, que na maioria das vezes, com o decorrer do tempo, durante as sucessivas passagens em camundongos, aumenta gradativamente a letalidade dos animais e impede que os mesmos cheguem à fase crônica da doença de Chagas.

No presente trabalho os Autores reisolaram diversas cepas de *T. cruzi*, mantidas já há algum tempo em macacos *Cebus apella* sp, e, além de estudarem as suas características biológicas, preocuparam-se em verificar se as mesmas conservavam o grau de virulência já anteriormente conhecido.

M A T E R I A L E M É T O D O S

I — *Curva de Parasitemia e Manutenção de Cepas* — Foram selecionados 50 camundongos albinos machos (Swiss), pesando de 18-20g, os quais, distribuídos em grupos de 10, foram infectados com as cepas Y e Yr (SILVA & NUSSENZWEIG<sup>22</sup> e TAKEDA & col.<sup>25</sup>), 200, 245 e 339 (RASSY & col.<sup>20</sup>), por via intraperitoneal com  $1.10^5$  formas tripomastigotas. Diariamente após a infecção foram feitas contagens do número de *T. cruzi* em  $5 \text{ mm}^3$  de sangue, pela técnica de BRENER<sup>6</sup>, por período máximo de 20 dias, observando-se também a mortalidade dos animais até o 25.º dia após a infecção. Para a manutenção das referidas cepas, novos grupos de camundongos foram infectados com o mesmo número de formas tripomastigotas acima mencionado, e as sucessivas passagens foram realizadas aproximadamente nos picos da parasitemia.

(1) Instituto de Pesquisa Johnson & Johnson Doenças Endêmicas, Caixa Postal 105, 13170 Sumaré, SP

(2) Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Departamento de Medicina Preventiva, Faculdade de Medicina USP.

(3) Pontifícia Universidade Católica, Departamento de Anatomia Patológica, Campinas, SP

## II — Infecção e Manutenção de Macacos —

Em 5 macacos *Cebus apella* sp, capturados no campo, foram feitos xenodiagnóstico antes da infecção, utilizando-se cinco ninfas de 4.º estágio (*Triatoma infestans*) por animal. As ninfas, mantidas em câmara úmida (26°C e 50-60% de umidificação), foram examinadas 30 dias após o repasto. Ao mesmo tempo, os primatas foram submetidos a teste sorológico de aglutinação direta<sup>24</sup>. Os referidos animais foram inoculados individualmente por via intraperitoneal com  $1.10^5$ /kg formas tripomastigotas provenientes de camundongos infectados com as cepas Y, Yr, 200, 245 e 339. Após a infecção, os macacos foram mantidos no laboratório (24°C, 60-70% umidificação) em gaiolas individuais, durante o período de 1 a 5 anos.

III — **Reisolamento de Cepas** — As cepas Yr, 200, 245 e 339, e a cepa Y, foram reisoladas individualmente de macacos, respectivamente após 1 e 5 anos de infecção, por intermédio de cinco ninfas de *T. infestans* por animal. Após 30 dias, as fezes dos triatomíneos contendo formas metacíclicas de *T. cruzi*, foram suspensas em 5 ml de salina e inoculadas por via intraperitoneal (0,5 ml) em camundongos albinos, o número de parasitas contido nas fezes não foi determinado. Posteriormente, o sangue destes animais foi examinado diariamente até o encontro do *T. cruzi*, época em que se procedeu à primeira passagem.

Em um dos macacos infectados (cepa 245), além do xenodiagnóstico, foram também coletados 5 ml de sangue em 0,5 ml de citrato de sódio 3,8% inoculando-se este material em camundongos, 0,5 ml/animal.

IV — **Curvas de Parasitemia após o reisolamento** — As cepas Y, Yr, 200, 245 e 339, reisoladas de macacos e mantidas em camundongos, tiveram suas curvas de parasitemia estabelecidas na 3.ª passagem, as quais foram repetidas na 12.ª para a cepa 200 e na 15.ª para as cepas 245 e 339, anotando-se também a mortalidade dos animais.

