

TENTATIVAS DE CRIAÇÃO DE TRIATOMÍNEOS EM LABORATÓRIO POR MEIO DE ALIMENTAÇÃO "IN VITRO"

Hertha Barbara Wüllert Telles de SOUZA (1), Vicente AMATO NETO (1), Lucia Maria Almeida BRAZ (1), Antonio Augusto Baillet MOREIRA (1), Clovis Kiomitsu TAKIGUTI (2), Rubens CAMPOS (1) & Luís MATSUBARA (1)

RESUMO

Para simplificar a criação de triatomíneos em laboratório, necessária, por exemplo, à execução do xenodiagnóstico e em estudos de caráter biológico, foi tentada alimentação "in vitro", mediante emprego de sangue, citratado ou desfibrinado, de galinhas abatidas em matadouro avícola. Para avaliação da eficácia desse propósito, observações de duas naturezas, com *Triatoma infestans*, tiveram lugar, através das seguintes medidas; a) análise do encadeamento de estádios ninfais sucessivos e da exequibilidade de satisfatórios acasalamentos, oviposição fértil e adequada reprodução; b) apreciação da infectividade e da viabilidade do *Trypanosoma cruzi* nos insetos. Como conclusão, ficou evidente que, a despeito da facilitação operacional, o intuito não conduziu ao êxito desejado, já que o procedimento clássico, usado como controle, mostrou-se sempre superior.

UNTERMOS: Criação de triatomíneos; Alimentação "in vitro"; Desenvolvimento; Infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

INTRODUÇÃO

O xenodiagnóstico é procedimento que pode propiciar seguro reconhecimento etiológico quanto à doença de Chagas, uma vez que mostra a participação do *Trypanosoma cruzi*, responsável por essa protozoose. Na fase aguda da enfermidade quase sempre revela a presença do flagelado no sangue e, na crônica, possui eficácia menor, mas ainda útil em várias circunstâncias, sendo por exemplo, atualmente, essencial quando desejado o controle de tratamento específico, em tarefas clínicas ou relacionadas com investigações científicas².

Tal modalidade de exame ainda não foi alvo de padronização definitiva, pois alguns aspectos, como o melhor número de insetos, a conveniência de realimentação, a escolha da espécie mais eficiente, o oportuno momento para a procura do

tripanossomo e a conveniente maneira a adotar para detectar o parasita, dependem de consenso final.

A utilidade do xenodiagnóstico esbarra em razoável dificuldade, representada pela necessidade de criação dos triatomíneos, dependente de infraestrutura ambiental e obrigatoriedade de alimentação, habitualmente realizada em aves.

Convém lembrar, construtivamente, que a despeito de percalços, a criação em apreço enseja pesquisas referentes ao ciclo biológico do transmissor da enfermidade endêmica e, também, às interações dele com o agente causal.

Em tentativa de atenuar obstáculos, julgamos

Laboratório de Investigação Médica-Parasitologia do Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

(1) Laboratório de Investigação Médica-Parasitologia.

(2) Departamento de Medicina Preventiva, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Endereço para correspondência: Hertha Barbara Wüllert Telles de Souza. Laboratório de Investigação Médica-Parasitologia. Avenida Doutor Arnaldo, 455. CEP 01245 São Paulo, SP, Brasil.

válido verificar se repasto praticado em laboratório, com sangue obtido em matadouro avícola e ingerido através de xenodiagnóstico artificial ou "in vitro", é confiável. Para tanto, consumado tal tipo de alimentação, usamos metodologia delineada para avaliação do desenvolvimento dos insetos e de repercussões, neles, da infecção pelo *T. cruzi*.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenvolvemos o estudo em duas etapas: A) análise da influência da natureza da alimentação sobre a evolução dos triatomíneos; B) apreciação de eventual interferência do repasto "in vitro" na infecção dos insetos pelo *T. cruzi*.

Usamos sempre ninfas de primeiro estágio do *Triatoma infestans*, recorrendo à uma linhagem mantida no Laboratório de Entomologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Empregamos exemplares em número inicial de 150 para cada fase, distribuídos equitativamente nas três formas de alimentação e mantidas, sistematicamente, em ambiente com temperatura de 28° C e umidade de 76-77%, empregando cristalizadores adaptados a suportes adequados.

