

## COLEÇÃO DE TRIPANOSOMATÍDEOS DO SETOR DE PARASITOLOGIA/DBS/UEM

João Vitor de Souza Trovo<sup>1</sup> (PIC), Ana Paula de Abreu<sup>2</sup>, Ricardo Nascimento Drozino<sup>3</sup>, Max Jean de Ornelas Toledo<sup>2,3,4</sup>. E-mail: mjtoledo@uem.br

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá UEM.

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, UEM. <sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, UEM. <sup>4</sup>Departamento de Ciências Básicas da Saúde, UEM.

**Área e subárea do CNPq:** Parasitologia e Protozoologia de Parasitos.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*; Meios de cultura; Criopreservação.

### Resumo

As cepas *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (DC), são referenciadas como unidades de tipagem distintas (DTU) de TcI a TcVI, que podem estar associadas a diferentes aspectos clínicos e epidemiológicos da doença. A obtenção e caracterização de amostras de *T. cruzi* de diferentes hospedeiros é fundamental para subsidiar o tratamento e controle da DC. **Objetivo:** Obter, manter e catalogar em laboratório amostras (isolados e cepas) de *T. cruzi*. **Material e Métodos:** Amostras de *T. cruzi* existentes no laboratório obtidas a partir de mamíferos silvestres e domésticos, triatomíneos naturalmente infectados e pacientes com DC são mantidas em meios de cultura (LIT e NNN) e criopreservadas em nitrogênio. Animais mamíferos silvestres vêm sendo capturados e examinados por meio de hemoculturas (HC) para se obter novos isolados de *T. cruzi*. Excretas e conteúdo intestinal foram obtidos de triatomíneos capturados e examinados por meio de xenocultura e sangue foi coletado de humanos residentes no Paraná (PR). **Resultado:** Foram capturados 40 animais mamíferos de 11 espécies, provenientes de três municípios do PR e submetidos a HC. Foram coletados oito triatomíneos de quatro espécies provenientes do PR e de MG. Também foram examinadas cinco pessoas cuja moradia haviam sido encontrados triatomíneos. De seis insetos examinados, cinco estavam positivos para *T. cruzi* e todos os mamíferos estavam negativos. Portanto, nossa Coleção de Tripanosomatídeos continua, atualmente, com 3 cepas do parasito: Colombiana (TcI), Y (TcII) e AM14 (TcIV), nenhuma hemocultura realizada no período apresentou resultado positivo, impossibilitando a obtenção de novos isolados de *T. cruzi*.

### Introdução

*Trypanosoma cruzi* é um protozoário hemoflagelado, agente etiológico da doença de Chagas (DC). A infecção por este parasito, que pode levar à DC, é considerada uma zoonose que acomete cerca de 6-7 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2017). É a parasitose mais importante da América Latina com graves consequências para a saúde pública e economias nacionais (WHO, 2017). Os triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) são os hospedeiros intermediários e os mamíferos silvestres e domésticos, incluindo o homem, os hospedeiros vertebrados do parasito.

As cepas de *T. cruzi* são referidas por seis unidades de tipagem distintas (DTU), de *T. cruzi* I-VI as quais podem apresentar características biológicas, genéticas e

geográfica distintas. Após o controle da transmissão vetorial e transfusional da DC no Brasil e em outros países da América Latina, a aquisição da infecção pelo *T. cruzi* por via oral, através da ingestão de alimentos contaminados, passou a ser a forma de transmissão mais frequente atualmente (SHIKANAI-YASUDA & CARVALHO, 2012). A infecção no homem apresenta uma fase aguda, assintomática e caracterizada pela presença de parasitos na corrente sanguínea, e uma fase crônica caracterizada por baixa parasitemia que pode se manifestar nas formas indeterminada, cardíaca, digestiva e mista (WHO, 2017).