Para a cepa 245, reisolada através do inóculo das formas sanguíneas de macaco na fase crônica, também foi feita curva de parasitemia e verificada a mortalidade.

## RESULTADOS

I — **Parasitemia** — Os dois picos de parasitemia da cepa Y, observados antes e após o reisolamento de macaco na fase crônica, deram-se respectivamente no 5.º e 8.º e no 5.º e 7.º dias após a inoculação em camundongos; entretanto, em outra cepa (Yr), ambos os picos foram observados no 15.º dia (Figs. 1 e 2). Na cepa 200, o pico de parasitemia anterior foi no 11.º dia e nas duas passagens após o reisolamento (3.ª e 12.ª) foi no 10.º dia (Fig. 3). Na cepa 245, o número máximo de formas tripomastigotas ocorreu no 13.º dia antes do reisolamento, e após, no 12.º dia (Fig. 4). Comparando o comportamento desta cepa 245 reisolada por meio de xenodiagnóstico com o reisolamento feito através do inóculo de sangue de macaco na fase crônica para camundongos, registraram-se picos de parasitemia no 12.º e 13.º dias, respectivamente (Fig. 6). Finalmente, a cepa 339 apresentou 2 picos de parasitemia (5.º e 8.º dias) tanto antes como na 3.ª passagem após o reisolamento, sendo que na 15.ª passagem, os 2 picos característicos desta cepa foram assinados no 6.º e 9.º dias (Fig. 5).

II — **Mortalidade** — Os percentuais de mortalidade mais elevados em camundongos (70-90%) foram observados nas cepas Y, Yr e 339, não acontecendo o mesmo nas cepas 200 e 245, cujo percentual de mortalidade foi praticamente nulo (0-10%), tanto antes como após o reisolamento de macacos (Tabela I).

## DISCUSSÃO

Inúmeros são os pesquisadores que se preocupam em isolar novas cepas de *Trypanosoma cruzi*, estudando parasitemia, virulência e patogenicidade<sup>1,3,7,12,14,19,21</sup>, bem como aqueles que procuram por intermédio de processos imunológicos<sup>4,5,10,17</sup>, meios para melhor caracterizá-las, selecionando algumas que possam reproduzir o quadro crônico da doença de Chagas em animais de laboratório. Sendo assim, tornaria-se mais fácil elucidar aspectos da patogênese, além de conhecer melhor a diferença de comportamento de cepas de caracteres distintos em relação aos quimioterápicos<sup>2,8</sup>.

Procurando ainda um animal que pudesse suportar a fase aguda da doença, permitindo estudos na fase crônica, CHAIA & col.<sup>11</sup> inocu

