

COMPORTAMENTO DE UMA CEPA DO *TRYPANOSOMA CRUZI* EM HOSPEDEIROS COM BAIXA RESISTÊNCIA

Sonia G. ANDRADE (1), Antusa A. da SILVA (2), Maria Luiza CARVALHO (3)
e Rozália M. FIGUEIRA (3)

RESUMO

Com a finalidade de investigar a estabilidade dos caracteres próprios a determinada cepa do *T. cruzi*, foi feita inoculação da cepa Colombiana em animais cujo SRE havia sido bloqueado por injeções de Tinta da China ou deprimido pelo uso de Cortisona e além disto foi inoculada em animais recém-nascidos para reativação de sua virulência. Apesar de se ter observado uma maior proliferação parasitária da referida cepa, os seus caracteres básicos se conservaram estáveis, tais como o miotropismo e a predominância de formas largas em todo o curso da infecção. Observou-se, entretanto, que a maior multiplicação parasitária observada no início da infecção correspondeu ao aparecimento de formas delgadas em maior número e discreto reticulotropismo. Estes fatos confirmam a estabilidade dos caracteres das cepas do *T. cruzi* e mostram que há nítida correlação entre uma rápida multiplicação parasitária e o aparecimento de formas delgadas, as quais seriam responsáveis pelo parasitismo do SRE.

INTRODUÇÃO

Tem sido sugerido que as diferentes manifestações da doença de Chagas em diversas áreas geográficas, podem depender, pelo menos em parte, de diferenças de cepas do *T. cruzi*^{1, 3}. Observações feitas por diversos Autores têm demonstrado que existem realmente diferenças entre amostras de *T. cruzi* isoladas a partir de casos humanos ou de animais naturalmente infetados, quando se consideram alguns dos aspectos importantes da biologia do parasito. BRAND & col.⁵ observaram diferenças na patogenicidade para o camundongo em quatro cepas isoladas no Brasil, Guatemala e Panamá. NUSSENZWEIG & GOBLE¹⁴ estudando 23 cepas isoladas na América do Norte, Central e do Sul, classificaram-nas segundo o tipo antigênico em três grupos distintos, não observando entre-

tanto, relação entre o tipo sorológico da cepa e a sua procedência. SILVA¹⁵, estudando aspectos morfológicos do tripanosoma no sangue periférico em diferentes cepas, notou diferenças de comportamento entre os tripanosomas sanguícolas largos e delgados. BRENER & CHIARI⁶ e BRENER⁷, estudando cepas de diferentes procedências, que se distinguiam pelos seus caracteres morfológicos, observaram que as mesmas tinham também um comportamento biológico diferente.

Procurando correlacionar diversos caracteres próprios a determinada cepa, tivemos a oportunidade de verificar, em trabalhos anteriores que cepas com caracteres morfológicos e biológicos distintos também determinavam lesões tissulares diferentes no animal experimental^{1, 3} e que os diversos caracte-

Trabalho realizado com o auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas (T.C. 13320)

- (1) Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Prof. Edgard Santos — Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil
- (2) Fundação Gonçalo Moniz — Seção de Protozoologia
- (3) Fundação Gonçalo Moniz — Seção de Anatomia Patológica

