
**QUADRO HISTOPATOLÓGICO EM
CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS C3H/HeJ e
C57BL/10 NA FASE AGUDA DA INFECÇÃO COM
CEPAS DE *Trypanosoma cruzi* ISOLADAS
NAS REGIÕES CENTRAL (GOIÁS) E SUL
(RIO GRANDE DO SUL) DO BRASIL**

Helena Maria Bringel Martins,¹ Maria de Fátima Costa Alves,¹ Lucimeire Antonelli da Silveira,¹ Irmtraut Araci Hoffman Pfrimer,¹ e Sônia Gumes Andrade²

RESUMO

Foram estudadas as lesões histopatológicas determinadas em camundongos isogênicos das linhagens C3H/HeJ(C3H) e C57BL/10(B10) por quatro cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas de triatomíneos naturalmente infectados procedentes das localidades de Mambá, Cabeceiras, Niquelândia e Taguatinga (GO) e comparadas com as de uma cepa isolada do Rio Grande do Sul. As diferentes amostras foram submetidas previamente à caracterização morfológica e isoenzimática, obtendo-se para as cepas de Goiás as características biológicas do Tipo II e o zimodema 2. O estudo histopatológico evidenciou para as quatro cepas de Goiás características idênticas quanto ao tropismo tissular, determinando lesões discretas, predominantemente no miocárdio. As duas linhagens de camundongos reagiram de maneira idêntica à infecção por estas cepas, com discreta predominância de lesões na linhagem C3H. A cepa do Rio Grande do Sul apresentou um comportamento nitidamente diferente, induzindo lesões predominantemente em músculo esquelético, característica de cepas de Tipo III, zimodema 1. Os presentes achados confirmam estudos anteriores que demonstram a predominância de cepas do Tipo II na região Central do Brasil, o que pode estar correlacionado com as manifestações da doença de Chagas nesta área.

UNITERMOS: *Trypanosoma cruzi*. Cepas. Patologia experimental. Camundongos isogênicos. Doença de Chagas.

1 Laboratório de Imunologia Celular - DMIPP- Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, UFG-GO.

2 Chefe do Laboratório de Doença de Chagas Experimental- Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz de Salvador-BA.

Endereço para correspondência: Dep. Imunologia, IPTSP, UFG. Caixa Postal 131, CEP: 74001-970, Goiânia, GO.

Recebido para publicação em 11/09/97. Revisto em 11/03/98. Aceito em 21/03/98.

INTRODUÇÃO

Diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*, na sua interação com o animal experimental, induzem manifestações diversas da doença no que se refere à parasitemia, à mortalidade e ao quadro histopatológico (Andrade & Figueira, 1970) (3). O estudo de vários parâmetros permite classificar as cepas em um número limitado de tipos, como descrito por Andrade (1974) (1), os quais se constituem em biotemas que se distinguem pelos seus caracteres morfológicos e pelas lesões histopatológicas que determinam nos animais experimentais. Aos distintos caracteres biológicos correspondem diferentes perfis isoenzimáticos (Andrade et al., 1983) (5), que se enquadram nos zimodemas descritos por Miles (1980) (9). O estudo de cepas permite estabelecer a sua virulência, a sua patogenicidade e o seu tropismo tissular. A virulência é um parâmetro muito variável, não servindo, isoladamente, para caracterizar as amostras de *T. cruzi*. Por outro lado, a patogenicidade de uma amostra, que se traduz pela capacidade de induzir lesões tissulares, é independente do inóculo, sendo, portanto, uma característica constante para uma determinada cepa (Andrade, 1990) (2).

Com o objetivo de caracterizar cepas de *T. cruzi*, isoladas em Goiás, de triatomíneos naturalmente infectados e de compará-las com cepas de outras áreas geográficas, foram utilizadas quatro cepas isoladas de várias áreas deste Estado e uma cepa isolada do Rio Grande do Sul. As cepas foram previamente estudadas de acordo com os seus caracteres biológicos e isoenzimáticos (Martins, 1994) (8), verificando-se que as amostras isoladas em Goiás apresentavam os caracteres do Tipo II, zimodema 2, enquanto a do Rio Grande do Sul se enquadrava no Tipo III, zimodema 1.