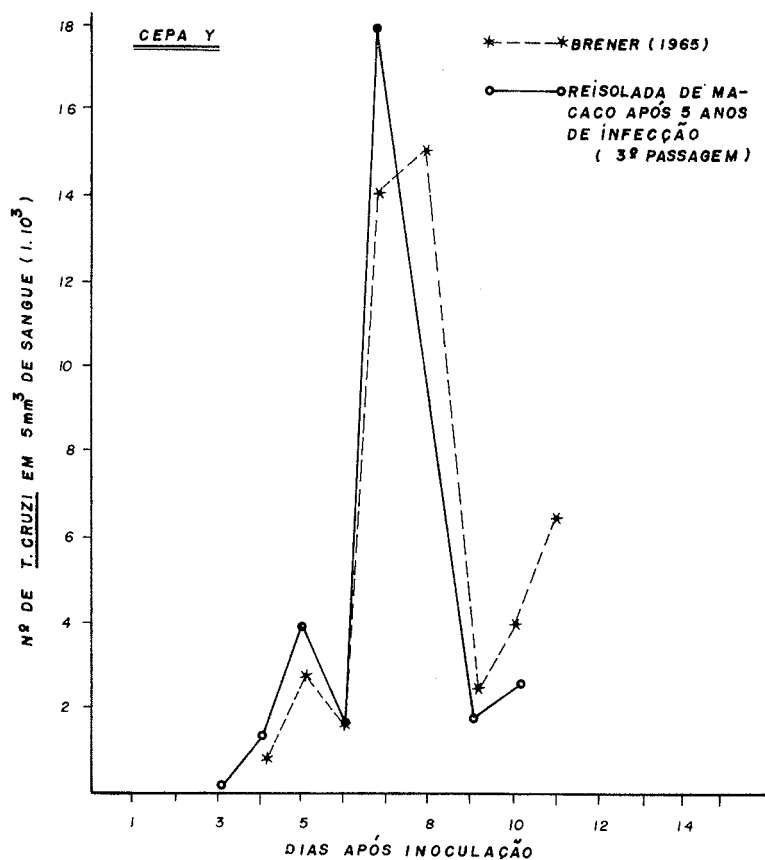


Fig. 1 — Caracterização das curvas parasitêmicas (cepa y) em grupos de 10 camundongos albinos infectados com  $1.10^6$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* antes e após o reisolamento de macaco *Cebus apella* sp.

T A B E L A I

Porcentagem de mortalidade de camundongos albinos Swiss (10 por grupo), infectados com  $1.10^6$  formas sanguíneas de *Trypanosoma cruzi* antes e após o reisolamento de macacos *Cebus apella* sp na fase crônica

Cepa	Passagem	Dias após a infecção									Total mortalidade
		8	11	12	13	14	16	18	20	25	
Y*		20	10	40	10	0	0	0	0	0	80,0%
Y+	3	20	10	40	10	0	0	0	0	0	80,0%
Yr*		0	0	0	0	10	0	30	10	20	70,0%
Yr+	3	0	0	0	0	0	40	0	40	0	80,0%
200*		0	0	0	0	0	0	0	0	10	10,0%
200+	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0%
200+	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0%
245*		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0%
245+	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0%
245+	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0%
339*		0	0	0	20	20	20	20	0	0	80,0%
339+	3	0	0	0	30	30	30	0	0	0	90,0%
339+	15	0	0	20	0	30	40	0	0	0	90,0%

\* Antes do reisolamento.

+ Após reisolamento de macaco na fase crônica.

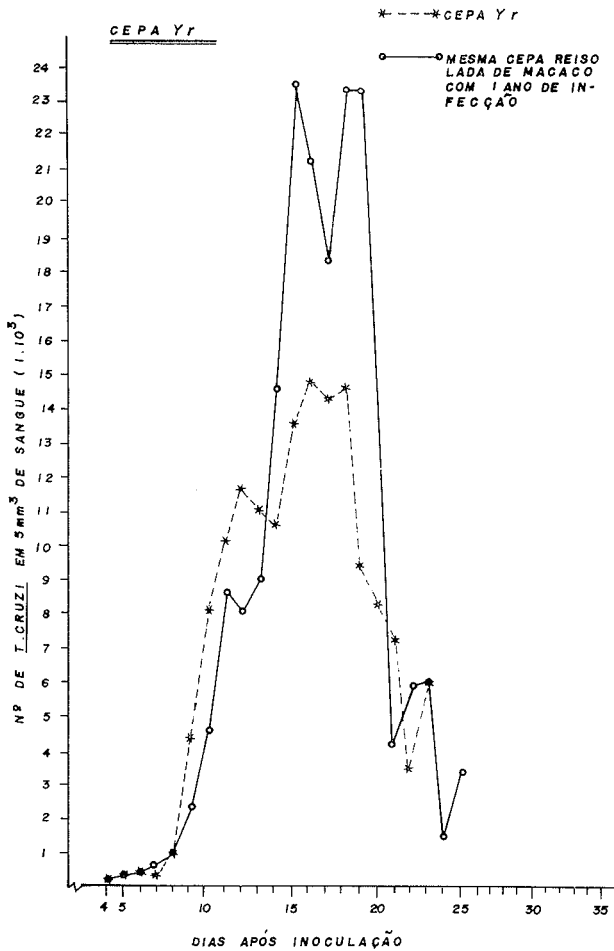


Fig. 2 — Caracterização das curvas parasitêmicas [cepa Yr] em grupos de 10 camundongos albinos infectados com 1.10<sup>6</sup> formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* antes e após o reisolamento de macaco *Cebus apella* sp.

laram macacos (*Cebus apella* sp), os quais sobrevivem por um longo período, mesmo quando infectados com cepas extremamente virulentas.

