

CARACTERIZAÇÃO MORFO-BIOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DE DIFERENTES CÊPAS DO TRYPANOSOMA CRUZI

SÔNIA G. ANDRADE

MARIA LUIZA CARVALHO

ROZÁLIA M. FIGUEIRA

RESUMO

Três cêpas de *Trypanosoma cruzi*, de diferentes procedências (cêpa Peruana, cêpa Colombiana e cêpa São Felipe — Bahia) foram estudadas de acôrdo com os seus caracteres biológicos, morfológicos e quanto às lesões histopatológicas que determinaram no animal experimental. Foi demonstrado que as mesmas, além de diferirem no seu comportamento no animal experimental quanto à patogenicidade, às curvas de mortalidade e de parasitemia, também mostravam padrões morfológicos diversos e produziam diferentes lesões tissulares. Foi verificada nítida correlação entre os diversos caracteres de uma mesma cêpa, observando-se coincidência entre rápida multiplicação parasitária, reticulotropismo e presença predominante de formas delgadas no início da infecção, por um lado, e multiplicação parasitária lenta, miotropismo e predominância de formas largas, por outro.

Podemos concluir que, para a caracterização de cêpas do *Trypanosoma cruzi*, diversos caracteres devem ser estudados em conjunto, no sentido de se estabelecerem "padrões" das cêpas existentes.

As referências que têm sido feitas a diferentes "cêpas" do *Trypanosoma cruzi*, em geral se baseiam em caracteres isolados, como por exemplo a virulência e a patogenicidade (3, 8, 9), o tropismo para diferentes tecidos (7, 9, 17), os caracteres morfológicos (4, 5, 18) e caracteres antigênicos (13, 14, 15). Também foi verificado que cêpas de *T. cruzi* com caracteres biológicos diferentes determinavam lesões histopatológicas diversas no animal experimental, não só na fase aguda (1) como na fase crônica (2) da infecção.

Dispondo de cêpas de procedências diferentes, procuramos estudá-las levando em conta não apenas um, mas o maior número possível de caracteres peculiares a cada uma. Os aspectos biológicos (evolução da infecção no animal experi-

mental, curvas parasitêmicas, mortalidade); a morfologia do parasito no sangue periférico, (predominância de formas largas ou delgadas nas diversas fases da infecção) e as lesões tissulares determinadas no animal, foram os diversos elementos levados em conta no presente trabalho. Procuramos demonstrar assim que, ao invés de dados isolados, seria mais conveniente a soma de diversos elementos para a caracterização mais precisa de uma determinada cêpa de *Trypanosoma cruzi*. Tentamos também investigar o possível significado dêstes elementos e suas intercorrelações.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados camundongos brancos, de linhagem não determinada, pesando entre 10 e 12 g.

As cêpas de *T. cruzi* estudadas, com diferentes procedências, foram as seguintes: a) *cêpa peruana*, isolada de caso humano do Perú, inicialmente estudado do ponto de vista antigênico por Nussenzweig e Goble (15) e posteriormente por Marsden (11, 12), sob o ponto de vista de sua virulência e infectividade; b) *cêpa Colombiana*, isolada de paciente da Colômbia, inicialmente estudada por Federici e col. (10) em relação à sua patogenicidade para camundongos C3H e posteriormente estudada por Andrade e Andrade (1) que compararam as lesões histopatológicas determinadas por esta cêpa com as determinadas pela *cêpa Y*; c) *cêpa São Felipe*, isolada neste laboratório a partir de triatomídeos utilizados para xenodiagnóstico de pacientes da área de São Felipe, Bahia.

As três cêpas estudadas vinham sendo mantidas em laboratório em passagens sucessivas em camundongos e algumas passagens intermediárias em triatomídeos. Tinham seus caracteres biológicos estabilizados e padronizados e foram estudadas em diferentes passagens, com inóculos variáveis, conservando sempre os mesmos padrões.

Os inóculos eram constituídos por sangue citratado de camundongos infectados, sendo o cálculo de número de tripanosomas feito pelo método de Brener (6). Nos grupos experimentais estudados no presente trabalho os inóculos foram os seguintes: *cêpa Peruana* - 274.000 tripanosomas; *cêpa Colombiana* - 226.000 tripanosomas; *cêpa São Felipe* - 158.000 tripanosomas, injetados de uma só vez, por via intraperitoneal.

Para o estudo da morfologia dos tripanosomas, os esfregaços de sangue periférico de animais infectados eram feitos

diariamente e corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa (as soluções corantes eram preparadas utilizando-se solução tamponada bifosfato, pH = 7). Nas lâminas coradas eram classificadas as diversas formas, de acordo com critério de Brener (4,5), em delgadas, largas, muito largas e curtas. Eram contados 100 tripanosomas diariamente e feita a percentagem das diversas formas durante o curso da infecção.

