POLIMORFISMO DE FORMAS SANGUÍNEAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* I, II E IV

Felipe dos Santos Rocha (PIBIC/CNPq/UEM), Miyoko Massago, Camila Piva, Matheus Bonifácio, Ana Paula Margioto Teston, Max Jean de Ornelas Toledo (Orientador), e-mail: mjotoledo@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro da Saúde/Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas / Protozoologia Parasitária Humana.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi,* DTU, morfologia.

Resumo:

A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, é amplamente distribuída pelo mundo, principalmente na América Latina. Os tripomastigotas deste parasita podem apresentar-se na forma fina ou larga e diferir nos parâmetros parasitológicos e teciduais em hospedeiros vertebrados. Este trabalho avaliou o polimorfismo de tripomastigotas sanguíneos de 15 cepas de *T. cruzi*, pertencentes às unidades de tipagens distintas (DTU) TcI, TcII e TcIV. A distância da extremidade anterior ao núcleo; comprimento do flagelo livre; comprimento total, largura do corpo e o coeficiente C/L foram avaliados antes, durante e após o pico máximo, e os parasitos foram classificados em formas delgadas, intermediárias e largas. Verificou-se um baixo desvio padrão entre cepas da mesma DTU e entre os parasitos da cepa, porém foram verificadas diferenças significativas em todos os parâmetros para as diferentes DTU. Nas cepas TcII predominou a forma larga e nas TcIV as finas. Não foi possível se estudar o polimorfismo das formas sanguíneas das cepas TcI pelo fato de não induzirem uma parasitemia patente em camundongos. A população de parasitos de uma determinada DTU é altamente distinta da outra em sua morfologia, e apresenta homogeneidade intra-DTU. Dentre as seis variáveis estudadas, todas apresentaram diferenças estatísticas entre TcII e TcIV, o que indica que populações de diferentes DTU são claramente distintas e infectam diferenciadamente.

Introdução

A doença de Chagas (DCh) é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* o qual apresenta uma ampla variabilidade genética.

Atualmente, cerca de 6-7 milhões de pessoas no mundo estão infectadas por este protozoário, sendo endêmica na América Latina, porém recentemente vem sendo cada vez mais detectada na América do Norte e países da Europa (WHO, 2015). Nos últimos anos houve relatos do aumento no número de casos atribuídos a infecção por via oral em áreas consideradas não-endêmicas, como a Região Amazônica.

As diferentes morfológias apresentadas pelas formas tripomastigotas foram observadas inicialmente por Carlos Chagas, que atribuiu tais variações ao dimorfismo sexual (Chagas, 1909). Estudos posteriores determinaram que formas mais finas apresentam uma maior capacidade de penetrarem células teciduais, são mais infecciosas aos camundongos, mais sensíveis à ação de anticorpos circulantes e caracterizam parasitemias mais precoces (Brener, 1965). Em contraste, populações compostas predominantemente por formas largas são menos infecciosas, desenvolvendo parasitemias mais tardias, entretanto apresentam maior resistência aos anticorpos, e permanecem mais tempo na corrente sanguínea. Outro aspecto pertinente às duas morfologias são suas preferências por tipos celulares, como a forma delgada que opta por células do sistema mononuclear fagocitário, enquanto formas largas demonstram tropismo por células musculares, tais quais as lisas, esqueléticas e cardíacas (Beltrão et al., 2009). O comportamento biológico de uma cepa poderá variar dependendo da proporção relativa de uma ou outra forma. Devido tais características, este trabalho estudou o polimorfismo de tripomastigotas sanguíneos de cepas de *T. cruzi* presentes em diferentes estados brasileiros na tentativa de serem estabelecidas correlações com aspectos epidemiológicos e patológicos da DCh nesses estados.

Materiais e métodos

Utilizou-se 15 cepas pertencentes às unidades de tipagem distintas (DTU) *T. cruzi* I e IV do Amazonas (9 cepas), e *T. cruzi* I e II do Paraná (3), Minas Gerais (2) e São Paulo (1). Foram utilizados camundongos suíços, machos, com 21-28 dias, separados em grupos de 10, os quais foram inoculados pela via intraperitoneal com $1x10^4$ tripomastigotas sanguíneos/animal para cada cepa. Esses animais foram submetidos a exames de sangue a fresco (ESF) a partir do 3º dia após a inoculação e os que apresentaram resultados positivos no ESF foram então procedidos ao esfregaço sanguíneo em camada delgada corado por Giemsa, chegando a serem confeccionadas até 10 lâminas por animal. Tais lâminas foram analisadas em aumento de 1000x e percorrendo toda a extensão do esfregaço contando até 300 formas tripomastigotas sanguíneas ao acaso. As lâminas foram lidas em períodos anteriores ao pico parasitêmico, durante tal pico e nos períodos posteriores ao pico. Para cada forma foram determinados os seguintes parâmetros: 1-distância da extremidade posterior ao meio do núcleo (PN); 2-distância da