Alimentamos de três formas: a) a título de controle, como faz-se habitualmente, em aves; de início valemo-nos de pombos e, depois, de galinhas; b) com sangue de galinha, obtido em seguida ao abate e colocado em frasco com citrato de sódio a 3,8%, de acordo com a proporção de uma parte do anticoagulante para nove; c) com sangue conseguido como em b e desfibrinado mediante cerca de dez minutos de agitação com "pérolas" de vidro.

Para cumprir a fase A, providenciamos repasto de quinze minutos a cada quinze dias, no decurso de onze meses. Excetuados os triatomíneos que sugaram aves, os demais ingeriram sangue por xenodiagnóstico artificial, praticado com membrana "Magipack"^{1,4}. Em todas as ocasiões de alimentação anotamos os óbitos e as mudas para estádios seguintes, até o surgimento de adultos, registrando após o aparecimento de ovos e a vibialidade deles, indicada pelo nascimento de ninfas.

A efetivação da fase B dependeu de jejum de trinta dias de ninfas de terceiro ou quarto estágio

do *T. infestans*, seguido de três refeições quinzenais conforme a, b e c, infectante em camundongos agudamente parasitados pela cepa Y do *T. cruzi*³. Passados trinta dias, examinamos, individualmente, as fezes dos insetos remanescentes para detecção do protozoário e, depois de período igual, agimos da mesma forma, mas além das verificações singulares, constituímos "pool" de macerado intestinal da totalidade dos triatomíneos positivos, em solução fisiológica estéril, a fim de inoculá-lo, pela via intraperitoneal, em camundongos Balb-C, cujos sangues retirados das caudas prestaram-se, sete, 14 e 21 dias mais tarde para procura do flagelado. Seis animais fizeram parte da experiência, ou seja, dois correspondentes às modalidades de alimentações a, b, e c.

Esclarecemos que os sangues conseguidos no matadouro foram, sempre, aproveitados dentro do período máximo de uma hora e que a desfibrinação era feita nas dependências deste último. Logicamente, para os diferentes repastos havia oferta de novos nutrientes recentemente colhidos de galinhas sacrificadas.

RESULTADOS

No que diz respeito a parte A, concernente aos estádios ninfais, sinteticamente consignamos a seguir o que notamos. As seqüências de três comprovações mantêm nexos respectivamente com controle e sangues citratado ou desfibrinado.

- Ninfas de segundo estágio: começamos a encontrá-las na segunda quinzena em todos os grupos; perduraram por 14, cinco e sete quinzenas (Gráfico 1).

- Ninfas de terceiro estágio: começamos a encontrá-las na segunda, terceira e terceira quinzenas; perduraram por 16, dez e dez quinzenas (Gráfico 2).

- Ninfas de quarto estágio: começamos a encontrá-las na quarta, quinta e quinta quinzenas; perduraram por 19, 12 e 11 quinzenas (Gráfico 3).

- Ninfas de quinto estágio: começamos a encontrá-las na oitava, décima e sétima quinzenas; perduraram por 15, seis e 11 quinzenas (Gráfico 4).

Computamos os óbitos de ninfas, cumulativamente, nas observações quinzenais sucessivas e segundo os grupos, sem levar em conta os estádios evolutivos (Gráfico 5).

Detalhes acerca da diferenciação sexual fazem parte da Tabela 1, na qual percebe-se claramente quando compareceram insetos machos ou fêmeas. Achamos ovos na vigésima e na vigésima-segunda semanas, respectivamente, nos conjuntos de controle ou de sangue desfibrinado. Maturidade e conseqüente produção de ovos não sobrevieram no que concerne aos triatomíneos que ingeriram o alimento citratado.

Focalizada a parte B, registramos o que adiante encontra-se especificado.

- Controle: 26 espécimens vivos aos 30 dias, portanto com 48% de óbitos; entre eles, 18 infectados pelo *T. cruzi* (69%); 20 vivos aos 60

dias, portanto com 60% de óbitos, globalmente; entre eles, 16 infectados (80%).

- Sangue citratado: 25 espécimens vivos aos 30 dias, portanto com 50% de óbitos; entre eles, 13 infectados pelo *T. cruzi* (52%); 16 vivos aos 60 dias, portanto com 60% de óbitos, globalmente; entre eles, oito infectados (50%).

- Sangue desfibrinado: 20 espécimens vivos aos 30 dias, portanto com 60% de óbitos; entre eles, sete infectados pelo *T. cruzi* (35%); 19 vivos aos 60 dias, portanto com 62% de óbitos, globalmente; entre eles, quatro infectados (21%).

