



EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO PELO *Trypanosoma cruzi* IV EM CAMUNDONGOS INOCULADOS POR VIA ORAL E INTRAPERITONEAL

Lais de Fátima Contessotto (PIBIC/CNPq /UEM), Felipe dos Santos Rocha (PIBIC/CNPq /UEM), Ana Paula Margioto Teston, Gerson Zanusso Junior, Max Jean de Ornelas Toledo (Orientador), e-mail: mjtoledo@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Ciências Básicas da Saúde / Maringá, PR.

Ciências Biológicas / Protozoologia Parasitária Humana

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi* IV, infecção oral, camundongos.

Resumo:

A doença de Chagas (DC) é uma importante zoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Atualmente, o perfil epidemiológico da doença apresenta um novo cenário com a ocorrência de casos isolados e surtos em regiões anteriormente consideradas não endêmicas e principalmente relacionados à ingestão de alimentos contaminados. O objetivo do trabalho foi estudar a evolução da infecção pelo *T. cruzi* em camundongos inoculados por via oral e comparar com animais inoculados por via intraperitoneal. Foram estudadas 4 cepas de *T. cruzi* IV, em 2 grupos de 13 camundongos Swiss, um inoculado via intraperitoneal (IP) e outro por via oral (VO), utilizando de 2×10^6 tripomastigotas metacíclicos de cultura/animal. A evolução da infecção foi avaliada por exame de sangue a fresco (ESF), hemocultura (%HC+), reação em cadeia da polimerase convencional (%cPCR+) e PCR em tempo real qualitativa e quantitativa (%qPCR+). Foram ainda determinadas as taxas de infecciosidade e mortalidade. Animais inoculados pela VO apresentaram níveis mais elevados de parasitemia em relação aos inoculados por via IP. O pico máximo de parasitemia foi mais elevado nos animais VO. %qPCR+ maior foi observada para os animais do grupo VO, no sangue, coração e no esôfago/estômago, e, menor na parede abdominal em comparação aos animais do grupo IP. Em suma, o estudo demonstrou que camundongos inoculados oralmente exibiram um curso mais intenso de infecção em comparação com camundongos inoculados intraperitonealmente.





Introdução

A doença de Chagas (DC) é uma importante zoonose causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Atualmente, afeta cerca de 7 – 8 milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2015). É endêmica na América Latina, no entanto, nas últimas décadas, ela tem sido cada vez mais detectada nos Estados Unidos da América, Canadá e Europa. O Brasil foi considerado livre da transmissão vetorial em 2006, entretanto os mecanismos minoritários passaram a ter importância em saúde pública. Atualmente, o perfil epidemiológico da doença apresenta um novo cenário com a ocorrência de casos isolados e surtos em regiões anteriormente consideradas não endêmicas, como a região da Amazônia Legal. Surtos de DC aguda relacionados à ingestão de alimentos contaminados como caldo de cana, açaí, bacaba, entre outros. No período de 2000 a 2011, foram registrados mais de mil e duzentos novos casos da doença, 70% por transmissão oral. Em relação ao parasita, as cepas de *T. cruzi* são referidas como unidades de tipagem distintas ou *Discrete Typing Units* (DTU) e os isolados de *T. cruzi* mais frequentes em surtos do Amazonas pertencem às DTU TcI e TcIV, sendo a TcIV predominante em humanos em fase aguda. Com isso, o objetivo do trabalho foi estudar a evolução da infecção pelo *T. cruzi* IV em camundongos inoculados por via oral comparativamente com animais inoculados por via intraperitoneal.

Materiais e Métodos

Parasitas: foram estudadas 4 cepas de *T. cruzi* IV provenientes do Estado do Amazonas (AM14, AM16, AM64 e AM69); **Inoculação dos animais:** para cada cepa foram inoculados 2 grupos de 13 camundongos Swiss com idade entre 21 e 28 dias provenientes do Biotério Central da UEM, mantidos em sala com umidade e temperatura controladas, ciclos claro/escuro e com água e ração *ad libitum*. Um grupo foi inoculado pela via intraperitoneal (IP) utilizando inóculo de 2×10^6 tripomastigotas metacíclicos derivados de cultura/animal (em um volume de 0,2 mL), e o outro grupo recebeu o mesmo inóculo por via oral (VO) (em um volume de 1,0 mL), via gavagem; **Exame de sangue a fresco (ESF):** os animais inoculados foram submetidos ao ESF a partir do 3º dia após a inoculação (d.a.i.) de acordo com Brener (1962). Parâmetros derivados da curva de parasitemia obtidos: Período pré-patente médio (PPP), período patente médio (PP), pico máximo de parasitemia (Pmax) e o dia do pico máximo de parasitemia (Dpmax); **Hemocultura (HC):**