Devido ao fato de verificarmos divergências entre alguns Autores<sup>18,25</sup> quanto ao reisolamento de cepas e a manutenção ou não de suas características anteriores, achamos oportuno, principalmente pela alta positividade que se obtém em xenos realizados em macacos<sup>15</sup>, reisolarem diferentes cepas mantidas já há algum tempo nesses animais, observando suas características, as quais já haviam sido anteriormente estudadas<sup>7,20</sup>.

Conforme pode-se observar nas Figuras 1 a 5, as cepas, após reisoladas e passadas em camundongos, não perderam suas características

no que se refere aos picos de parasitemia e à mortalidade dos animais (Tabela I). Cepas (Y e 339) que apresentavam dois picos de parasitemia (5.º e 8.º dias) antes do reisolamento, praticamente mantiveram suas características, reproduzindo a época dos picos, (5.º e 7.º dias), e aquelas que mostravam um único pico, ocorrido no 15.º dia (Yr), 11.º (200) e 13.º (245), permaneceram com aspectos semelhantes, pois o número máximo de formas tripomastigotas após o reisolamento foi observado respectivamente no 15.º, 10.º e 12.º dias. A cepa (245) reisolada, quer após passagem pelo hospedeiro intermediário (*Triatoma infestans*), quer através de inoculação direta de formas tripomastigotas de sangue em camundongos, não apresentou modificação quanto às suas características biológicas (Fig. 6), dados que divergem de SOARES & col.<sup>23</sup>. Quanto à mortalidade,

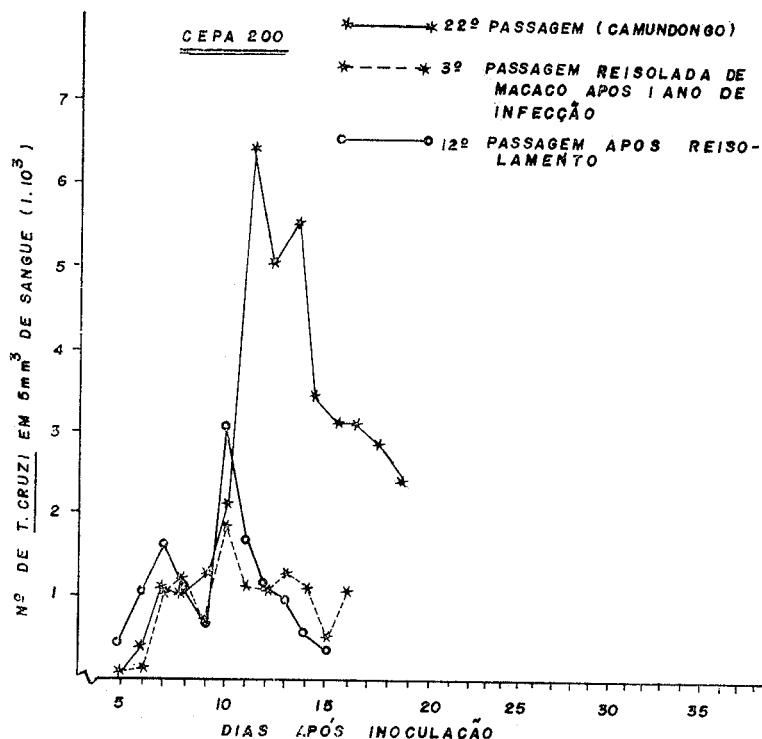


Fig. 3 — Caracterização das curvas parasitêmicas [cepa 200] em grupos de 10 camundongos albinos infectados com  $1.10^6$  formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* antes e após o reisolamento de macaco *Cebus apella* sp.

fato idêntico foi observado, pois cepas virulentas e avirulentas, tanto antes como após o reisolamento, mantiveram o mesmo grau de virulência (Tabela I). Aliás, LANA & col.<sup>18</sup> obtiveram resultados concordantes quando do reisolamento da cepa Berenice.