No sangue caudal da totalidade dos camundongos inoculados com "pool" de fezes dos triatomíneos positivos para cada modalidade de alimentação, evidenciamos tripanossomos em análises microscópicas efetuadas sete, 14 e 21 dias após.

Gráfico 1 - Densidade populacional de ninfas de segundo estágio, considerados os diversos períodos de observação e os três Grupos.

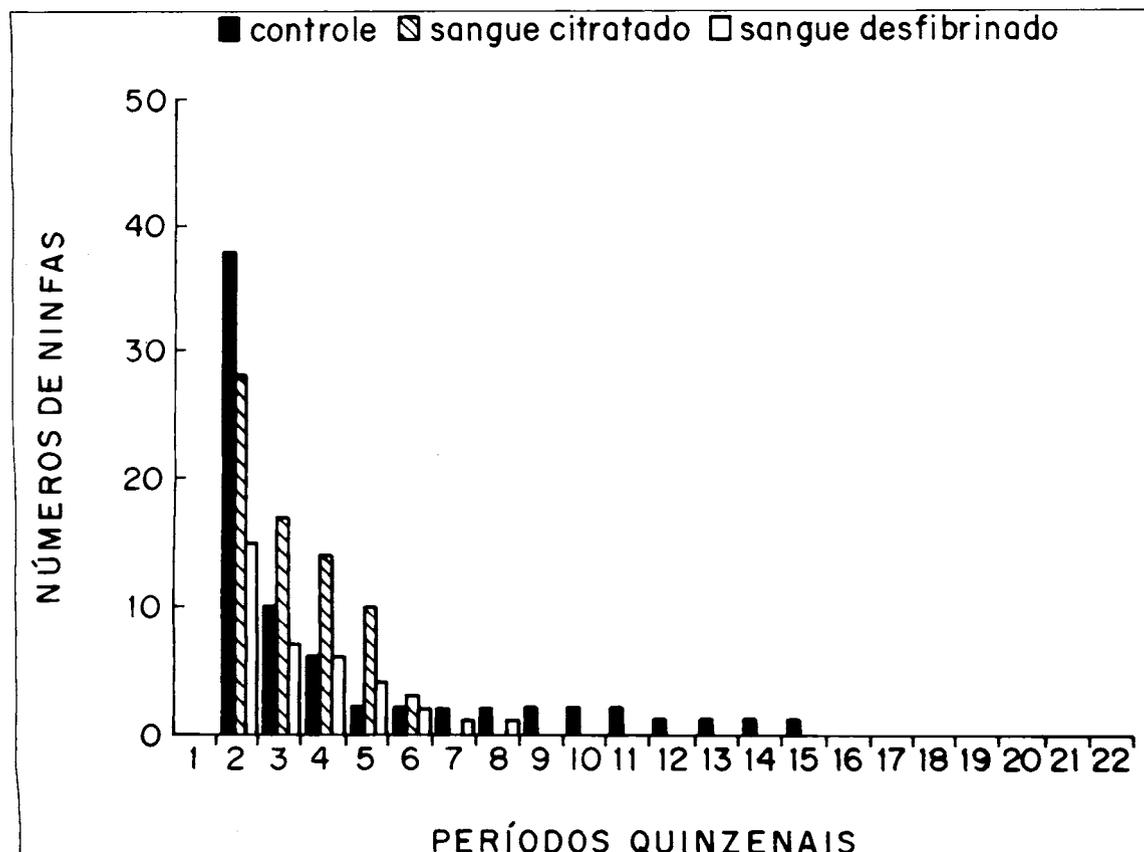


Gráfico 2 - Densidade populacional de ninfas de terceiro estágio, considerados os diversos períodos de observação e os três Grupos.