No presente trabalho o quadro histopatológico determinado pelas mesmas foi estudado em duas linhagens isogênicas de camundongos, a C3H/HeJ e C57BL/10, as quais representam, respectivamente, uma linhagem suscetível e uma resistente dentro do espectro de resistência de diferentes linhagens de camundongos, tomando como base o tropismo tissular, a virulência e a patogenicidade (Andrade et al., 1985) (6). Considerando-se as diferenças observadas nas manifestações clínicas da doença de Chagas em diferentes áreas geográficas, este estudo poderá contribuir para um melhor conhecimento sobre o papel das cepas do parasito no determinismo destas diferenças regionais.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas de *T. cruzi*: neste estudo foram utilizadas cinco cepas isoladas de triatomíneos naturalmente infectados, coletados pela Fundação Nacional de Saúde, das localidades de Mambai - divisa de Goiás com a Bahia; Cabeceiras - divisa de Goiás com Minas Gerais; Niquelândia e Taguatinga ao

norte e ao leste do Estado de Goiás, respectivamente; foi também incluída uma cepa de *T. cruzi* procedente do Estado do Rio Grande do Sul. Estas cepas foram mantidas em laboratório através de passagens sanguíneas sucessivas, em camundongos suíços (Martins, 1994) (8).

Animais: foram utilizados 250 camundongos isogênicos C3H/HeJ e C57BL/10 de ambos os sexos com peso entre 15 e 17g e idade de 4 semanas, criados no Biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, da Universidade Federal de Goiás.

Infecção dos animais: 50 camundongos C3H/HeJ e C57BL/10 receberam, por via intraperitoneal, um inóculo padrão de 50.000 tripomastigotas sanguícolas de cada cepa de *T. cruzi*. Os parasitos, obtidos de camundongos suíços, foram separados das células do sangue por centrifugação e lavados duas vezes em salina tamponada pH 7.2 (Martins, 1994) (8).

Estudo histopatológico: foram sacrificados e autopsiados três camundongos nos dias 5, 7, 10, 12, 14, 20, 25 e 30 após a infecção. Fragmentos de miocárdio, músculo esquelético, baço e fígado foram fixados em formalina a 10%, incluídos em parafina e secções de 5µm de espessura foram coradas por hematoxilina - eosina.

RESULTADOS

Estudo histopatológico dos camundongos C3H e B10 infectados pelas cepas

Mambai - esta cepa determinou em camundongos C3H e B10 uma infecção tecidual de baixa intensidade, com escassos parasitos, processo inflamatório predominante no miocárdio, mesmo na ausência de parasitos, com discreto envolvimento de músculo esquelético. Estas características permitiram identificá-la como do Tipo II ou de baixa virulência. Considerando-se as duas linhagens de camundongos, não se observaram diferenças em relação às lesões miocárdicas. Entretanto, a linhagem C3H mostrou lesões necróticas em músculo esquelético que não estavam presentes na linhagem B10.

Niquelândia - as características histopatológicas permitiram identificar a cepa Niquelândia como do Tipo II de baixa virulência, determinando lesões inflamatórias no miocárdio. O músculo esquelético não foi afetado pelo processo. Houve um nítido estado reacional do baço sem macrofagotropismo. Comparando-se as duas linhagens de camundongos, foram observadas lesões discretamente mais intensas na fase avançada da infecção em camundongos C3H.

Cabeceiras – apareceram macrófagos parasitados tanto em baço como em fígado nas duas linhagens de animais infectados com esta cepa. A cepa Cabeceiras, tanto nos camundongos C3H como nos B10, mostrou as lesões características das cepas de Tipo II de baixa virulência (Figura 1), com parasitismo tissular mais evidente do que o observado na cepa Mambai, porém ainda escasso. Comparando-se as lesões nas duas linhagens de camundongos observou-se um grau discretamente maior de parasitismo na linhagem C3H, cuja mortalidade foi de 100% aos 23 dias.