É sabido que a manutenção de cepas através de sucessivas passagens em camundongos aumenta a virulência das mesmas, possivelmente pela seleção de populações mais virulentas do tripanossomo ou por uma adaptação gradativa de formas ao hospedeiro, a tal ponto que os animais morrem na fase aguda, não permitindo observação da fase crônica da doença<sup>9,16,18,22,23,26</sup>. Esse fato foi também por nós observado durante a manutenção da cepa Yr que a princípio, em concordância com TAKEDA & col.<sup>25</sup>, praticamente não provocava a morte dos animais, mas com o decorrer do tempo aumentou sua virulência registrando índices de até 70% de mortalidade (Tabela I).

FILARDI & BRENER<sup>13</sup>, sentindo a necessidade de prevenir mudanças que podem ocorrer durante a manutenção prolongada de cepas de *T. cruzi*, utilizaram o processo da criopreser-

vação e verificaram que cepas mantidas de 7 dias a 1 ano pelo referido processo, não perdiam suas características anteriores, quando inoculadas em camundongos.

Como verificamos anteriormente, um dos grandes problemas que impede a sobrevivência de animais de laboratório até a fase crônica da doença de Chagas está relacionado ao aumento da virulência das cepas. Até o momento, poucos são os processos de manutenção das mesmas sem a perda de suas características. Os dados apresentados indicam que o macaco *Cebus apella* sp é um hospedeiro que pode ser utilizado para tal finalidade, pois além de oferecer facilidade ao reisolamento, mantém as cepas *in vivo* por períodos relativamente longos, conservando as características biológicas, principalmente no que se refere ao grau de virulência, fato extremamente importante em vários estudos da fase crônica da doença de Chagas, inclusive da ação de quimioterápicos sobre esta forma da doença, em modelos experimentais.

Dados existentes na literatura<sup>25</sup> sobre reisolamento de cepa de *T. cruzi* de paciente vários anos após o primeiro isolamento, não afas-