téres eram correlacionados entre si⁴; assim, naquelas dotadas de intensa capacidade de multiplicação, com curvas parasitêmicas precocemente elevadas, há predominância de formas delgadas e nítido reticulotropismo enquanto que nas de multiplicação lenta, com curvas parasitêmicas de elevação progressiva, predominam as formas largas do parasito e há nítido miotropismo. Baseando-se nestes fatos, sugeriu-se então a possibilidade do estabelecimento de padrões de cepas do *T. cruzi*. Um ponto importante para o estabelecimento destes "padrões", seria a verificação da estabilidade dos seus caracteres morfológicos, biológicos e histopatológicos após várias passagens, com sua adaptação ao animal experimental. Procuramos assim, no presente trabalho, testar a estabilidade de uma cepa cujos caracteres têm sido bem estudados, que é a cepa *Colombiana*^{1, 4, 10} diante de modificações do estado reacional do SRE do animal experimental. Como já foi visto anteriormente² a depleção do SRE por meio de bloqueio com Tinta da China determina maior multiplicação da cepa Y (reticulotrópica). Também já é bem estudado o efeito da Cortisona sobre a infecção chagásica experimental^{1, 11, 12, 13, 16, 17} concluindo os Autores citados por nítido agravamento da infecção pela ação da Cortisona. PIZZI & CHEMKE¹⁷ concluem que o agravamento da doença de Chagas experimental pela Cortisona em dose elevada se deve a uma inibição da reação inflamatória defensiva, com menor capacidade fagocitária dos macrófagos inflamatórios. A inibição do SRE permitiria acentuada proliferação parasitária o mesmo resultado se observando quando se empregam animais recém-nascidos em inoculações sucessivas para exaltação da virulência.

Alterando de diversas maneiras a capacidade reacional do hospedeiro frente à infecção chagásica, no sentido de conseguir uma maior multiplicação parasitária pretendemos investigar se a isto corresponderia alterações no padrão da cepa *Colombiana* e se a maior multiplicação parasitária determinaria o aparecimento de formas delgadas e de reticulotropismo nesta cepa em que caracteristicamente predominam as formas largas e é miotrópica.

MATERIAL E MÉTODOS

1.º Grupo — Bloqueio do SRE com Tinta da China — Foram utilizados 60 camundongos brancos, pesando entre 15 e 18 g. Trinta destes animais foram tratados durante 4 dias consecutivos com Tinta da China (suspensão a 10% em água destilada, após fervura, de Tinta da China comercial — Pelikan) sendo injetados 0,2 ml por via intraperitoneal de cada vez. No 5.º dia foram inoculados com *T. cruzi*, cepa *Colombiana*, sendo o inóculo de 241.110 tripanosomas. Vinte camundongos foram apenas inoculados com *T. cruzi* (mesmo inóculo e mesma dose) constituindo os controles de infecção e 10 camundongos foram apenas tratados com Tinta da China (controles de tratamento).

2.º Grupo — Tratamento com Cortisona — 25 camundongos brancos, pesando entre 10 e 12 g foram inoculados com *T. cruzi*, cepa *Colombiana* (inóculo: 437.100 tripanosomas) e foram tratados a partir de 24 horas após a inoculação com Acetato de Cortone "Merck" em solução salina, na dose de 0,5 mg/20 g, durante 12 dias. Dez camundongos foram apenas infetados com *T. cruzi* (controles de infecção).

3.º Grupo — Inoculações sucessivas em animais recém-nascidos (reativação da virulência) — O sangue de animais infetados com *T. cruzi*, cepa *Colombiana*, usados em laboratório para conservação da cepa, foi inoculado em camundongos recém-nascidos, sendo feitas três passagens sucessivas com os seguintes inóculos: 1.ª passagem 434.000 tripanosomas; 2.ª passagem — 394.000 tripanosomas e 3.ª passagem — 437.000 tripanosomas. Os animais em que foi feita a 3.ª passagem, em número de 12, foram utilizados no presente estudo.

Em todos os grupos experimentais os animais foram sacrificados para estudo histopatológico. Foram feitas curvas parasitêmicas e controlada a mortalidade. No 2.º e no 3.º grupos foi feito estudo morfológico dos parasitos no sangue periférico, em esfregaços corados pelo método de May Grünwald Giemsa, em solução tamponada, pH = 7,0. Foram contadas as formas largas e delgadas e feita a percentagem das mesmas do 7.º ao 14.º dia de infecção.