Para obtenção das curvas parasitêmicas era feita diariamente contagem do número de tripanosomas no sangue periférico em animais dos três grupos, avaliando-se a parasitemia pelo número de tripanosomas em 50 campos microscópicos de 40 x 10.

Para a tomada dos índices de mortalidade foi avaliada a percentagem de animais mortos no curso da infecção, nos três grupos experimentais, excluindo-se, naturalmente, os animais sacrificados.

Para estudo histopatológico, os animais infectados eram sacrificados após anestesia pelo éter, por secção da aorta abdominal, a partir do 6.º dia após a inoculação, nas diversas fases da infecção. Os diversos órgãos eram fixados em formol a 10% e incluídos em parafina e o estudo histopatológico feito em lâminas coradas pela hematoxilina e eosina.

RESULTADOS

As três cêpas aqui estudadas mostraram nítidas diferenças de comportamento em relação ao mesmo animal experimental, não só no que diz respeito aos seus caracteres biológicos, como em relação à morfologia e às lesões histopatológicas que determinaram.

Caracteres biológicos – A cêpa *Peruana* determinou mortalidade dos animais a partir do 5.º dia de infecção, atingindo o máximo no 9.º dia. Com esta cêpa a mortalidade foi total. A cêpa *Colombiana* a mortalidade foi nula até 100 dias. A cêpa *São Felipe* determinou baixa mortalidade a partir do 13.º dia de infecção, com índices mais elevados entre 21 e 25 dias. Até 50 dias morreram 70% dos animais infectados com esta cêpa.

As curvas parasitêmicas (Fig. 1) mostraram índices muito elevados precocemente para a cêpa *Peruana*, coincidindo o seu pique com a mortalidade de todos os animais; a cêpa *Colombiana* apresentou curva parasitêmica de ascensão lenta, que atingiu níveis elevados entre 24 e 32 dias decrescendo depois progressivamente; a curva parasitêmica da cêpa *São Felipe*

teve ascensão lenta, com piques irregulares e pouco elevados, aos 18 e 27 dias.