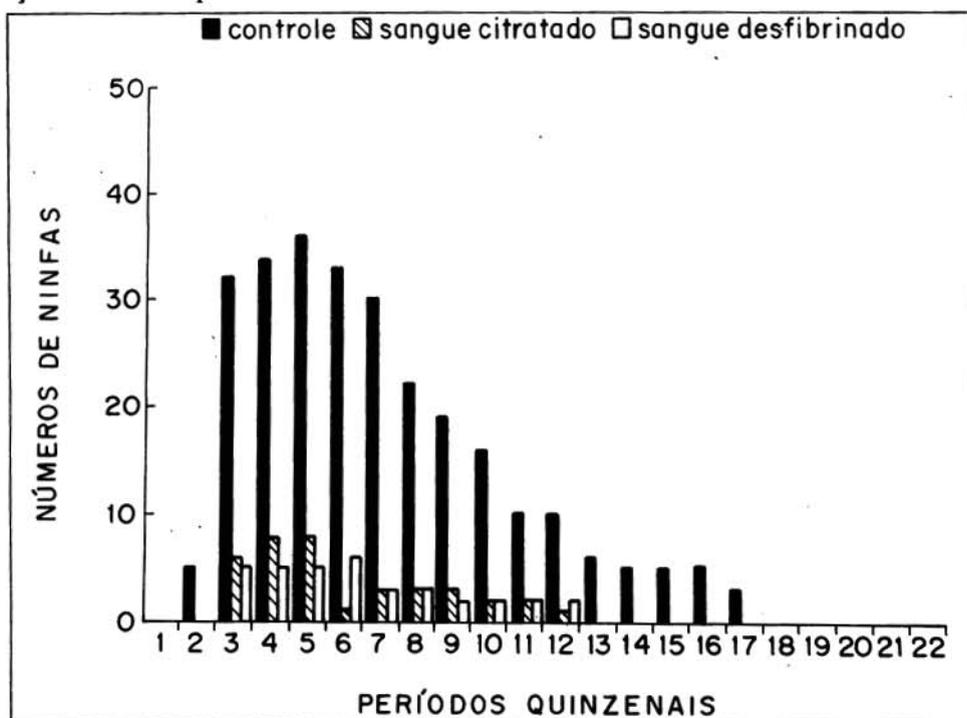


Gráfico 3 - Densidade populacional de ninfas de quarto estágio, considerados os diversos períodos de observação e os três Grupos.

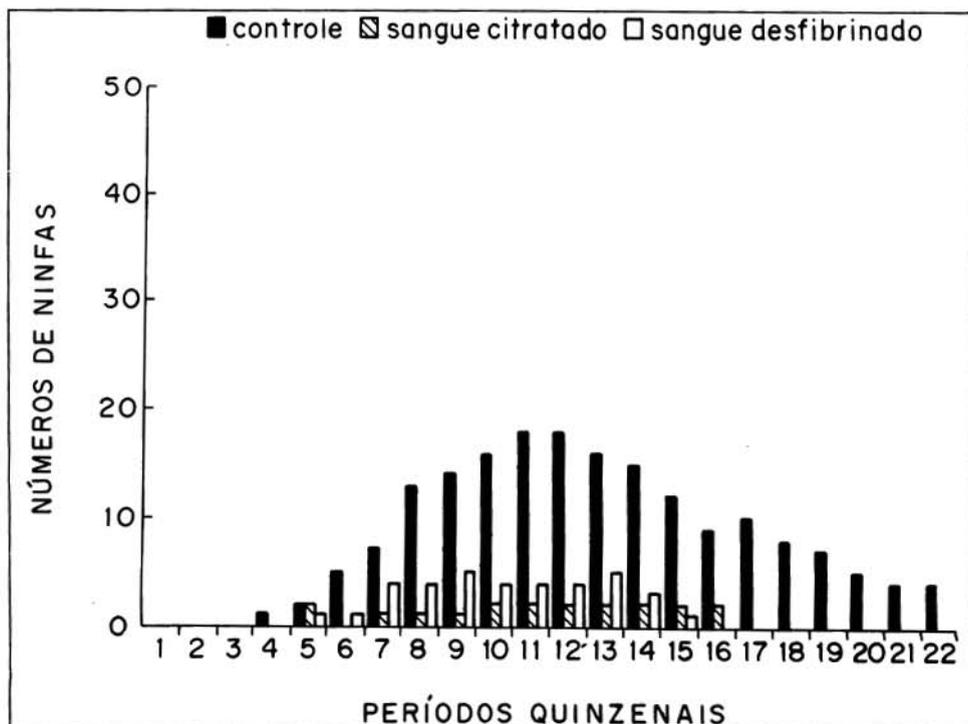


Gráfico 4 - Densidade populacional de ninfas de quinto estágio, considerados os diversos períodos de observação e os três Grupos.