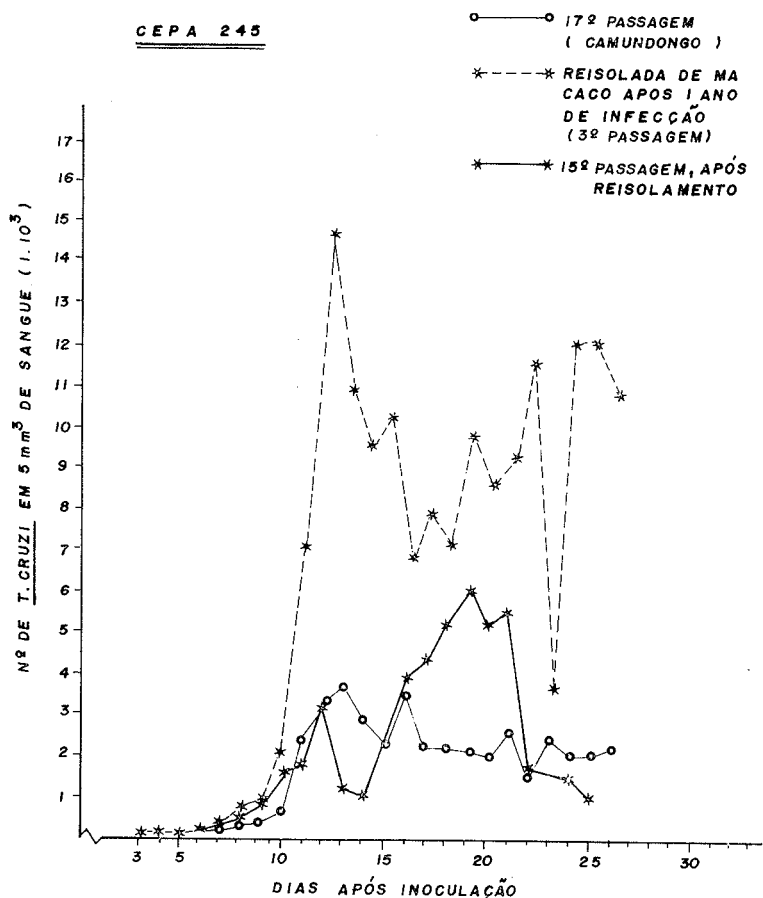


Fig. 4 — Caracterização das curvas parasitêmicas [cepa 245] em grupos de 10 camundongos albinos infectados com 1.10<sup>5</sup> formas tripomastigotas de *T. cruzi* antes e após o reisolamento de macaco *Cebus apella* sp.

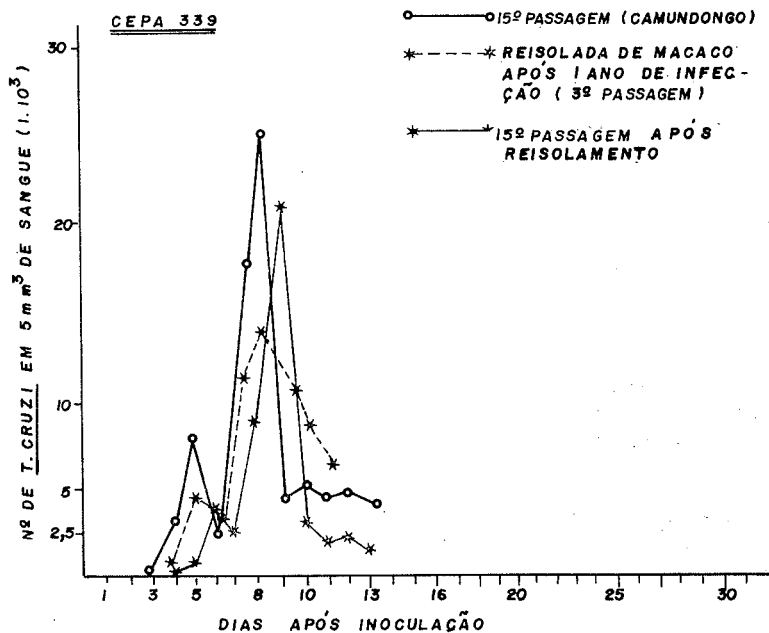


Fig. 5 — Caracterização das curvas parasitêmicas [cepa 339] em grupos de 10 camundongos albinos infectados com 1.10<sup>5</sup> formas tripomastigotas de *T. cruzi* antes e após o reisolamento de macaco *Cebus apella* sp.

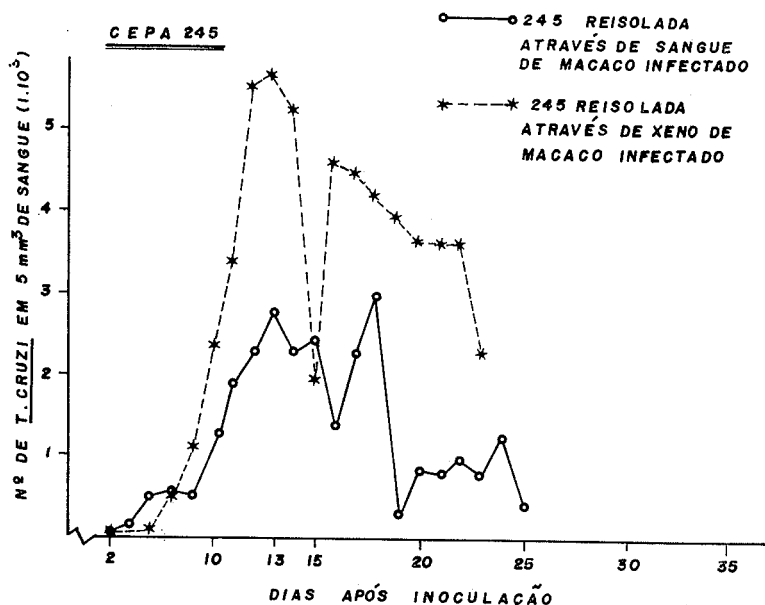


Fig. 6 — Caracterização das curvas parasitêmicas [cepa 245] em grupos de 10 camundongos albinos infectados com  $1.10^6$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* reisoladas através de sangue e xeno de macaco *Cebus apella* sp.