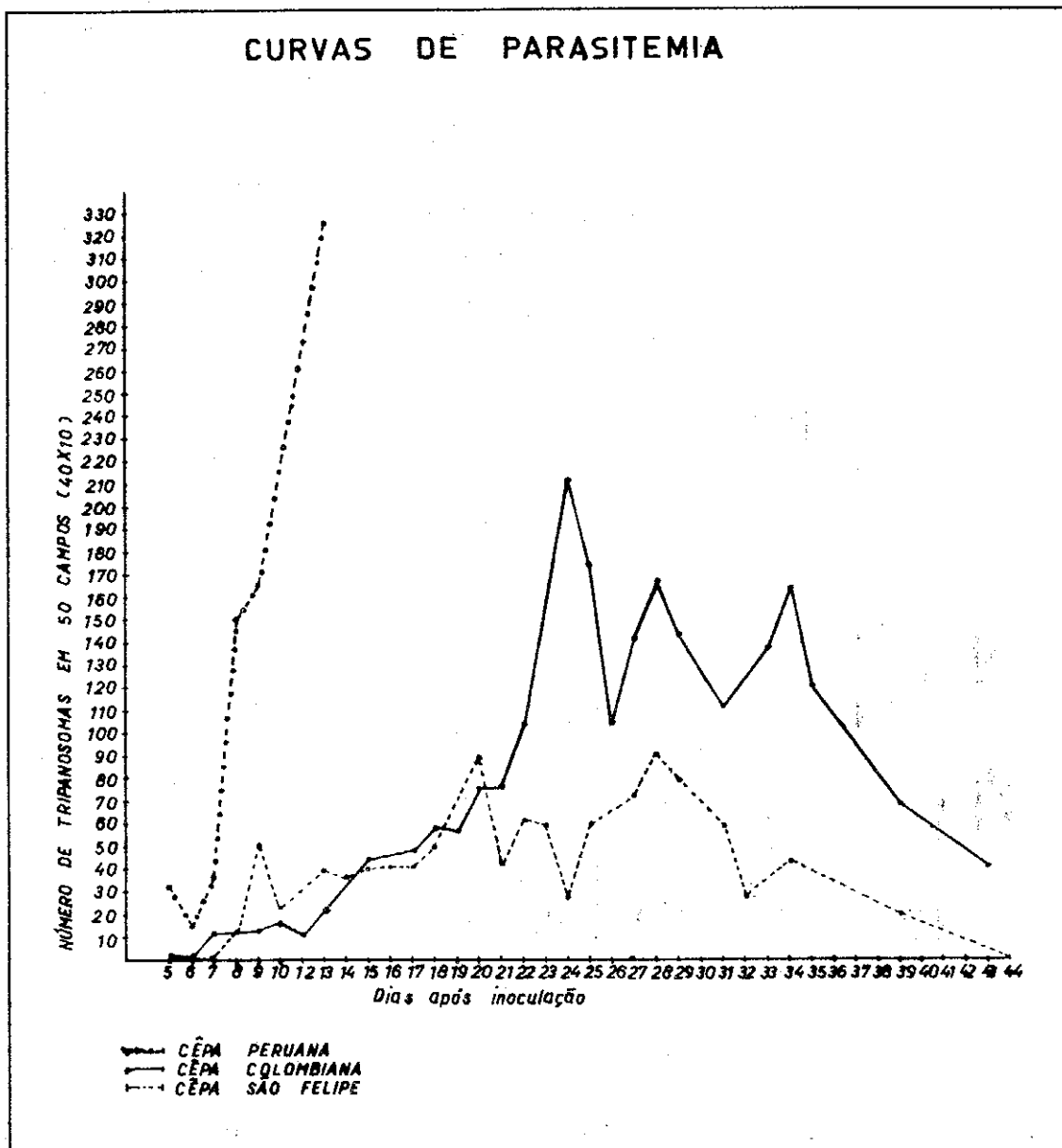


Fig. 1 - Curvas de parasitemia mostrando as diferenças apresentadas pelas três cêpas em um mesmo período de infecção.

Estudo morfológico - Na Fig. 2 estão demonstrados os aspectos morfológicos encontrados em uma determinada faixa da infecção nos três grupos estudados, no que diz respeito à percentagem das formas presentes no sangue periférico. A *cêpa Peruana* mostra nítida predominância inicial das formas delgadas, as quais decrescem progressivamente de número à medida que as formas largas se tornam mais numerosas, vindo

a predominar no final da infecção. As formas muito largas e as curtas ocorreram em número reduzido nesta cêpa. A cêpa *Colombiana* mostrou formas largas predominantes em todo o curso da infecção, com raras formas muito largas e curtas, sendo mínima a percentagem de formas delgadas. A