RESULTADOS

1.º — Grupo — a) *Estudo histopatológico* — nos animais contrôles da infecção pelo *T. cruzi*, observou-se parasitismo tissular a partir de 10 dias de infecção, com presença de parasitos exclusivamente em coração e músculo esquelético e infiltrado inflamatório mononuclear discreto em torno de fibras parasitadas. Nos animais previamente tratados pela Tinta da China, observou-se parasitismo tissular desde os 7 dias de infecção, com presença de leishmânias em pequeno número no interior de células do SRE. A partir de 10 dias de infecção foi observado parasitismo de coração e de músculo esquelético com maior intensidade do que no grupo controle. O bloqueio pela Tinta da China foi identificado macroscópicamente pela difusa pigmentação negra do peritônio, mesentério e epiplons e microscópicamente pela presença de grânulos negros no citoplasma das células reticulares do mesentério, peritônio, epiplons. O pigmento foi visto também em pequena quantidade nas células reticulares do baço, nas células alveolares do pulmão e endocárdio. Nos animais tratados pela Tinta da China e depois infetados pelo *T. cruzi* observou-se a mesma distribuição do pigmento, mas ao lado das células reticulares bloqueadas observou-se o aparecimento de células reticulares proliferadas nas quais eram identificadas leishmânias no citoplasma (Quadro I). b) *Mortalidade* — Como pode ser visto no Quadro I, o bloqueio prévio do SRE

levou a um acentuado aumento da mortalidade em relação aos contrôles da infecção. c) *Parasitemia* — Os animais previamente tratados pela Tinta da China tiveram elevação precoce da parasitemia, que atingiu níveis mais elevados neste grupo do que no grupo de contrôles da infecção (Fig. 1).

2.º e 3.º Grupos — a) *Estudo histopatológico* — Os animais contrôles da infecção mostraram parasitismo exclusivo de coração e de músculo esquelético a partir de 10 dias da infecção. Nos animais submetidos a tratamento pela Cortisona a partir de 24 horas após a infecção e no grupo de animais em que foi feita reativação por passagens sucessivas em animais recém-nascidos, o parasitismo tissular foi visto desde os 7 dias de infecção com a presença de pequeno número de leishmânias no citoplasma de células reticulares do baço e em tecido adiposo. A partir de 10 dias foi visto parasitismo de coração e músculo esquelético com presença de maior número de leishmânias do que nos contrôles na mesma fase de infecção. b) *Mortalidade* — o índice de mortalidade nos animais tratados pela Cortisona foi de 36%; nos animais contrôles da infecção a mortalidade foi nula até 33 dias de infecção. c) *Parasitemia* — os animais tratados pela Cortisona e os do grupo de reativação apresentaram uma ascensão rápida e precoce das curvas de parasitemia, quando comparados com os contrôles de infecção, como mostra a Fig. 2. d) *Estudo morfológico* — Na Fig. 3

QUADRO I

Bloqueio do SRE pela Tinta da China e infecção pelo *T. cruzi*

Grupos experimentais	Parasitismo tissular SRE			Infiltrado inflamatório	Mortalidade
	— Coração	— Músculo	— Músculo		
Contrôles de infecção	—	xx	xx	xx	5%
Bloqueio e infecção	x	xxx	xxx	xxx	50%
Bloqueio sem infecção	—	—	—	—	0%