tam por completo a hipótese de uma eventual reinfecção, pois o paciente continuou residindo em área endêmica da doença de Chagas. Entretanto ainda não foi possível esclarecer por completo se uma cepa se altera, talvez pela ação de mecanismos imunológicos, após interação por longos períodos com o mesmo hospedeiro.

No caso destes primatas, após período relativamente longo de permanência em um único animal, suficientemente dilatado para permitir uma seleção por mecanismos imunológicos, as cepas continuaram conservando suas características iniciais.

### SUMMARY

Experimental infection of monkeys *Cebus apella* sp with *Trypanosoma cruzi*

#### II — Re-isolation of strains and study of their characteristics in albino mice

From chronically Chagas infected *Cebus apella* sp monkeys the Authors isolated strains Y, Yr, 200, and 339 by xenodiagnosis (*Triatoma infestans*), as well as strain 245 which was also isolated by inoculation of trypomastigote bloodstream forms in to mice. After reisolation, these strains were inoculated in male Swiss albino mice and their biological characteristics

were again studied. The Authors conclude that these strains maintain their previously established characteristics and furthermore discuss strain virulence variation during their laboratory maintenance through repeated passages in mice. The Authors also propose the *Cebus apella* sp monkey as a good animal for *in vivo* long term strain maintenance inasmuch as it does not generate an increase of strain virulence.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, S. G. — Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no recôncavo baiano. Rev. Pat. Trop. 3: 65-121, 1974.
- ANDRADE, S. G.; FIGUEIRA, R. M.; CARVALHO, M. L. & GORINI, D. F. — Influência da cepa do *Trypanosoma cruzi* na resposta à terapêutica experimental pelo Bay 2502. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 17: 380-389, 1975.
- ANDRADE, S. G. — Biological characterization of strains of *Trypanosoma cruzi*. Cong. Intern. Doença de Chagas (Rio), Julho 1979.
- ANDRADE, S. G.; ANDRADE, V.; BRODSKYN, C. & MAGALHÃES, J. B. — Correlação entre a resposta imunológica de camundongos à infecção por diferentes cepas do *T. cruzi* e o quadro histopatológico nas diversas fases da infecção. 8.<sup>a</sup> Reunião Anual, Caxambú, MG, Nov. 1981.
- ANDRADE, V.; BRODSKYN, C. & ANDRADE, S. G. — Análise isoenzimática de cepas de diferentes tipos