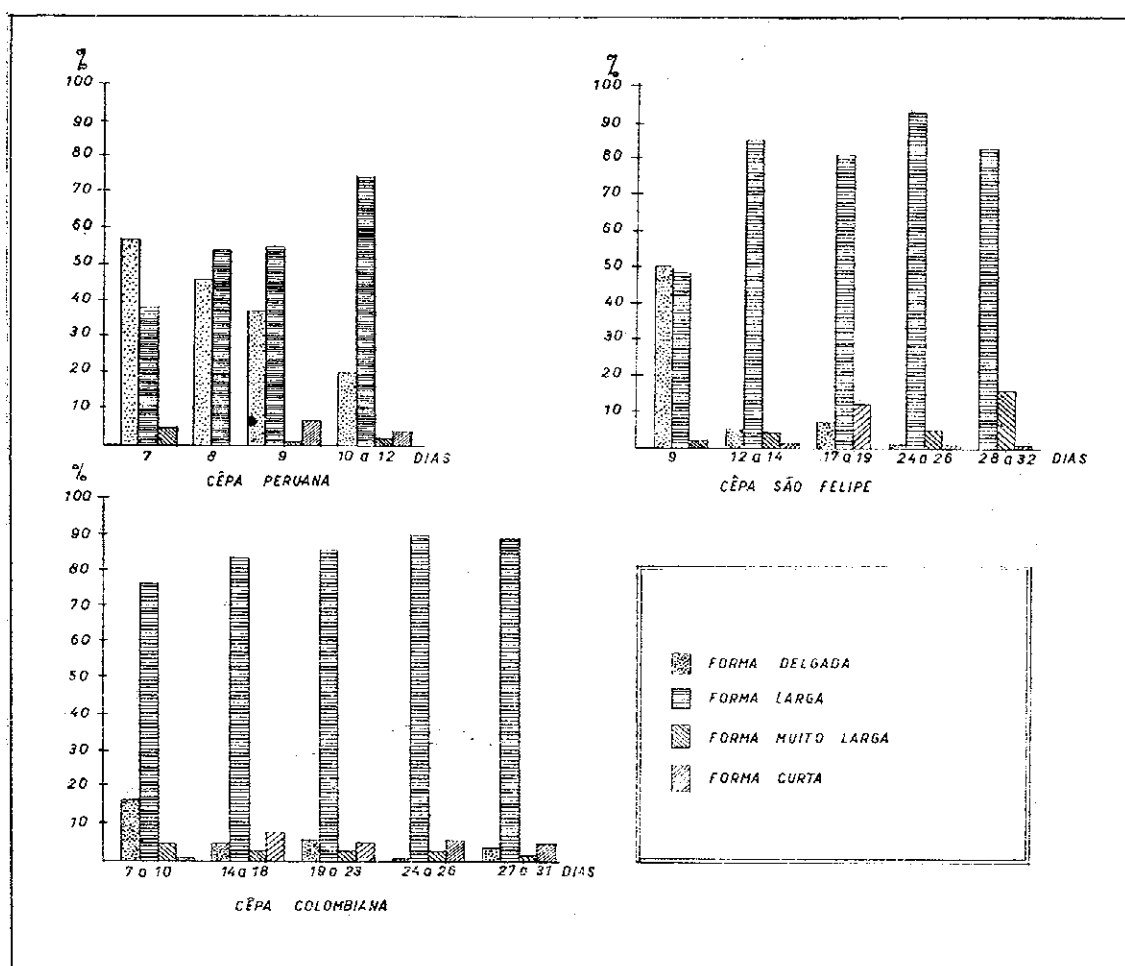


Fig. 2 - Estudo morfológico. Percentagens das formas de tripanosomas presentes no sangue periférico durante o curso da infecção, em cada cêpa estudada.

cêpa *São Felipe* mostrou na fase mais inicial da infecção, equilíbrio entre o número de formas delgadas e largas, mas as formas largas passaram a predominar no curso da infecção e no final eram vistas formas muito largas em número apreciável.

Estudo histopatológico - As três cêpas estudadas determinaram no animal experimental lesões diferentes, não só no que diz respeito ao tropismo por determinado tecido como pela evolução e pela intensidade das lesões observadas. A cêpa *Peruana* mostrou patogenicidade muito elevada para o camun-

dongo determinando intenso parasitismo do SRE, desde as fases mais iniciais da infecção. Na fase mais avançada (10 a 12 dias) observou-se também parasitismo acentuado de músculo cardíaco (Fig. 3). O parasitismo do SRE e do miocárdio se acompanhava de processo inflamatório constituído por células histiocitárias e linfócitos. O baço mostrou, além de intenso parasitismo, acentuada hiperplasia reticular, infiltração da pólpa vermelha por células basófilas e plasmócitos.