CURVAS DE PARASITEMIA DA CEPA COLOMBIANA

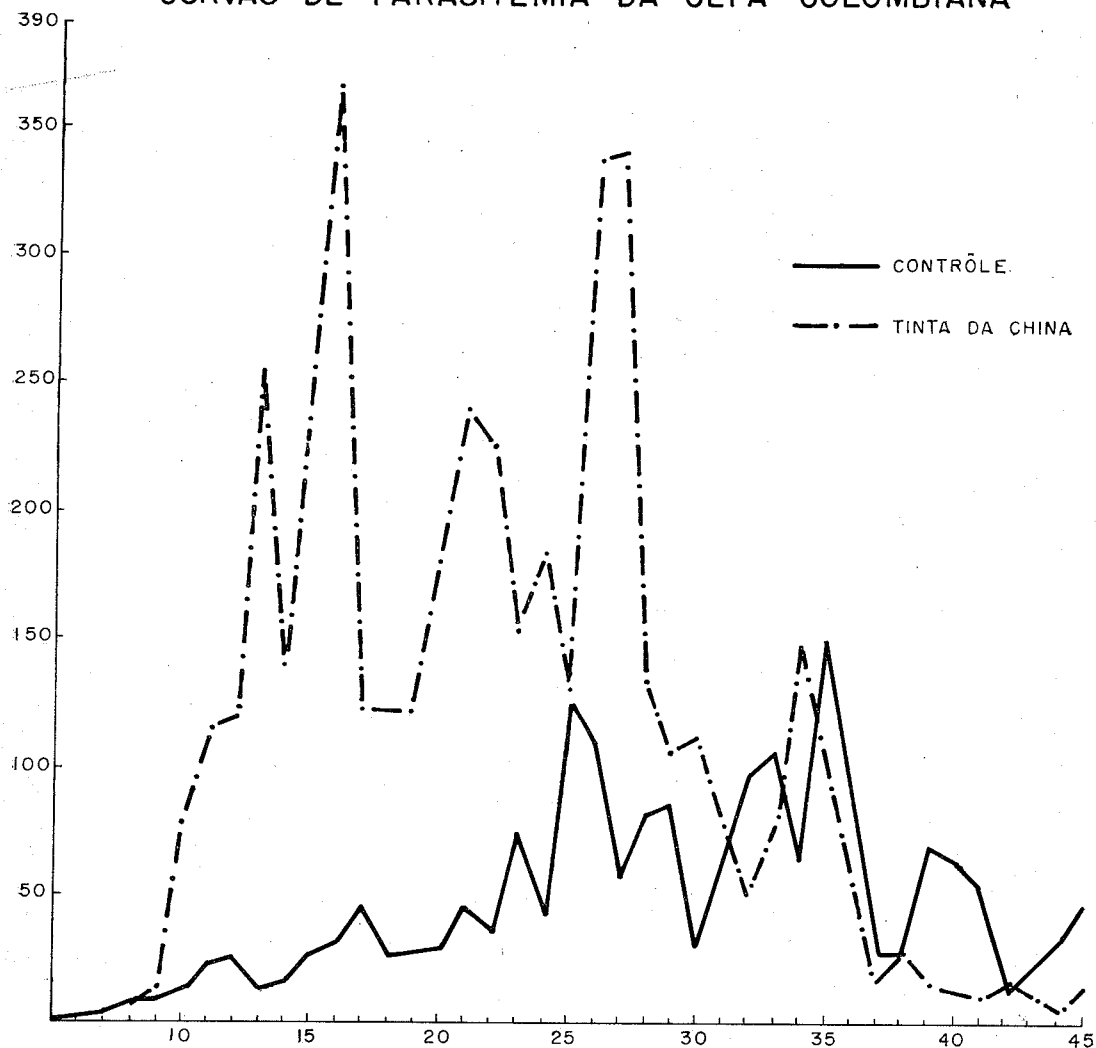


Fig. 1 — O grupo de animais cujo SRE foi previamente bloqueado pela Tinta da China, mostrou níveis parasitêmicos mais elevados em todo o curso da infecção, com picos precoces, quando comparados com os controles de infecção.

pode-se verificar que no grupo controle de infecção pela cepa Colombiana, o quadro morfológico padrão é representado por 100% de formas largas aos 5 dias de infecção e que as formas delgadas só aparecem a partir de 7 dias, atingindo o nível máximo aos 9 dias; nos animais tratados pela Cortisona e no grupo de reativação verifica-se a presença de formas delgadas aos 5 dias de infecção na proporção de 18 a 22% e daí decrescem progressivamente atingindo aos 14 dias níveis comparáveis aos do grupo controle.

