

INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE TRIATOMÍNEOS POR *TRYPANOSOMA CRUZI*

Giullia Ferreira Iunklaus¹ (PIBIC/CNPq), Ana Paula de Abreu², Max Jean de Ornelas Toledo^{2,3}. E-mail: mjotoledo@uem.br

¹Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá- UEM.

²Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, UEM. ^{2,3}Departamento de Ciências Básicas da Saúde, UEM.

Ciências Biológicas, Parasitologia, Protozoologia de Parasitos

Palavras-chave: Competência vetorial, *Rhodnius robustus*, *R. pictipes*.

Resumo

A doença de Chagas (DC) é uma importante zoonose apresenta como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi* e como vetores insetos hematófagos, subfamília Triatominae, conhecidos popularmente como barbeiros. *Triatoma infestans*, principal vetor da DC, é originária da Bolívia e foi controlada no Brasil em 2006. No entanto, outras espécies secundárias e nativas, podem invadir o ambiente doméstico a partir do ambiente silvestre, e ocasionar novos casos de DC. **Objetivo:** Estudar a infecção experimental de espécies secundárias de triatomíneos por diferentes cepas de *T. cruzi*. **Material e métodos:** Foram avaliados grupos de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius robustus* e *R. pictipes*, infectadas com as cepas AM33 e AM14 de *T. cruzi*, respectivamente TcI e TcIV. O repasto infectante foi realizado em camundongos previamente inoculados. Após a alimentação em camundongo não infectado, um pool de excretas era examinado por exame a fresco, para avaliação da competência vetorial (eliminação de formas infectantes). A cada 30 dias após infecção (dai), um pool de conteúdo intestinal, obtido por dissecação de dois exemplares de cada grupo, era também examinado, para se determinar a suscetibilidade à infecção. **Resultados:** A positividade da cPCR para *R. robustus* e *R. pictipes* foi de 85 e 100%, respectivamente. Com a PCR-RFLP da COII foi possível identificar em *R. pictipes* somente a presença de TcI, no entanto, para *R. robustus* foi possível identificar tanto TcI quanto TcIV. Conclui-se que ambas as espécies de triatomíneos são susceptíveis a infecção por *T. cruzi* mas somente *R. robustus* tem competência vetorial para ambas DTU.

Introdução

Trypanosoma cruzi é o protozoário (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae) agente etiológico da doença de Chagas (DC), uma importante zoonose e que tem como vetores insetos hematófagos da família Reduviidae (COURA & BORGES-PEREIRA, 2012). Atualmente, infecta de 6-7 milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente na América Latina (WHO, 2018). Esse parasito compreende uma população amplamente heterogênea, sendo classificado em seis unidades de tipagens distintas (DTU, de TcI a TcVI), as quais podem apresentar distribuição geográfica diferente (ZINGALES et al. 2012). *T. cruzi* I é amplamente distribuído e associado ao ciclo de transmissão silvestre em toda área endêmica, incluindo a região norte do Brasil. Essa DTU já foi isolada de triatomíneos

pertencentes ao gênero *Rhodnius* e de marsupiais (*Didelphis* sp.) e, juntamente com TcIV, está relacionada a surtos de infecção oral na região Amazônica brasileira (MONTEIRO et al. 2012).

T. cruzi II (TcII) é uma DTU isolada com menos frequência no ciclo silvestre porém, é amplamente difundida em toda área endêmica e predominantemente encontrada nos países do Cone Sul da América do Sul, sendo isolada de pacientes na fase crônica e associada ao ciclo de transmissão doméstico (ZINGALES et al. 2012). Já TcIII, assim como TcIV, estão associados ao ciclo silvestre e são responsáveis por surtos de infecção oral, enquanto que TcV e TcVI são consideradas linhagens híbridas, pouco isoladas do ambiente silvestre, mas comumente encontradas em pacientes ao sul da América do Sul (ZINGALES et al. 2012).