A caracterização biológica de cepas de *T. cruzi*, determinando a virulência, patogenicidade e resistência a droga, é importante para a medicina e permite a compreensão de aspectos clínicos e epidemiológicos da DC. Para isto é necessária a obtenção de amostras de *T. cruzi*, a partir de diferentes hospedeiros vertebrados e invertebrados. As amostras do parasito podem ser novos isolados ainda não submetidos à caracterização em laboratório, ou cepas, as quais já apresentam uma ou mais propriedade biológica conhecida. As amostras de *T. cruzi* existentes em nossa coleção poderão ser utilizadas na execução de novos projetos de pesquisa, dissertações e teses em diferentes programas de pós-graduação da nossa instituição, para estabelecer e consolidar parcerias com instituições de pesquisa nacionais e internacionais.

## **Materiais e Métodos**

**Aspectos éticos:** As cepas de *T. cruzi* são mantidas em culturas e criopreservadas em nitrogênio (N<sub>2</sub>) líquido, e também por meio de passagens sanguíneas em camundongos. O uso, manutenção e cuidados com os camundongos seguiram as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UEM (parecer nº 9659251017) e pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (COPEP) da UEM (parecer nº 2.627.127). A captura e a coleta de amostras biológicas dos animais selvagens foram autorizadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (licença número SISBIO 42881).

**Isolamento de *T. cruzi*:** As amostras de sangue de humanos e de animais foram colhidas por meio de punção venosa e acondicionadas em tubos Vacutainer® com EDTA-K3, para hemocultura em meio de Novy MacNeal e Nicolle (NNN) e meio *Liver Infusion Tryptose* (LIT). As hemoculturas (HC) foram estocadas em estufas B.O.D. e analisadas a cada 15 dias por até 120 dias (FILARDI & BRENER 1987). O isolamento de *T. cruzi* a partir de triatomíneos naturalmente infectados foi realizado através da dissecação do conteúdo intestinal, coletado em solução salina a 0,9% antes de ser adicionado em meio LIT para obtenção dos isolados através de xenocultura (XC). As XC foram examinadas quinzenalmente por um período de até 90 dias, e quando positiva, o isolado obtido era preservado em N<sub>2</sub>.

**Manutenção das amostras de *T. cruzi* em meio de cultura:** Cepas de *T. cruzi* foram obtidas de outras instituições de pesquisa parceiras, para a atualização da nossa coleção. Estas cepas foram expandidas em cultura com meio LIT, as quais eram repicadas a cada 48/72 horas, dependendo do tempo de duplicação dos parasitos da amostra, durante a fase de crescimento exponencial da cultura.

Congelamento e manutenção em nitrogênio líquido: Após a expansão, as culturas contendo os parasitos eram criopreservadas e mantidas em N<sub>2</sub> (-196 °C). As amostras expandidas foram inicialmente centrifugadas para a concentração dos parasitos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo os parasitos era transferido para criotubos e adicionado com 10% de criopreservante (DMSO ou glicerina). Em seguida os criotubos eram mantidos no freezer -80 °C por 24 horas e, posteriormente, transferidos para o N<sub>2</sub> líquido, conforme descrito por Galvão & Brener (1981).

## Resultados e Discussão

Foram capturados 40 animais mamíferos silvestres (morcegos, gambá, raposa, tatu e roedor), potenciais reservatórios de *T. cruzi* e de outros tripanosomatídeos, pertencentes a 11 espécies, *Artibeus lituratus* (10 exemplares), *Sturnira lilium* (6), *Didelphis albiventris* (5), *Cerdocyon thous* (4), *Rattus rattus* (4), *Carolia perspicillata* (3), *Sturnira tildae* (3), *Platyrrhinus lineatus* (2), *Dasyopus novemcinctus* (1), *Vampyressa pusilla* (1) e *Myotis* sp. (1), e cinco ordens distintas (Chiroptera, carnívora, cingulata, didelphimorphia e rodentia). Estes animais foram capturados no distrito de Iguatemi e no Parque do Ingá no Município de Maringá, na estrada para Polinópolis em Mandaguaçu, e no distrito de Água Boa em Paçandu, Paraná (PR).