COMENTARIOS

Analizando-se os resultados deste trabalho torna-se evidente que, mesmo quando se alteram as condições reacionais do hospedeiro ou quando se exalta a virulência dos tripansomas, a cepa Colombiana conserva o seu comportamento básico, determinando lesões tissulares predominantes em músculo (cardíaco e esquelético), observando-se inclusive acentuação do miotropismo na fase mais avançada da infecção. Observou-se, entre-

CURVAS DE PARASITEMIA DA CEPA COLOMBIANA

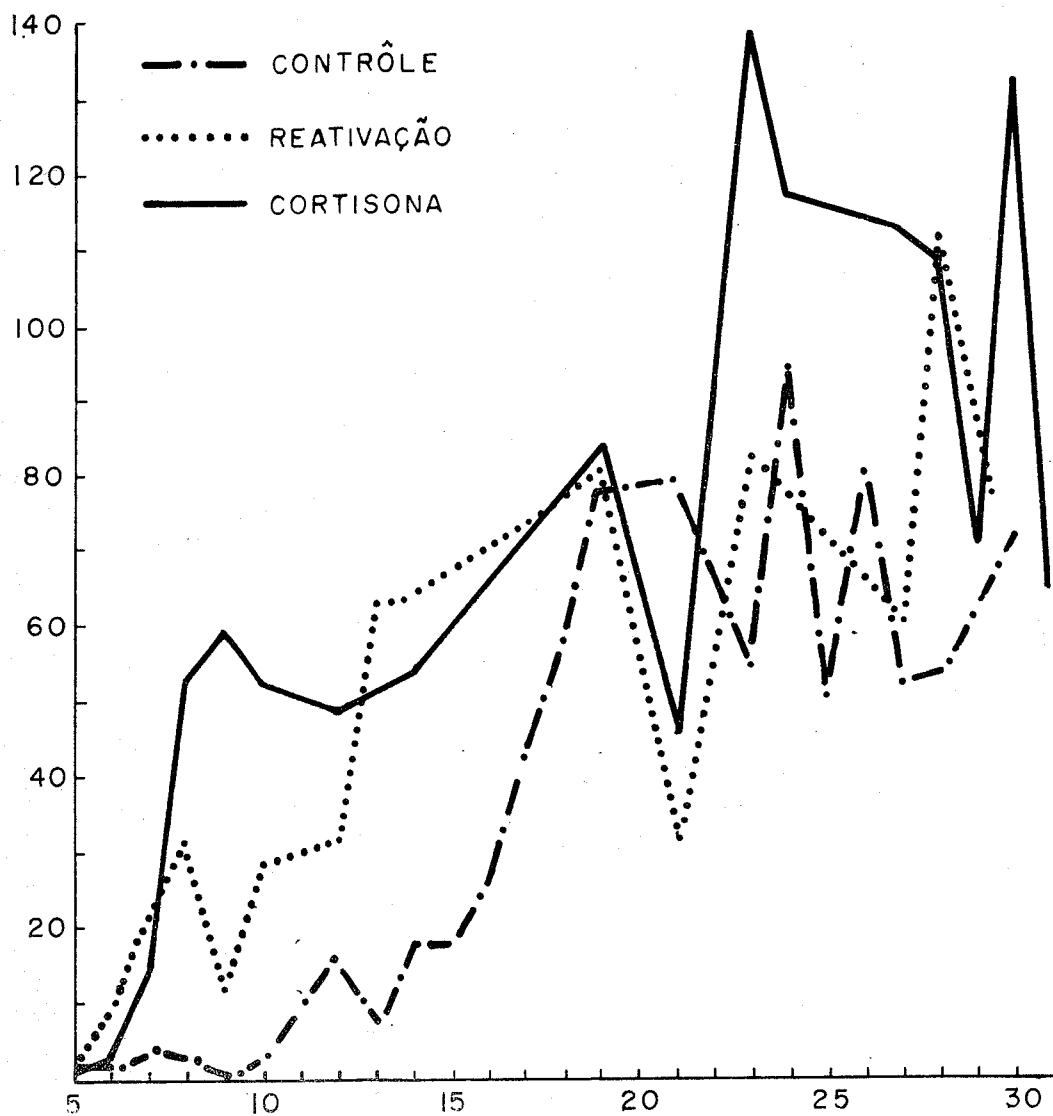


Fig. 2 — Os animais que fizeram uso de Cortisona e naqueles em que a cepa sofreu reativação por passagens em camundongos recém-nascidos, as curvas parasitêmicas mostraram níveis mais elevados na fase inicial do que os contrôles porém, a configuração geral das curvas é idêntica em todos os grupos.

ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA CEPA COLOMBIANA

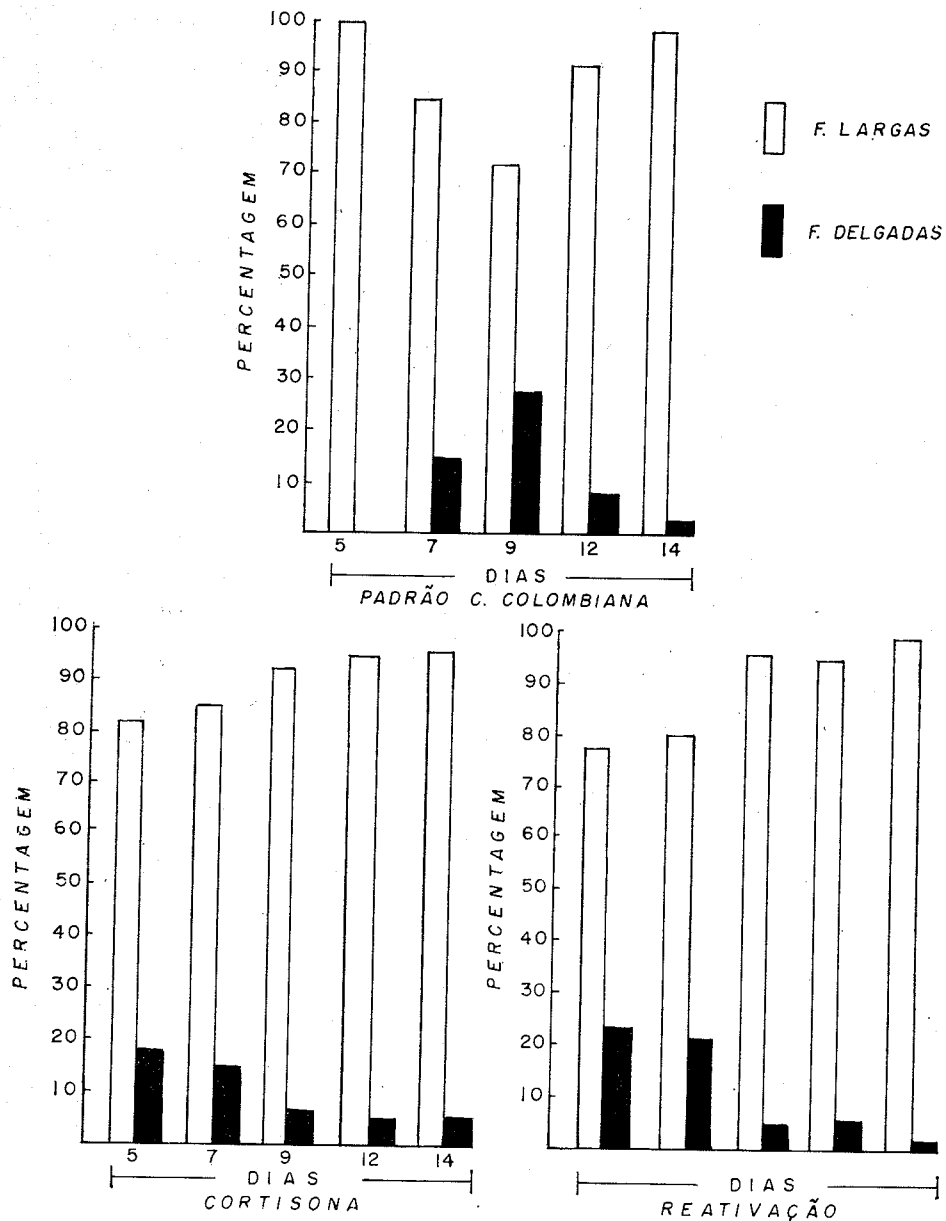


Fig. 3 — O estudo morfológico das formas sanguícolas mostra aparecimento precoce de formas delgadas no grupo de tratamento pela Cortisona e no grupo de reativação, quando comparados com os contrôles, os quais apresentam 100% de formas largas no início da infecção.

tanto, que nas fases iniciais da infecção houve uma maior multiplicação parasitária, com piques precoces de parasitemia, que coincidiu com o aparecimento de formas delgadas no sangue periférico e discreto reticulotropismo, sem entretanto alcançar o grau observado com cepas caracteristicamente reticulotrópicas como a cepa Y e a Peruana, já estudadas em trabalhos anteriores^{1, 4}. O polimorfismo das formas sanguícolas do *T. cruzi* foi observado desde CHAGAS⁹ e se constitui num dado de importância na distinção das cepas, desde que há nítida diferença de comportamento quando predominam as formas largas em todo o curso da infecção ou quando predominam as formas delgadas^{4, 6, 7}. Estudando o polimorfismo dos tripanosomas, SILVA¹³ demonstrou a constância do quadro morfológico em uma determinada cepa, mesmo quando se faz a inoculação de um único exemplar, reproduzindo-se o padrão morfológico da cepa durante o curso da infecção. Estudando o significado das formas delgadas, PIZZI¹⁵ sugere que as mesmas representariam formas jovens, surgidas logo após o 1.