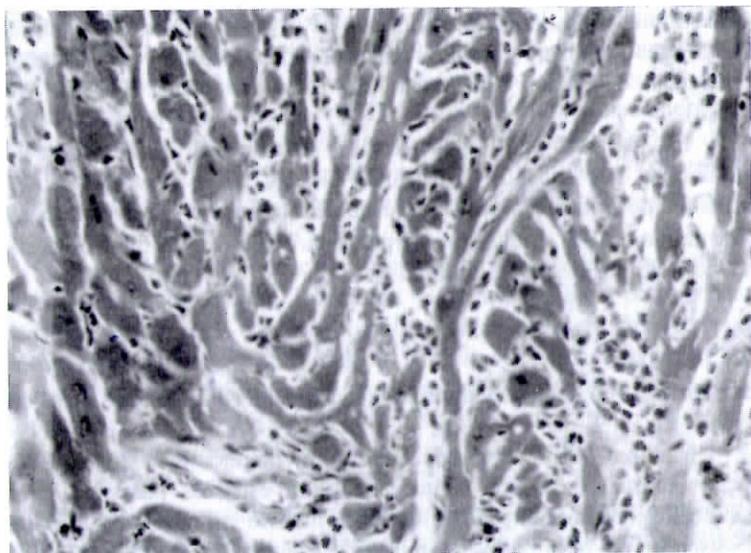


Figura 1. Miocardite crônica difusa em camundongos C57BL/10 infectados com a cepa de Cabeceiras. Observar a presença de infiltrado mononuclear difuso dissociando as fibras cardíacas e discreta fibrose (100x).

Taguatinga – esta cepa determinou tanto nos camundongos C3H como em B10 infecção de baixa virulência com lesões discretas a moderadas em miocárdio a partir do 14º dia de infecção, sem a presença de parasitos (Figura 2). O músculo esquelético mostrou apenas lesões discretas perivascularares na fase mais tardia, também sem parasitos. Houve um nítido estado reacional do baço, que persistiu até o final da observação, sem, entretanto, apresentar macrofagotropismo. Do ponto de vista histopatológico, a cepa Taguatinga apresentou as características do Tipo II de baixa

virulência. Através da análise histopatológica não foi possível detectar diferenças de suscetibilidade à infecção pela cepa Taguatinga nas duas linhagens de animais (C3H ou B10).

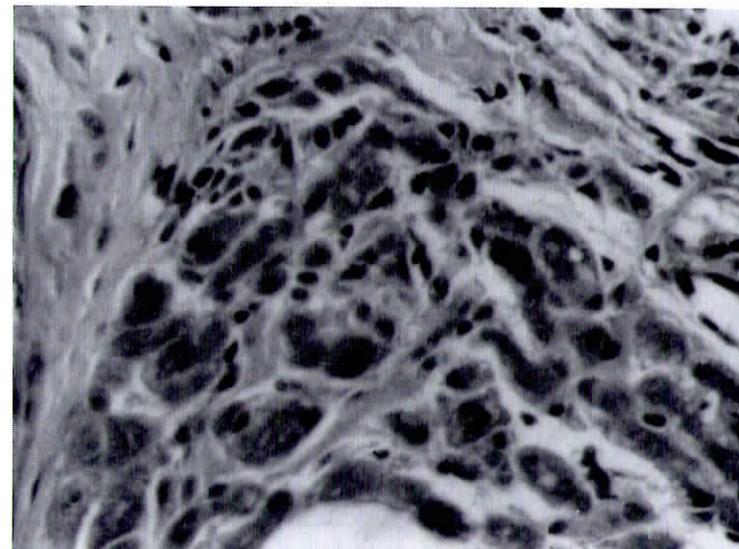


Figura 2. Miocardite em camundongos C3H/He infectados pela cepa Taguatinga (GO). Coração (septo interventricular) na região do feixe de His com dissociação das fibras por infiltrado mononuclear difuso e fibrose intersticial discreta (250x).

