

TENTATIVA DE DESENVOLVIMENTO DE FORMAS ERITROCITÁRIAS DE *PLASMODIUM BRASILIANUM* IN VITRO

Salma G. Oliveira¹, Álvaro A. Couto¹, Marco Antônio V. Santos¹ e Virgílio E. do Rosário²

Sabe-se que nem todas as espécies de plasmódios se adaptam às condições de cultivo contínuo *in vitro*. Na malária humana, por exemplo, o *Plasmodium falciparum* é a única espécie que apresenta excelente adaptação. Em primatas, resultados satisfatórios foram obtidos em macacos do Velho Mundo, com a adaptação do *P. inui*, *P. cynomolgi* e *P. fragile* ao cultivo *in vitro*^{2 4 5}.

Recentemente, durante a operação de resgate e salvamento da Usina Hidrelétrica de Tucuruí-PA, várias espécies de macacos do Novo Mundo, pertencentes aos gêneros *Alouatta*, *Callicebus*, *Saimiri*, e *Saguinus*, foram encontrados com infecção natural causada por *P. brasilianum*. Em *Saguinus*, não havia sido anteriormente detectada infecção natural na América do Sul¹.

Devido à suscetibilidade do homem aos plasmódios de macacos, demonstrada por meio de infecções experimentais ou, mais raramente, através de infecções naturais³, nos propusemos a adaptar o *P. brasilianum* ao cultivo contínuo *in vitro*, objetivando sua posterior caracterização através da análise enzimática, assim como pela diversidade antigênica utilizando-se anticorpos monoclonais, em face da semelhança morfológica e antigênica deste plasmódio com o *P. malariae*, que é uma das espécies causadoras da malária humana.

Três animais da espécie *Alouatta belzebul* com infecção comprovada através de esfregaço e gota espessa, corados pelo método de Giemsa, foram selecionados no Centro de Triagem instalado na área de enchimento do reservatório da Usina Hidrelétrica de Tucuruí, PA, e transferidos para o laboratório do Programa Malária do Instituto Evandro Chagas, em Belém.

Os espécimes foram esplenectomizados a fim de que fosse mantida e conseqüentemente aumentada a parasitemia original.

1. FSESP - Instituto Evandro Chagas, Av. Almirante Barroso 492 - 66000 Belém, PA.

2. Atualmente fixado no Biomedical Research Institute - Maryland - USA.

Apoio Financeiro: FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos e SUCAM - Superintendência de Campanhas de Saúde Pública.

As amostras utilizadas para a adaptação ao cultivo contínuo foram isoladas no 39º dia após a esplenectomia, momento em que apresentavam parasitemia em torno de 1%, com parasitas nos estágios de trofozoítas, esquizontes e gametócitos, observando-se predominância das formas de trofozoítas jovens.

O sangue infectado foi obtido por punção endovenosa, com seringa heparinizada, posteriormente lavado duas vezes com meio RPMI 1640 (Gibco) sem soro. Às hemácias lavadas foi adicionado o meio completo, RPMI 1640, tamponado com HEPES 25 mM (Sigma) + NaHCO₃ a 5% (Sigma), suplementado com soro humano a 10% ou com plasma de macaco *A. belzebul* a 10%, enriquecido com insulina 80 U em uma proporção de 0,2 U/ml, obtendo-se uma suspensão final com hematócrito de 5%. Em seguida, essa suspensão foi distribuída em placas de Petri (15 mm) e incubadas a 37°C, de acordo com o método clássico descrito por Trager & Jensen⁶, utilizando-se o sistema de dessecador com vela para obtenção da tensão de CO₂ adequada.

O meio de cultivo foi substituído duas vezes por dia e em intervalos de 8 horas, esfregaços foram feitos para a observação do desenvolvimento dos parasitos nas condições de cultivo.

Os parasitos cultivados em meio RPMI 1640 suplementado com plasma de *A. belzebul* mostraram melhor aspecto morfológico que os submetidos às mesmas condições, porém, com meio suplementado com soro humano.

Os resultados observados após 96 horas de cultivo contínuo, permitiram acompanhar a evolução dos parasitas do estágio de trofozoito à esquizontes. Contudo, não ocorreu a rotura das hemácias parasitadas com esquizontes maduros, conseqüentemente não houve liberação dos merozoítos para a reinvasão de novos eritrócitos.

Em função do retardamento da rotura das hemácias parasitadas, observou-se crescimento dos merozoítos no interior dos eritrócitos, seguido da interrupção do desenvolvimento dos parasitos.

Os esquizontes nas condições de cultivo, apresentavam-se com 4 a 6 núcleos, enquanto que *in vivo* apresentavam-se em média com 8 núcleos.

Nossos resultados demonstraram um evidente desenvolvimento dos parasitas da fase de trofozoítas até esquizontes. Entretanto, por razões ainda não esclarecidas não houve a rotura desses esquizontes, conseqüentemente impedindo a continuidade do ciclo,

uma vez que não se deu a reinvasão de novas hemácias pela não liberação de merozoítos.

Acreditamos que, com a continuidade desse trabalho, possivelmente introduzindo-se algumas modificações na metodologia, seja possível a adaptação do *P. brasilianum* em cultivo contínuo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arruda ME. Presença do *Plasmodium brasilianum* em macacos capturados na área de enchimento do reservatório da usina hidrelétrica de Tucuruí, Pará. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 80: 367-369, 1985.
2. Collins WE, Chin W, Skinner JC. *Plasmodium fragile* and *Macaca mulata* monkeys, of a model system for the study of malaria vaccines. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 28:948-954, 1979.
3. Deane LM, Neto JAF, Okumura M, Ferreira MO. Malaria parasites of Brazilian monkeys. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 11: 71-86, 1969.
4. Nguyen-Dinh P, Campbell CC, Collins WE. Cultivation *in vitro* of the quartan malaria *P. inui*. *Science* 209:1249-1251, 1980.
5. Nguyen-Dinh P, Gardner AL, Campbell CC, Skinner JC, Collins WE. Cultivation *in vitro* of the vivax - type malaria parasite *P. cynomolgi*. *Science* 212:1146-1148, 1981.
6. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193:673-675, 1976.