º ciclo tissular do parasito. BRENER⁸ verificou que as formas delgadas penetram rapidamente nos tecidos e são mais suscetíveis aos processos imunológicos. Desta maneira poderíamos explicar a ausência de formas delgadas nos animais com 5 dias de infecção pela cepa Colombiana, como decorrente à sua penetração rápida nos tecidos enquanto que as formas largas, mais numerosas nesta cepa, permaneceriam mais tempo no sangue periférico. Por outro lado, nos animais que tiveram as suas defesas inibidas, por bloqueio, depleção ou imaturidade do SRE, a pequena percentagem de formas delgadas que penetraram precocemente nos tecidos, tiveram chance de multiplicar, determinando elevação precoce da parasitemia, sendo detectadas ao exame morfológico. A elevada multiplicação parasitária parece-nos assim, nitidamente correlacionada com o aparecimento de formas delgadas e a presença de reticulotropismo, enquanto que a presença predominante de formas largas se relaciona com uma lenta multiplicação parasitária e o aparecimento de miotropismo. As formas largas persistem por mais tempo no sangue periférico e são responsáveis pelos piques tardios de parasitemia observados nas cepas miotrópicas, como a

Colombiana. Mesmo nas cepas dotadas de grande capacidade de proliferação e de reticulotropismo, como a cepa Y (1) e a Peruana (4), as formas delgadas desaparecem em prazos curtos da circulação, passando a predominar as formas largas, o que coincide com o início do parasitismo de músculo esquelético e de miocárdio, observado nestas cepas.

SUMMARY

Behaviour of a strain of Trypanosoma cruzi in animals with experimentally induced low resistance