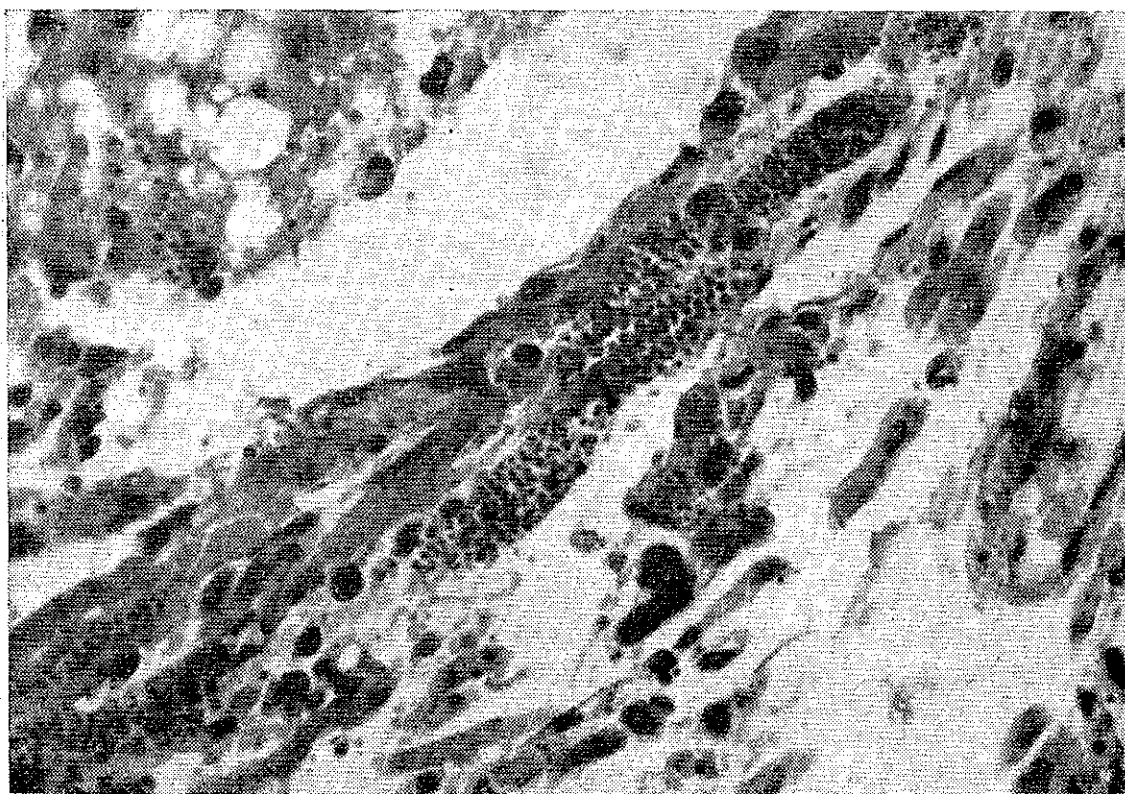


Fig. 3 - Infecção pela cêpa Peruana. Parasitismo de músculo cardíaco e de células reticulares aos 12 dias de inoculação. H. & E. 500 X.

O intestino foi também envolvido pelo parasitismo e pelo processo inflamatório durante tãda a infecção; as lesões intestinais eram segmentares e em geral se distribuíam em torno de plexos nervosos mioentéricos.

A cêpa *Colombiana* determinou no animal lesões de progressão lenta porém bastante intensas nas fases mais avançadas da infecção. Sõmente a partir de 14 dias o parasitismo se tornou evidente em músculo esquelético e miocárdio, embora nesta fase não houvesse reação inflamatória. Com o progredir da infecção e rotura dos ninhos parasitários, havia densos infiltrados focais em torno de fibras destruídas, o que se tor-

nava bem evidente a partir de 30 dias de inoculação (Fig. 4). Nas fases mais tardias da infecção persistia o processo inflamatório em vários setôres, principalmente perivascular, com nítida predominância de plasmócitos no infiltrado. É uma cêpa nítidamente miotrópica.

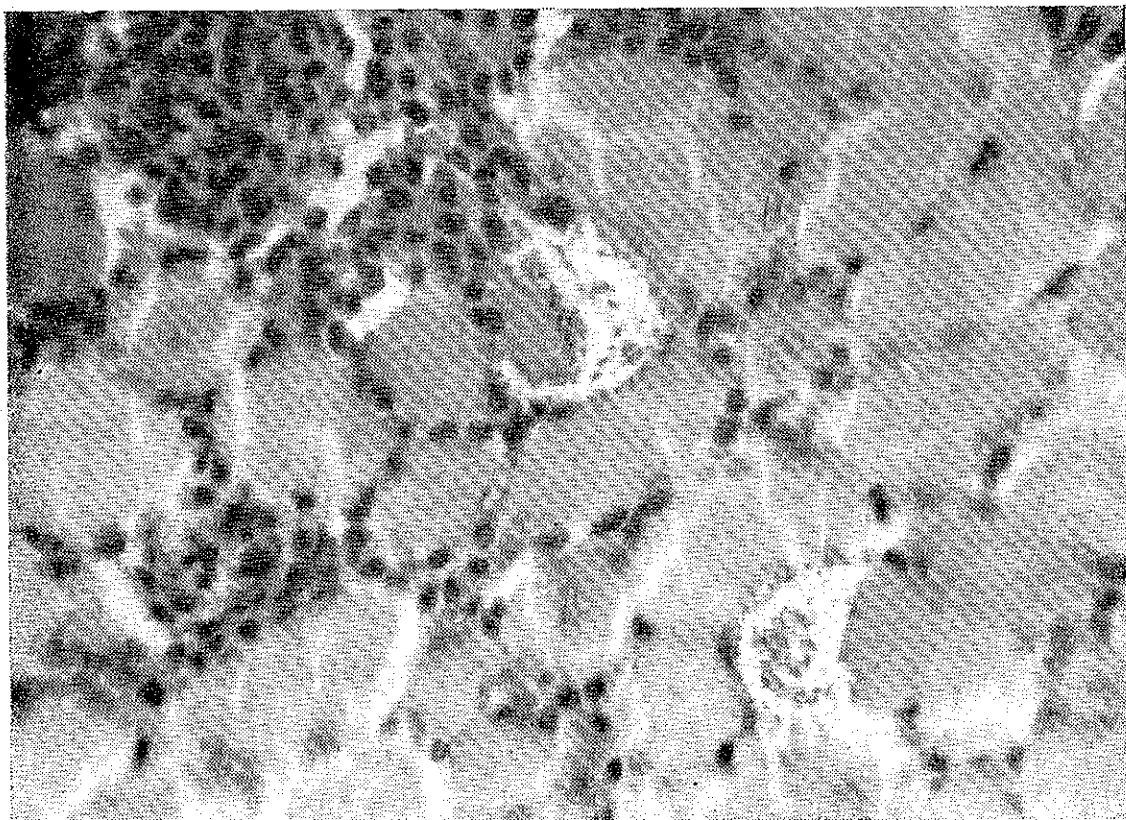


Fig. 4 - Infecção pela cêpa Colombiana. Miosite intensa com ninhos de leishmânias em fibras musculares estriadas, (30 dias) H. & E. 500 X.