extremidade anterior ao meio do núcelo (AN); 3-comprimento do flagelo livre (FL); 4-comprimento total (C) e 5-largura do corpo (L). O coeficiente C/L, razão entre o valor do comprimento total e a largura, também foi obtido para cada forma. Em seguida, com as medidas obtidas, foi realizada a classificação morfológica dos tripomastigotas sanguíneos em formas delgadas, intermediárias e largas. Foram realizadas comparações estatísticas daqueles parâmetros entre as DTU.

Resultados e Discussão

Foi verificado um baixo desvio padrão entre cepas classificadas em uma mesma DTU e entre os parasitos pertencentes a uma determinada cepa. As seis variáveis apresentaram valores aproximados, porém mesmo assim as diferenças entre as DTU foram significativas para todas elas, sugerindo correlação entre essa característica biológica e a classificação das cepas em DTU. O valor médio da extremidade posterior apresentou maior diferença entre as DTU, seguido do coeficiente C/L. O comprimento do flagelo demonstrou uma diferença marginalmente significativa (Tabela 1). As formas consideradas "finas", "intermediárias" e "largas", apresentaram, paras as cepas TcII, largura < 1,44 µm, entre 1,44 e 1,99 µm e > 1,99 µm, respectivamente, e para as cepas TcIV, largura < 1,39 µm, entre 1,39 e 1,90 µm e > 1,90 µm, respectivamente. Desta maneira, nas cepas TcII predominou a forma larga e nas TcIV a forma fina.

Tabela 1. Média, desvio padrão (em µm) e teste de significância das cepas de *Trypanosoma cruzi* II e IV, em relação as variáveis de polimorfismo das formas sanguíneas.

Variáveis	TcII		TcIV		p
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
Ext. Post.[a]	7,44	1,55	8,03	1,51	0,00001
Ext. Ant.[b]	12,68	2,32	12,40	2,33	0,01352
Flagelo	7,62	1,90	7,44	1,95	0,04831
Compr. Total[c]	20,15	3,43	20,55	3,29	0,01504
Largura	1,85	1,11	1,73	0,54	0,00683
Compr./Larg[d]	12,09	3,71	12,75	3,70	0,00024

[a] Medida a partir do meio do núcleo até a extremidade posterior do parasito; [b] Medida a partir do núcleo até a extremidade anterior do parasito (incluindo o flagelo); [c] Comprimento total do parasito da extremidade posterior à ponta do flagelo; [d]Razão entre o valor do comprimento total e a largura.

Não foi possível se estudar o polimorfismo das formas sanguíneas das cepas TcI devido ao fato de tais cepas não induzirem uma parasitemia patente em camundongos. No entanto, estas cepas infectam os camundongos como pode ser comprovado por meio de hemocultura e PCR.

Conclusões

Todas as seis variáveis referentes à morfologia dos tripomastigotas sanguíneos apresentaram diferenças estatísticas entre TcII e TcIV e baixo desvio padrão, o que sugere que a população de parasitos de uma determinada DTU é altamente distinta da outra em sua morfologia, e apresenta homogeneidade intra-DTU. Sendo assim, a infecção presente no hospedeiro mamífero tem a possibilidade de evoluir de modos diferentes, o que dependeria da linhagem genética do parasito.

Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa PIBIC e pela bolsa produtividade do orientador. À Fundação Araucária e UEM pelo apoio financeiro.

Referências

BRENER, Z. Comparative studies of *Trypanosoma cruzi*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v. 59, n. 1, p. 19-25, 1965.

BELTRÃO, H. B.; CERRONI, M. P.; FREITAS, D. R.; PINTO A. Y.; et al. Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Pará State, Brazil, in 2007. **Tropical Doctor**, London, v. 39, n. 4, p. 231-232, 2009.

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

World Health Organization (WHO) 2015. Chagas disease. Fact sheet Nº 340, Junho 2015.