Os insetos vetores de *T. cruzi* pertencem a ordem Hemiptera e subfamília Triatominae (hematófagos). *Triatoma infestans*, é o principal vetor da DC nos países do Cone Sul na América do Sul. Porém, em 2006, o Brasil recebeu o “Certificado Internacional de Interrupção da Transmissão vetorial da doença de Chagas por *Triatoma infestans*”, conferido pela Organização Pan-Americana da Saúde. Embora a transmissão por esta espécie tenha sido controlada no Brasil, espécies secundárias (*Panstrongylus megistus*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida*) encontradas no peridomicílio, passaram a ocupar o nicho deixado pelo *T. infestans* aumentando o risco de invasão/domiciliação dessas espécies, tornando-se importantes na epidemiologia da doença (WOLLMANN et al, 2015). Com isso, esse estudo poderá então fornecer informações importantes sobre a suscetibilidade a diferentes cepas de *T. cruzi* e sobre a competência vetorial dessas espécies de triatomíneos. Nesse contexto, nos propusemos estudar a suscetibilidade e competência vetorial de diferentes espécies de triatomíneos ao *T. cruzi* I e IV.

Materiais e Métodos

Aspectos éticos: O uso das cepas de *T. cruzi* obtida de humanos do Amazonas foi aprovado pelo comitê de ética da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (parecer número 360/07). O uso, manutenção e cuidados com os camundongos seguiram as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). A pesquisa recebeu parecer favorável da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UEM parecer nº 9659251017.

Grupos experimentais: As infecções experimentais de triatomíneos das espécies *R. pictipes* e *R. robustus* por *T. cruzi* I e IV da região Amazônica foram avaliadas. Para isso, foi utilizado um total de 120 ninfas de 5º estágio de cada espécie e duas cepas de *T. cruzi* pertencentes às unidades de tipagem distintas (DTU) TcI (AM33) e TcIV (AM14). As ninfas foram divididas em grupos de 20 insetos cada, totalizando seis grupos experimentais. Os grupos foram dispostos da seguinte forma: Grupo A (TcI); Grupo B (TcIV); Grupo C (TcI+TcIV) tanto para *R. pictipes* (Experimento 1) quanto para *R. robustus* (Experimento 2).

O repasto infectante dos insetos foi realizado através de alimentador artificial contendo sangue infectado com 5.600 tripomastigotas sanguíneos (TS) / 0,1 mL de sangue. Os triatomíneos foram alimentados durante um período total de 100 dias. A alimentação foi feita a cada 20 dias com sangue de camundongo não infectado e anestesiado com quetamina (100 mg / kg) + xilazina (5-10 mg / kg) (1:2), seguindo as diretrizes do CONCEA. Em seguida as excretas foram coletadas e examinadas pelo exame a fresco

para avaliação da competência vetorial (eliminação de formas tripomastigotas infectantes nas excretas). A cada 30 dias, durante um período de 120 dias, um *pool* de conteúdo intestinal (CI) obtido por dissecação de dois exemplares de cada grupo, era examinado para se determinar a suscetibilidade à infecção (presença de formas parasitárias no CI). A extração de DNA de *T. cruzi* das excretas e CI foi realizada pelo método de fenol/clorofórmio. A PCR convencional (cPCR) foi utilizada para detecção do *kDNA* e a PCR/RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) da citocromo oxidase II (COII) para genotipagem das DTU após digestão do *amplicon* com a enzima *Alu I*. Os fragmentos de DNA foram visualizados em gel de poliácridamida a 4,5 e 6%, revelados pela prata.