A cêpa *São Felipe*, nas fases iniciais da infecção, mostrou apenas um discreto parasitismo de células do SRE. A partir de 14 dias observou-se parasitismo quase exclusivo de miocárdio, acompanhado de infiltração mononuclear intensa. O processo de miocardite se mostrou mais acentuado entre 20 e 25 dias (Fig 5). Também no intestino foi visto discreto parasitismo e lesões inflamatórias focais. A cêpa *São Felipe* é, pois, nítidamente miocardiopática, com envolvimento também de intestino. Nas fases tardias da infecção, persiste o processo de miocardite, embora na ausência de leishmânias.

Em resumo, a cêpa *Peruana* se mostrou a mais patogênica das três, determinando alta mortalidade, coincidindo com pique precoce de parasitemia; havia reticulotropismo acen-

tuado e predominância de formas delgadas na fase inicial da infecção; na fase mais avançada predominavam as formas largas, coincidindo com o aparecimento de cardiotropismo. A *cépa Colombiana* apresentou-se pouco patogênica, com ascen-

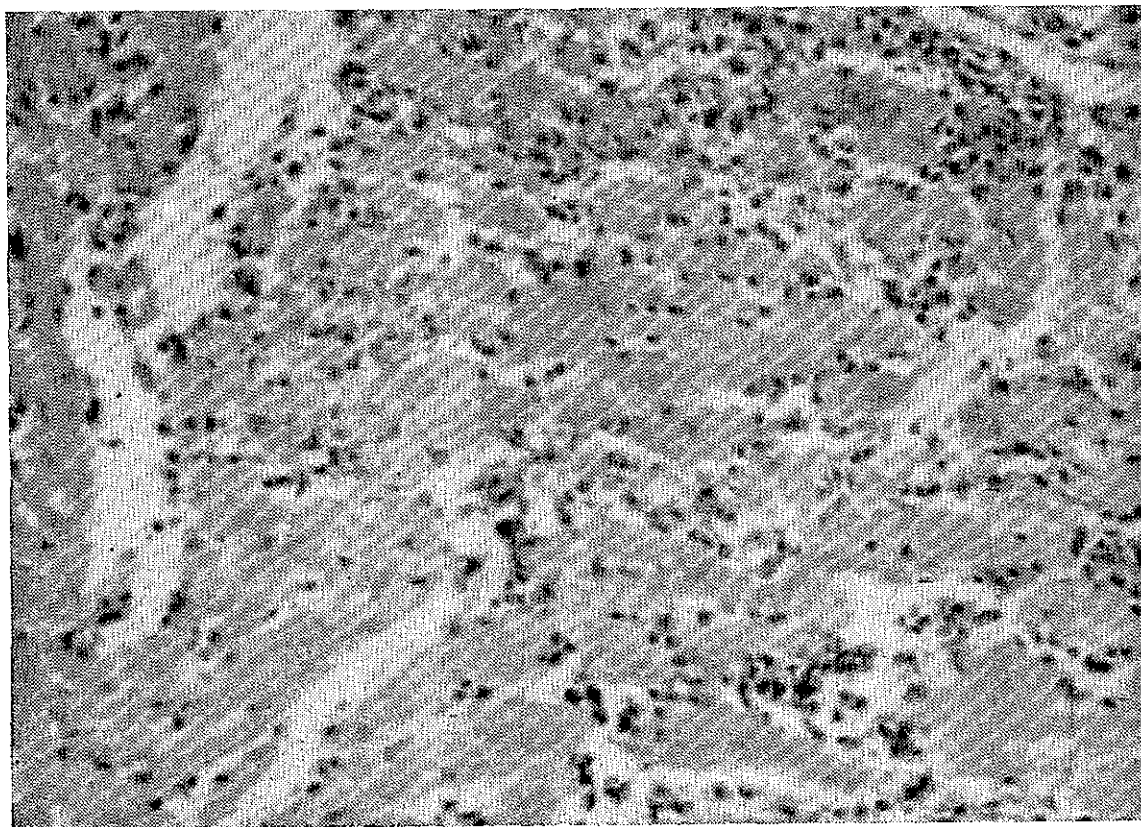


Fig. 5 - Cépas São Felipe: Miocardite crônica difusa aos 27 dias de infecção. H. & E. 200 X.