foram realizadas 30 d.a.i. e incubadas em estufa BOD a 28 °C, segundo Filardi & Brener (1987); *Reação em cadeia da polimerase convencional (cPCR)*: As coletas de sangue para a cPCR foram realizadas em paralelo às HC. A extração do DNA, foi realizada segundo protocolo de Miyamoto *et al.* (2006). Para a amplificação foram utilizados os iniciadores 121 e 122, que amplificam um fragmento de 330 pares de base (pb). A visualização foi por eletroforese em gel de poliacrilamida a 4,5% revelado pela prata; *PCR em Tempo Real (qPCR) em sangue e tecido*: as coletas de sangue e de outros tecidos (coração, esôfago/estômago e parede abdominal) foram realizadas após eutanásia no 30º d.a.i. e 100º d.a.i. A extração do DNA foi realizada por precipitação salina. Para as amplificações usou-se os iniciadores TCZ-F, TCZ-R, e o Sybr®Green PCR Mastermix. Foi utilizado termociclador StepOne (Applied Biosystems) nas condições descritas por Caldas *et al.* (2012).

Resultados e Discussão

Foi observado que os animais inoculados pela via oral (VO) com cepas TcIV apresentaram níveis mais elevados de parasitemia em relação aos inoculados por via intraperitoneal (IP). Considerando os parâmetros derivados da curva de parasitemia, não foram observadas diferenças no PPP e PP entre os animais dos grupos VO e IP. O Pmax foi mais elevado nos animais VO ($p < 0,001$), embora ele tenha ocorrido mais tardiamente ($p = 0,01$). Não houveram diferenças nas positivities de ESF, HC, cPCR e qPCR entre os grupos VO e IP, e também nas taxas de infecciosidade e mortalidade. Observou-se uma taxa de mortalidade de 3,8% apenas no grupo VO. O grupo VO apresentou %qPCR+ diferente em comparação com o grupo IP para os quatro tipos de tecidos que foram analisadas durante a fase aguda da infecção (Tabela 3). Uma percentagem de qPCR+ mais elevada foi observada para o grupo VO no sangue ($p = 0,01$), coração ($p = 0,03$) e esôfago / estômago ($p = 0,003$), e uma percentagem de qPCR+ menor na parede abdominal ($p = 0,01$) em comparação com o grupo IP. DNA de *T. cruzi* não foi detectado no esôfago / estômago dos animais do grupo IP, e na parede abdominal do grupo VO.

Conclusões

Os resultados do presente estudo mostram diferenças no comportamento biológico do parasita após sua inoculação por diferentes vias. Camundongos que foram inoculados oralmente, exibiram um curso mais intenso de





infecção em comparação com camundongos inoculados intraperitonealmente, refletido pela carga parasitária mais elevada. Estes resultados podem orientar o diagnóstico futuro, o curso clínico da infecção e o tratamento de pacientes infectados oralmente com parasitos que pertencem à DTU TcIV de *T. cruzi*.

Agradecimentos

Fundação Araucária e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2015. Chagas disease in Latin America: epidemiological update based on 2010 estimates. WHO, Geneva.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop** 4: 389-396, 1962.

CALDAS S, CALDAS IS, DINIZ LF et al. Real-time PCR strategy for parasite quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Acta Tropica** 123: 170– 177, 2012.

MIYAMOTO CT, GOMES ML, MARAGON AV et al. *Trypanosoma cruzi*: Sensitivity of the polymerase chain reaction for detecting the parasite in the blood of mice infected with different clonal genotypes. **Exp Parasitol**. 112:198-201, 2006.

FILARDI LS, BRENER Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 81: 755-759, 1987.