Rio Grande do Sul – esta cepa determinou lesões predominantes em músculo esquelético a partir do 12º dia de infecção. Tanto nos camundongos C3H como nos B10 as lesões eram constituídas por necrose de fibras, inflamação e intenso parasitismo, aspectos mais acentuados a partir do 25º dia de infecção (Figura 3). Houve também miocardite difusa e focal nos átrios com escasso parasitismo. O baço não mostrou alterações até o 10º dia de infecção e a partir do 12º dia houve um nítido estado reacional da polpa branca com hiperplasia de folículos linfóides, que persistiu até o 30º dia pós-infecção. Não foi observado macrofagotropismo.

A predominância das lesões necrótico-inflamatórias e do parasitismo no músculo esquelético permitiu caracterizar a cepa Rio Grande do Sul como do Tipo III. Comparando-se as lesões observadas nos camundongos C3H e B10, observou-se uma maior intensidade das lesões inflamatórias e do

parasitismo na linhagem B10. Portanto, esta linhagem comportou-se como mais suscetível do que a C3H à infecção pela cepa Rio Grande do Sul.

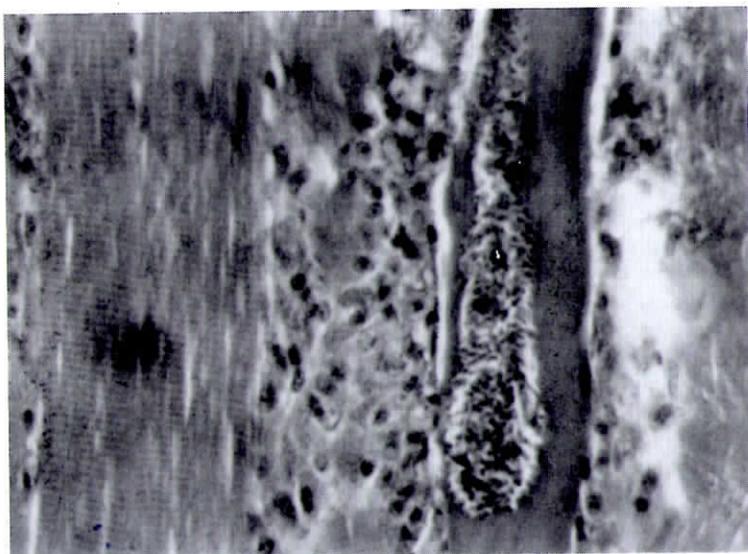


Figura 3. Comprometimento do músculo esquelético em camundongos C57BL/10, infectados com a cepa Rio Grande do Sul. Área de destruição de fibras musculares com denso infiltrado mononuclear e ninho parasitário intracelular (400x).

Para a avaliação do grau de lesões inflamatórias em miocárdio e no músculo esquelético, estabeleceu-se a seguinte graduação arbitrária: (+) indicando lesões discretas e focais, (++) lesões moderadas difusas ou focais e (+++) lesões difusas e intensas (Tabela 1).

Tabela 1. Parasitismo tissular*, inflamação**, estado reacional do baço de camundongos C3H/HeJ e C57BL/10 inoculados com 50000 tripomastigotas de várias cepas de *T. cruzi*