Mice with reticulo-endothelial blockage due to repeated injections of Indian ink, as well as cortisone-treated mice and suckling mice were inoculated with a Colombian strain of *Trypanosoma cruzi*. In these animals with lowered resistance severe infection with high parasitemia resulted. Nevertheless, the basic strain pattern was not changed, broad parasitic forms and tissue myotropism being predominantly observed during the whole course of infection. There were evidences of a rather rapid parasitic multiplication during early infection, when slender blood forms of the trypanosome and tissue reticulotropism could be observed. The present study suggests, therefore, that the behaviour pattern of this trypanosome strain is stable and shows a good correlation between slender forms, reticulotropism and rapid parasitic multiplication against broad forms, myotropism and lower multiplication rates.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ANDRADE, S. G. & ANDRADE, Z. A. — Estudo histopatológico comparativo das lesões produzidas por duas cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Hospital* (Rio) 70:1267-1278, 1966.
2. ANDRADE, S. G.; SILVA, A. A. & ANDRADE, Z. A. — Bloqueio e estimulação do S. R. E. na doença de Chagas (Estudo experimental em camundongos). *Gaz. Méd. Bahia* 67:19-30, 1967.
3. 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.

ANDRADE, S. G.; SILVA, A. A. da; CARVALHO, M. L. & FIGUEIRA, R. M. — Comportamento de uma cepa do *Trypanosoma cruzi* em hospedeiros com baixa resistência. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 14:154-161, 1972.

4. ANDRADE, S. G.; CARVALHO, M. L. & FIGUEIRA, R. M. — Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Gaz. Méd. Bahia* 70:32-42, 1970.
5. 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.
6. BRENER, Z. & CHIARI, E. — Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 5:220-224, 1963.
7. BRENER, Z. — Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 59:19-26, 1965.
8. BRENER, Z. — The behaviour of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood stream of normal and immune mice. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 63:215-220, 1969.
9. CHAGAS, C. — Nova tripanozomíase humana: estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp. agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1:159-218, 1909.
10. FEDERICI, E. E.; ABELMANN, W. B. & NEVA, F. A. — Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 13:272-280, 1964.
11. JARPA, A.; AGOSIN, M.; CHRISTEN, R. & ATIAS, A. V. — Ensayos de quimioterapia de la enfermedad de Chagas experimental. VII — Cortisona e Fosfato de Pentaquina. *Bol. Inf. Parasit. Chilenas* 6:25-27, 1951.
12. NEHME, A.; AGOSIN, M.; CHRISTEN, R.; JARPA, A. & ATIAS, A. V. — Ensayos de quimioterapia de la enfermedad de Chagas experimental. VIII — Acción de la Cortisona sola y asociada al Fosfato de Pentaquina o al compuesto de Sulfato de Quinina-Fosfato de Pentaquina. *Bol. Inf. Parasit. Chilenas* 6:36, 1951.
13. NEHME, A.; BADINEZ, O.; JARPA, A.; THIERMAN, E.; AGOSIN, M. & CHRISTEN, R. — Acción de la Cortisona sobre la tripanosomiasis chagásica experimental del ratón suprarrenoprivo e total. *Bol. Inf. Parasit. Chilenas* 7:4-6, 1952.
14. NUSSENZWEIG, V. & GOBLE, F. — Further studies on the antigenic constitution of strains of *Trypanosoma (Schizotrypan) cruzi*. *Exp. Parasit.* 18:224-230, 1966.
15. PIZZI, T. — Sobre el problema de las formas delgadas de *Trypanosoma cruzi* (comunicación preliminar). *Bol. Inf. Parasit. Chilenas* 8:26-30, 1953.
16. PIZZI, T.; RUBIO, M. D.; PRAGER, R. S. & SILVA, R. C. — Acción de la Cortisona en la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*. *Bol. Inf. Parasit. Chilenas* 7:22-24, 1952.
17. PIZZI, T. & CHEMKE, J. S. — Acción de la Cortisona sobre la infección experimental de la rata por *T. cruzi*. *Biologica* 21:31-58, 1955.
18. SILVA, L. H. P. — Observações sobre o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 1:99-118, 1959.
19. THIERMANN, E. & CHRISTEN, R. A. — Influencia del acetato de Cortisona y de la Aureomicina como agente agravador de la infección chagásica atenuada. *Bol. Inf. Parasit. Chilenas* 7:53-55, 1952.

Recebido para publicação em 2/12/1971.