Foram coletados triatomíneos provenientes do intra e peridomicílio de localidades dos municípios de Janiópolis, Amaporã e Paçandu (distrito de Água Boa) (PR) e de ambiente silvestre do município de Jaboticatubas (Minas Gerais) pertencentes a quatro taxa (espécies e gênero): *Panstrongylus megistus* (5), *P. geniculatus* (1), *Cavernicola pilosa* (1) *Triatoma* sp. (1). Destes, foram submetidos ao exame a fresco e XC, 5 exemplares de *P. megistus* e 1 exemplar de *P. geniculatus*. Os demais exemplares se encontravam ressecados impossibilitando a coleta de material biológico para exame. Todos os insetos da espécie *P. megistus* (1 fêmea e 4 ninfas) estavam positivos no exame a fresco, com aproximadamente 3,0 x 10<sup>5</sup> parasitos / 0,1 mL de material biológico. No entanto, não foi possível isolar o *T. cruzi* por meio de XC devido a contaminação por fungos e bactérias presente no conteúdo intestinal dos insetos. O único exemplar de *P. geniculatus* capturado, um inseto adulto encontrado no intradomicílio, estava negativo para *T. cruzi*, tanto no exame a fresco quanto na XC.

*P. megistus* é considerada uma espécie domiciliada em algumas localidades do Brasil, podendo apresentar elevada taxa de infecção por *T. cruzi* (87.9%), e é amplamente difundida em todo território brasileiro, incluindo o Paraná (Coura & Borges-Pereira, 2012). *P. geniculatus* é uma espécie de triatomíneo considerada silvestre, associada a toca de tatu e apresenta baixa taxa de infecção (4,7%) (SHERLOCFC & SERAFIM, 1974; JANSEN et al. 2010). No entanto, é encontrado com frequência no intradomicílio, junto com *P. megistus*.

Também foram coletadas amostras de sangue de cinco pessoas de uma mesma família provenientes do município de Mandaguari (PR) em cuja residência, no intradomicílio, haviam sido encontrados, pela equipe da Funasa, 10 insetos da espécie *P. megistus* dos quais 7 (70%) estavam infectados por *T. cruzi*. As HC realizadas apresentaram resultado negativo, não sendo visualizadas formas parasitárias (epimastigotas e tripomastigotas) de *T. cruzi*. Este resultado foi confirmado por sorologia, PCR e qPCR.

Durante o período de execução deste projeto, foram doadas para a nossa coleção, oito cepas de *T. cruzi* de diferentes DTU: Colombiana e PR150 (Tcl); BS48, Be62 e

Be78 (TcII), AM14 (TcIV), SC43 cl1 (TcV) e CL (TcVI). Porém devido ao estresse do transporte e à contaminação, conseguimos manter apenas 2 delas viáveis em meio LIT, até a fase exponencial de crescimento: as cepas AM14 e Colombiana. Esta duas últimas cepas, juntamente com a cepa Y (TcII), estão armazenadas e criopreservadas em nosso laboratório, conforme descrito por Galvão & Brener (1981).

### Conclusões

Embora tenham sido capturados e examinados 40 animais silvestres e oito triatomíneos, e examinados cinco pessoas para a presença de *T. cruzi*, somente cinco insetos da espécie *P. megistus* se encontravam positivos. Até o momento, nenhuma hemocultura apresentou resultado positivo, impossibilitando a obtenção de novos isolados a partir de animais silvestres e de humanos. Atualmente, temos três amostras do parasito em nossa coleção, Colombiana (TcI), Y (TcII) e AM14 (TcIV), que foram doadas por instituições parceiras.

### Agradecimentos

Os autores agradecem à UEM pelo financiamento da pesquisa e às professoras Dra. Marta de Lana e Dra. Maria Terezinha Bahia, da Universidade Federal de Ouro Preto, pelas cepas de *T. cruzi* doadas.

### Referências

FILARDI, L.S. & BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, p. 755-759, 1987.

GALVÃO, L.M.C; BRENER, Z. Criopreservação das formas de cultura do *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 76, n. 3, p.247-257, 1981.

JANSEN, A.M. & ROQUE, A.L.R. Domestic and wild Mammalian Reservoirs in: Telleria J, Tibayrenc M, editors. American trypanosomiasis: Chagas disease one hundred years of research. **Elsevier**. 2010; cap.11, p. 255–257.

SHIKANAI-YASUDA, M.A & CARVALHO, N.B. Oral transmission of Chagas disease. **Clinical Infectious Diseases**, v.54, n.6, p. 845-852, 2012.

World Health Organization: WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2018. Disponível em:< <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em 11 abr. 2019.