ção lenta da parasitemia, a qual, entretanto, atingiu níveis elevados na fase mais avançada da infecção; apresentou formas largas em todo o curso e miotropismo exclusivo (músculo esquelético e miocárdio). Quanto à *cépa São Felipe*, também apresentou curvas parasitêmicas de ascensão lenta porém com pique precóce que coincidiu com a presença de formas delgadas no sangue periférico e discreto reticulotropismo inicial; depois desta fase inicial a parasitemia subiu lenta e irregularmente com nítida predominância de formas largas e miocardiotropismo exclusivo, com acentuada miocardite, levando à morte 70% dos animais em 50 dias.

COMENTÁRIOS

Cépas de *Trypanosoma cruzi* isoladas em regiões diferentes demonstraram um conjunto de caracteres que permi-

Viram diferenciá-las uma das outras, não só pela patogenicidade para o animal experimental, como pela sua morfologia no sangue periférico e pelas lesões histopatológicas que determinaram no animal experimental. O estudo de conjunto destes diversos caracteres demonstrou que os mesmos são inter-relacionados, mostrando que a cêpa que apresenta intensa e precoce multiplicação parasitária é mais patogênica, tem formas delgadas predominantes no início da infecção e intenso reticulotropismo, enquanto que aquelas que se multiplicam lentamente, determinando piques tardios de parasitemia, são predominantemente miotrópicas e mostram formas largas em maior número no curso da infecção. A observação de que a ascensão precoce da curva parasitêmica a níveis muito elevados coincide com o aparecimento de formas delgadas, sugere que estas formas decorrem de uma intensa multiplicação parasitária. Pizzi (16), estudando o significado das formas delgadas da cêpa *Tulauhen*, que é reticulotrópica e determina piques parasitários precoces, verificou que o aparecimento destas formas coincide com a subida da parasitemia (4.º e 5.º dias) e interpreta as formas delgadas como sendo "formas jovens" que acabam de concluir o seu 1.º ciclo tissular. Também com a cêpa *Peruana* tivemos a oportunidade de verificar que as formas delgadas coincidem com a ascensão precoce da parasitemia, porém as interpretamos como decorrentes de rápida multiplicação parasitária. O fato de que os caracteres morfológicos de uma cêpa são constantes, como demonstrou Silva (18) indica que cada cêpa tem seu padrão morfológico próprio. Também a multiplicação mais ou menos rápida parece ser um caráter próprio de cada cêpa, responsável pelo aparecimento de formas delgadas, pelas diferenças nas curvas parasitêmicas e pela maior ou menor patogenicidade. Naturalmente que estes dados se referem às presentes condições experimentais. As passagens sucessivas com diferentes inóculos podem determinar exaltação ou atenuação da virulência de uma cêpa sem contudo alterar seu comportamento geral, conservando-se a configuração das curvas parasitêmicas e o padrão das lesões tissulares. Entretanto, a exaltação da virulência, determinando uma multiplicação parasitária mais intensa, pode levar ao aparecimento de formas delgadas em número mais elevado que o usual no início da infecção pela cêpa *Colombiana* (dados não publicados), confirmando a hipótese de que as formas delgadas surgem em decorrência de rápida multiplicação do parasito no animal experimental.

Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que se podem estabelecer "padrões" de cêpas do *T. cruzi*, estudando-se cêpas de diferentes procedências levando em conta os diversos elementos citados. Não se trata, evidentemente, de se multiplicar indefinidamente o número de cêpas cada vez que o *T. cruzi* é isolado em uma diferente região, mas de procurar padronizá-las pelo seu comportamento no animal experimental. Evidentemente, nem sempre as cêpas de procedência diferente são obrigatoriamente cêpas distintas e não se pode afastar a possibilidade de isolamento da mesma cêpa em locais e oportunidades diferentes. Nêste particular, a cêpa *Peruana* apresenta caracteres muito semelhantes aos que têm sido descritos para a cêpa *Y*, não só do ponto de vista do seu reticulotropismo nas fases iniciais da infecção (1, 17), da sua morfologia (5, 18), das lesões histopatológicas por ela determinadas (1, 2) como pelos seus caracteres antigênicos (15).

A identificação dos "padrões" de cêpas de *T. cruzi* nos parece importante, pois um melhor conhecimento das mesmas poderia nos fornecer melhores elementos para a compreensão de aspectos ainda obscuros na patogenia e na patologia geográfica da doença de Chagas.

Agradecemos ao Dr. Philip Marsden (Department of Clinical Tropical Medicine, London School of Hygiene and Tropical Medicine) por nos ter cedido a cêpa *Peruana* do *T. cruzi*, utilizada no presente trabalho.