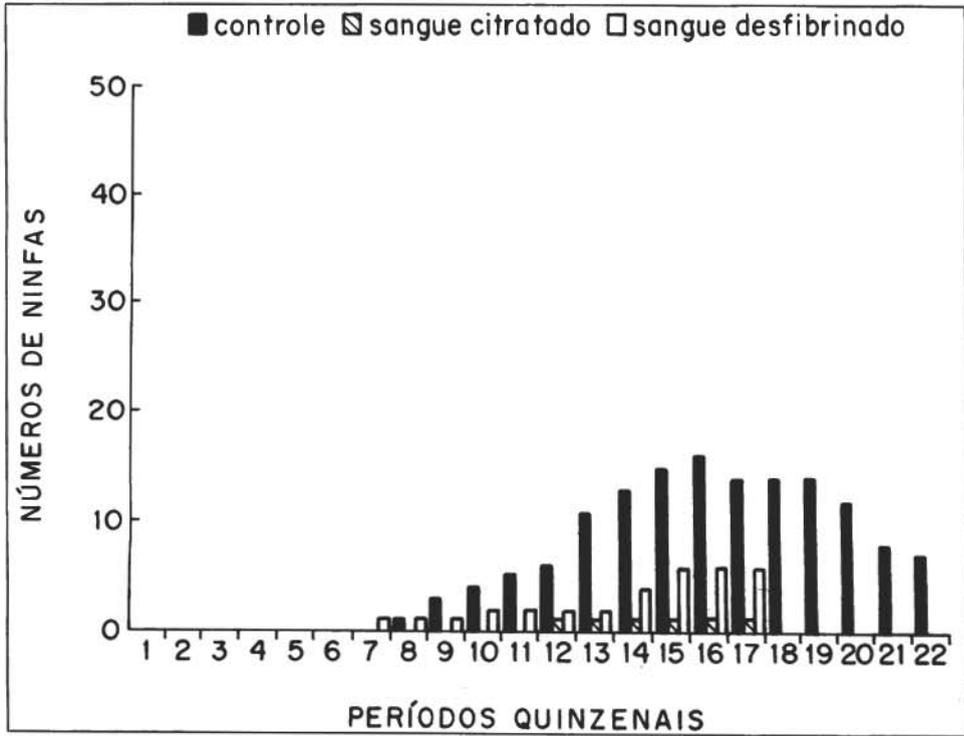


Gráfico 5 - Quantidades acumuladas de óbitos de ninfas, considerados os três Grupos.

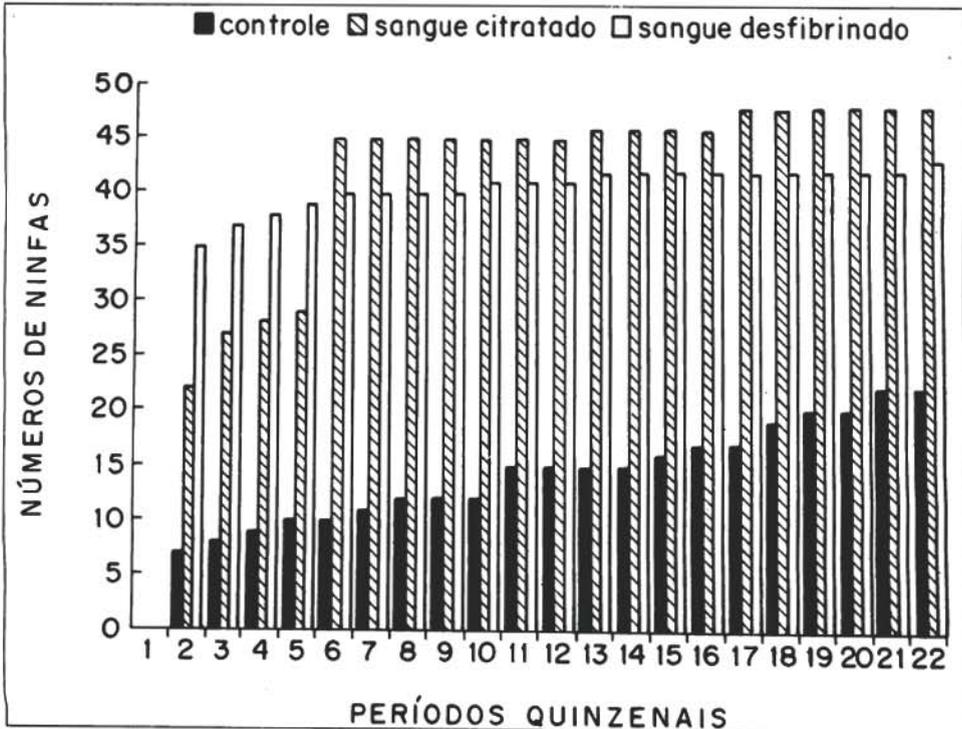


TABELA 1

Quantidades de exemplares adultos, machos ou fêmeas, nos três Grupos considerados, conforme os períodos de observação.