- e diferentes áreas geográficas. 8.<sup>a</sup> Reunião Anual, Caxambú, MG, Nov. 1981.
6. BRENER, Z. — Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 4: 389-396, 1962.
  7. BRENER, Z. — Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 59: 19-26, 1965.
  8. BRENER, Z. & CHIARI, E. — Suscetibilidade de diferentes amostras de *T. cruzi* a vários agentes quimioterápicos. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 9: 197-207, 1967.
  9. BRENER, Z.; CHIARI, E. & ALVARENGA, N. J. — Observations on *Trypanosoma cruzi* strains maintained over an 8-year period in experimentally inoculated mice. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 16: 39-46, 1974.
  10. CARNEIRO, M.; ROMANHA, A. J. & CHIARI, E. — Comportamento biológico de amostras do *Trypanosoma cruzi*. 8.<sup>a</sup> Reunião Anual, Caxambú, MG, Nov. 1981.
  11. CHAIA, G.; ABREU, I. B.; CHIARI, L. & ARAUJO, S. M. — Infecção experimental de macacos *Cebus apella* sp pelo *Trypanosoma cruzi* (Cepa "Y"). I. Curva da parasitemia na fase aguda da doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 11: 82-85, 1977.
  12. DEANE, M. P.; BRITO, T. & DEANE, L. M. — Pathogenicity to mice of some strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from wild animals of Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 5: 225-235, 1963.
  13. FILARDI, L. S. & BRENER, Z. — Cryopreservation of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms. *J. Protozool.* 22: 398-401, 1975.
  14. GONZALEZ CAPPA, S. M.; CHIALE, P.; DEL PRADO, G. E.; KATZIN, A. M.; MARTINI, G. W. de; ISOLA, E. D. de; ORREGO, L. A. & SEGURA, E. L. — Aislamiento de una cepa de *Trypanosoma cruzi* de un paciente con miocardiopatia chagásica crónica y su caracterización biológica. *Medicina* (Buenos Aires) 40: 63-68, 1980.
  15. GRANADO, N.; RASSY, M. R. N.; NOGAROTO, S. L.; CARVALHAL, S. S.; ALMEIDA, E. A. & CHAIA, G. — Infecção experimental de macacos *Cebus apella* sp pelo *Trypanosoma cruzi*. III. Valor do xenodiagnóstico e da sorologia na fase crônica da doença. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 25:283-287, 1983.
  16. KLOETZEL, J. K.; CASTILHO, E. A. & LAFAILLE, J. J. — Comportamento da cepa F do *Trypanosoma cruzi* dependente da maneira de sua manutenção. VI Cong. Bras. Parasit. (Belo Horizonte), Fev. 1981.
  17. LANA, M.; CHIARI, C. A.; CHIARI, E.; ROMANHA, A. J. & MOREL, C. M. — Caracterização de formas de cultura do *Trypanosoma cruzi* isoladas da paciente Berenice em diferentes períodos. 8.<sup>a</sup> Reunião Anual, Caxambú, MG, Nov. 1981.
  18. LANA, M.; CHIARI, C. A. & ROCHA, O. A. — Caracterização biológica da cepa Berenice e da amostra Berenice de *Trypanosoma cruzi* recém isolada da mesma paciente. 8.<sup>a</sup> Reunião Anual, Caxambú, MG, Nov. 81.
  19. PESTANA, W. B. & COURA, J. R. — Experimental studies on *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* strains isolated from man, from animals and from triatomine bugs in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 8: 315-323, 1974.
  20. RASSY, M. R. N.; NOGAROTO, S. L.; ALMEIDA, E. A.; CARVALHAL, S. S. & CHAIA, G. — Estudo do comportamento de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas de casos humanos e mantidas em camundongos albinos. XVIII Cong. Soc. Bras. Med. Trop., Ribeirão Preto, SP, Fev. 1982.
  21. RODRIGUEZ, M. A. M. — Elaboración de un criterio para medir virulencia de cepas patógenas de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. *Bol. Dir. Malaria y San. Amb.* 16: 221-230, 1976.
  22. SILVA, L. H. P. & NUSSENZWEIG, V. — Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clinica Biol.* 20: 191-208, 1953.
  23. SOARES, V. A. & ALVARENGA, N. J. — Modificação de cepas de *Trypanosoma cruzi* após passagem pelo vector. XIII Cong. Soc. Bras. Med. Trop. e II Soc. Bras. Parasit. (Brasília) Fev./Mar. 1977.
  24. STORNI, P. D.; BOLSI, F. L. & YANOVSKY, J. F. — Reacción de aglutinación directa para diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Utilización sistemática de 2-Mercaptoetanol para la eliminación de las aglutininas inespecíficas. *Medicina* (Buenos Aires) 35: 67, 1975.
  25. TAKEDA, G. K. F.; CHIARI, L. & CAMPOS, C. A. M. — Alguns caracteres biológicos da cepa Yr de *Trypanosoma cruzi*. V Cong. Bras. Parasit. (Rio), Fev. 1980.
  26. TAY, J.; GUTIÉRREZ, M.; SALAZAR, P. M.; CASTILLO, M. & ORTEGA, M. — Estudios sobre seis cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inv. Salud Pública* (México) 33: 67-76, 1973.

Recebido para publicação em 23/6/1982.