SUMMARY

Three strains of *Trypanosoma cruzi* from different geographic areas (Peruvian strain, Colombian strain and São Felipe strain) were studied in their biological, morphological and histopathological aspects. Each of them differ in its behaviour in mice, producing different mortality rates, parasitemia levels and pathogenicity. They also differ in their morphology and in the degree and nature of the tissue changes evoked. There was a positive correlation for reticulo-tropism, rapid parasitic multiplication and the presence of the slender forms of the trypanosomes on one side, and for slow multiplication, myotropism and the presence of broad trypanosomes on the other side.

It is suggested that the several patterns should be taken as a whole in the characterization of different strains of *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — ANDRADE, S.G. & ANDRADE, Z.A. — Estudo histopatológico comparativo das lesões produzidas por duas cêpas do *Trypanosoma cruzi*. *O Hospital* (Rio de Janeiro), 70: 1267-1278, 1966.

- 2 — ANDRADE, S.G. & ANDRADE, Z.A. — Patologia da doença de Chagas experimental de longa duração. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 10: 180-187, 1968.
- 3 — BRAND, T. von; TOBIE, E.J.; KISSLING, R.E. & ADAMS, G. — Physiological and pathological observations on four strains of *Trypanosoma cruzi*. *J. Inf. Dis.*, 85: 5-16, 1949.
- 4 — BRENER, Z. & CHIARI, E. — Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 5: 220-224, 1963.
- 5 — BRENER, Z. — Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 59: 19-26, 1965.
- 6 — BRENER, Z. — "Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas", Belo Horizonte, 1961, Tese.
- 7 — CAMPOS, E.S. — Estudos sobre uma raça neurotrópica do *Trypanosoma cruzi*. *An. Fac. Med. São Paulo*, 2: 197-201, 1927.
- 8 — DEANE, M.P.; BRITO, T. & DEANE, L.M. — Pathogenicity to mice of some strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from wild animals of Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 5: 225-236, 1963.
- 9 — DIAS, E. — Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 28: 1-110, 1934.
- 10 — FEDERICI, E.E.; ABELMANN, W.B. & NEVA, F.A. — Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 13: 272-280, 1964.
- 11 — MARSDEN, P.D. — *Trypanosoma cruzi* infections in CFI mice. I — Mortality with different doses of trypanosomes. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, 16: 57-61, 1967.
- 12 — MARSDEN, P.D. — *Trypanosoma cruzi* infection in CFI mice. II — Infections induced by different routes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 61: 62-67, 1967.
- 13 — NUSSENZWEIG, V.; DEANE, L.M. & KLOETZEL, J. — Diversidade na constituição antigênica de amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas do homem e de gambás. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 4: 409-410, 1962.
- 14 — NUSSEMZWEIG, V.; DEANE, L. and KLOETZEL, J. — Differences in antigenic constitution of strains of *Trypasoma cruzi*. *Experimental Parasitol.* 14: 221-232, 1963.
- 15 — NUSSENZWEIG, V. & GOBLE, F. — Further studies on the antigenic constitution of stains of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Exp. Parasit.*, 18: 224-230, 1966.
- 16 — PIZZI, T. — Sobre o problema de las formas delgadas de "*Trypanosoma cruzi*" (Comunication preliminar). *Bol. Inform. Parasitol. Chilenas*, 8: 26-30, 1953.
- 17 — SILVA, L.H.P. & NUSSENZWEIG, V. — Sobre uma cêpa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.*, 20: 191-208, 1953.
- 18 — SILVA, L.H.P. — Observações sobre o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 1: 99-118, 1959.

Recebido para publicação em 29/12/69.

- 39 — SEDGWICK, C.E. & POULANTZAS, J.K. — Congenital Hepatic Fibrosis. In "Portal Hypertension". Boston, Little, Brown and Company, 1967. pag. 97.
- 40 — SHERLOCK, S. — Non Cirrhotic Intrahepatic Portal Hypertension. *Rev. Int. Hep.*, 17: 713, 1967.
- 41 — SHERLOCK, S. — Classification of Portal Hypertension. Congenital Cystic and Fibrotic Conditions. In "Diseases of the Liver and Biliary System" — Blackwell Scientific Publications, 1968. pag. 202, 538. Oxford,
- 42 — TEWARSON, I.P., CROWE, P. & VERHAGEN, A.D. — Congenital Hepatic Fibrosis. *Clin. Pediat.*, 3: 679, 1964.
- 43 — VARCO, R.L. Et Al. — Bleeding Esophageal Varices with Polycystic Liver. *New. Engl. J. Med.*, 259: 904, 1958.

Recebido para publicação em 29/12/69.