Períodos quinzenais	Número de triatomíneos conforme os Grupos					
	Controle		Sangue Citratado		Sangue Desfibrinado	
	M	F	M	F	M	F
13 ^o		1				
14 ^o		1				
15 ^o		1				
16 ^o	1	2			1	
17 ^o	2	4			1	
18 ^o	3	6			3	4
19 ^o	3	6			3	4
20 ^o	5	8			3	4
21 ^o	6	10			3	4
22 ^o	7	10			2	4

M: machos; F: fêmeas

DISCUSSÃO

Os Gráficos, referentes às densidades populacionais nas diversas etapas, demonstram, nos três Grupos considerados, gradativa evolução ninfal, com início do aparecimento de exemplares de segundo estágio a partir da segunda quinzena, evidenciando-se desde logo, em todas as fases, a superioridade do controle. Por outro lado, a apuração dos números de óbitos, quando empregados sangue citratado ou desfibrinado, em confronto com os valores atinentes ao parâmetro, revela cifras bem maiores e mais proeminentes se usado o sal anticoagulante. Esses fatos, sem dúvida, falam a favor de menor capacidade biológica, em termos de reprodução, das duas novas maneiras de alimentação sob avaliações.

Nessa parte da experimentação, portanto, tornou-se patente a melhor performance da criação de triatomíneos conforme os moldes clássicos, que enseja bom encadeamento de estádios sucessivos, com exequibilidade de satisfatórios acasalamento e ovoposição fértil, permitindo então adequada e desejada reprodução.

Não notamos elementos, na segunda parte da pesquisa, capazes de diferenciar a infectividade e a viabilidade do *T. cruzi*, ao ser apreciado o que passou a propósito dos três Grupos considerados, impondo-se destaque à constatação de que houve positividade em todos.

O que apuramos, a despeito da simplificação

operacional propiciada pela alimentação artificial, em insetário, conduz à conclusão de que a intenção não atende aos objetivos principais da criação de triatomíneos em laboratório e, por isso, desaconselha, por enquanto, adoção rotineira. O tema, inegavelmente, tem vínculo com praticidade, devendo estimular novas especulações, complementares ou calcadas nas que empreendemos.

SUMMARY

Attempts for breeding triatominae in laboratory by means of "in vitro" feeding

In order to simplify breeding of triatominae in the laboratory, for performing xenodiagnosis and other biologic studies, we tried to feed the insects "in vitro" with citrated or defibrinated blood from commercially abated chicken. Two types of efficacy observations were carried out with *Triatoma infestans*: a) analysis of the chaining of successive nymphal stages, viability of satisfactory matching, fertile oviposition and adequate reproduction; b) assessment of viability and infectivity of *Trypanosoma cruzi* in the insects. As a conclusion, it became evident that, despite operational easiness, the objectives were not achieved, since the classical procedure used as the control, was always superior.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMPOS, R.; AMATO NETO, V.; MATSUBARA, L.; MOREIRA, A.A.B.; & PINTO, P.L.S. - Estudos sobre o xenodiagnóstico "in vitro". I - Escolha de anticoagulante e de membrana. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo*, 43: 101-103, 1988.
- RASSI, A.; PORTO, C.C. & REZENDE, J.M. - Doença de Chagas. In: AMATO NETO, V. & BALDY, J.L., ed. *Doenças transmissíveis*. 3^a ed. rev. ampl. São Paulo, Sarvier, 1989. p. 247-263.
- SILVA, L.H.P. & NUSSENZWEIG, V. - Sobre uma cepa do *Trypanoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia clín. biol. (São Paulo)*, 20: 191-208, 1953.
- SOUZA, H.B.W.T.; MOREIRA, A.A. B.; MATSUBARA, L.; CAMPOS, R.; AMATO NETO, V.; PINTO, P.L.S. & TAKIGUTI, C.K. - Estudo sobre o xenodiagnóstico "in vitro". II - Comparação com o "in vivo". *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo*, 43: 165-167, 1988.

Recebido para publicação em 23/11/1990
Aceito para publicação em 18/4/1991