Resultados e Discussão

Não foi possível visualizar nenhuma forma parasitária pelo exame a fresco tanto em *R. pictipes* quanto tanto em *R. robustus*, em nenhum dos grupos experimentais: A (Tcl), B (TclV) e C (Tcl+TclV). No entanto, a cPCR mostrou-se positiva em todas as amostras analisadas (100%) dos grupos com *R. pictipes*, ou seja, foi detectado DNA de *T. cruzi* tanto nas excretas quanto no CI dessa espécie vetora com esta técnica (Fig 1.), confirmando a infecção por *T. cruzi*. Já a positividade da cPCR para *R. robustus* foi de 85%, não sendo possível detectar o DNA do parasito nas excretas aos 20 d.a.i do grupo A (Tcl) e no CI aos 30 d.a.i. do grupo C (Tcl+TclV). A PCR/RFLP da COII mostrou-se positiva apenas no CI, onde se observa maior número de formas parasitárias, possibilitando a detecção e a identificação das DTU presentes. Para *R. pictipes*, só foi possível identificar a DTU Tcl aos 30 d.a.i. (grupo A). No entanto, para *R. robustus* foi possível detectar e identificar tanto Tcl quanto TclV, para todos os grupos examinados (A, B e C). Porém, no grupo C do experimento 2, aos 30 e 90 d.a.i., não foi possível identificar a DTU. Já a presença de Tcl+TclV foi detectada aos 60 d.a.i. e de apenas TclV aos 120 d.a.i. Com isso, foi possível identificar Tcl e TclV, separadamente (em infecções puras) e, simultaneamente (nas infecções mistas com as duas DTU) em *R. robustus* enquanto que para *R. pictipes* foi possível identificar apenas Tcl. Estes resultados corroboram com Monteiro et al. (2012) que observaram a presença de Tcl e TclV em *R. robustus* e somente Tcl em *R. pictipes*, naturalmente infectados. Ao encontrarmos DNA do *T. cruzi* ao longo dos 120 d.a.i. (tanto na excretas quanto no CI), podemos sugerir que *R. robustus* e *R. pictipes* são suscetíveis à infecção por *T. cruzi* e apresentam competência vetorial. Isto confirma que essas duas espécies de triatomíneos são importantes vetores de *T. cruzi* na região Amazônica, já que esses triatomíneos fazem parte da fauna nativa dessa região.

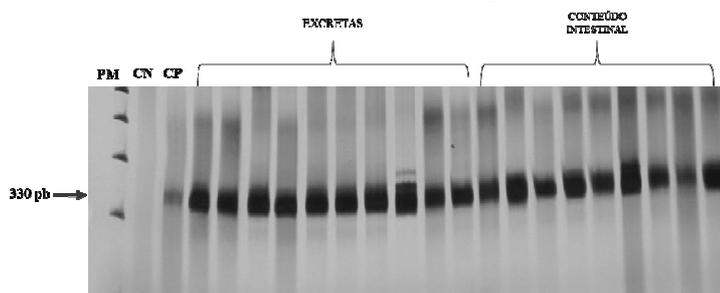


Fig 1. Gel de poliácridamida a 4,5% mostrando a amplificação do fragmento de 330 pb de DNA do minicírculo de *Trypanosoma cruzi* a partir das excretas e conteúdos intestinais de *Rhodnius pictipes*, confirmando a infecção. PM, peso molecular de 100 pb; CN, controle negativo; CP, controle positivo.

Conclusões

Pode-se concluir que a cPCR apresentou maior capacidade de detecção de DNA de *T. cruzi* em triatomíneos experimentalmente infectados do que a PCR/RFLP, independente do material biológico analisado, confirmando a suscetibilidade a infecção por *T. cruzi* das duas espécies de triatomíneos estudadas. No entanto, somente com a técnica da PCR/RFLP foi possível identificar quais DTU estavam presentes nas amostras de CI, e verificar que *R. robustus* apresenta competência vetorial para ambas as cepas estudadas (Tcl e TclV) e *R. pictipes* somente para Tcl.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. José Jurberg do Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) /Fiocruz pela concessão dos triatomíneos ao Setor de Parasitologia. À Fundação Araucária para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (10943812,251//2014) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (483469/2013-0) pelo apoio financeiro.

Referências

COURA JR & BORGES-PEREIRA J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45: p. 3. 2012.

MONTEIRO, W.M et al. 2012. *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute Chagas disease and infections by different haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. **Plos One** 7, e41284.

WOLLMANN, GEM. Estudo genotípico de seis cepas de *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida, trypanosomatidae) isoladas de exemplares de *Rhodnius montenegrensis*, *Triatoma rubrovaria* e *Triatoma sordida* (hemiptera, reduviidae). Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia Bioquímica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. Araraquara, 2015.

World Health Organization: WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2018. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> >. Acesso em 10 de abr. 2019.

ZINGALES, B et al. **Infection, Genetics and Evolution**. Elsevier, 12, 240–253, 2012.