Cepas de <i>T. cruzi</i>	Grau de Inflamação						Baço Estado reacional Hiperplasia polpa branca	
	C3H/HeJ			C57BL/10			C3H/HeJ	C57BL/10
	Coração	Mús. Esq.	Fígado	Coração	Mús. Esq.	Fígado		
Mambai	- (7 ^o) ++ (10 ^o) Focal +++ (20 ^o - 30 ^o)	++ (14 ^o) ++ (20 ^o)	---	- (7 ^o) -(10 ^o - 12 ^o) focal ++ (12 ^o - 20 ^o) +++ (20 ^o - 30 ^o)	-(20 ^o) +(25 ^o - 30 ^o)	+ / ++	+	++ (12 ^o)
Cabeceiras	++ (>10 ^o) +++ (20 ^o)	---	---	-(10 ^o) focal ++ (12 ^o) +++ (20 ^o - 30 ^o)	-(5 ^o - 20 ^o) +(25 ^o - 30 ^o)	---	+++	+ / ++
Niquelândia	+ (>7 ^o) Local +(10 ^o - 14 ^o) Difusa	---	---	+(7 ^o - 10 ^o) focal +(10 ^o - 20 ^o) difusa ++ (20 ^o - 30 ^o)	---	---	+++	+ (5 ^o) ++ (>10 ^o)
Taguatinga	+ / ++ (14 ^o - 20 ^o) + / + / +++ (25 ^o - 30 ^o)	+(14 ^o - 20 ^o) +(25 ^o - 30 ^o)	---	+(14 ^o - 25 ^o) focal ++ (30 ^o) difusa	---	+	+	+(5 ^o) +++ (12 ^o - 30 ^o)
Rio Grande do Sul	-(5 ^o - 10 ^o) +(12 ^o - 14 ^o) focal ++ (20 ^o - 30 ^o)	---	---	-(5 ^o - 12 ^o) +(12 ^o - 14 ^o) focal + / + / +++ (20 ^o - 30 ^o)	+(14 ^o) +++ (20 ^o - 30 ^o)	---	- (10 ^o) ++ (12 ^o - 30 ^o)	-(12 ^o) ++ (14 ^o)

* Parasitismo tissular: discreto(+) em coração e negativo(-) em músculo esquelético no 12^o dias- cepas Mambai e Cabeceiras; discreto(+) em coração e intenso(+++) em músculo esquelético no 20^o - 30^o dias- cepa R.G.Sul; negativo(---) cepas Niquelândia e Taguatinga; discreto(+) no fígado e baço- cepa Cabeceiras.

** Grau de inflamação

+ = lesões discretas e focais

++ = lesões moderadas, difusas ou focais

+++ = lesões difusas e intensas

--- = ausente

DISCUSSÃO

O estudo das lesões histopatológicas determinadas em duas linhagens isogênicas de camundongos pelas cepas isoladas de diferentes áreas de Goiás demonstrou dois aspectos de interesse para a patologia da doença de Chagas nessa área. Em primeiro lugar, a predominância nos animais experimentais de lesões de miocárdio; este tropismo para o músculo cardíaco pode significar, no homem, a presença de cardiopatia como a principal manifestação da doença. Em segundo lugar, confirmou-se a predominância de um único tipo de cepa entre as amostras estudadas, fato anteriormente demonstrado por Andrade & Magalhães (1997) (4), que estudaram 28 cepas de Mambai e as classificaram em um único tipo biológico. O uso de camundongos isogênicos no presente trabalho permitiu verificar que:

- 1) o padrão de resposta de uma mesma linhagem foi independente do sexo dos animais e diferiu de acordo com o tipo da cepa;
- 2) a linhagem C3H foi mais suscetível às cepas de Tipo II;
- 3) a linhagem B10 foi mais suscetível à infecção pela cepa de Tipo III.

De acordo com Andrade et al. (1985) (6), o padrão de comportamento das linhagens isogênicas de camundongos varia de acordo

com a cepa do parasito, constituindo-se em um verdadeiro espectro de resposta das diferentes linhagens. É de interesse assinalar que a cepa do Rio Grande do Sul foi caracterizada como de Tipo III, zimodema 1, pois as cepas deste tipo são de origem silvestre e provavelmente associadas aos reservatórios silvestres, podendo vir a contaminar o homem.

Morales et al. (1987) (10) sugerem que os camundongos C3H experimentalmente infectados por *T. cruzi* sejam um bom modelo de laboratório para o estudo das lesões cardíacas da doença de Chagas. Estes autores observaram que esta linhagem apresentou lesões associadas à infecção em 74% dos animais e uma baixa porcentagem de lesões não específicas no grupo controle.

Os nossos resultados confirmam a não-vinculação entre carga parasitária tecidual e altos níveis de parasitemia ou mortalidade (dados não mostrados), quando se analisam diferentes cepas de *T. cruzi*. Estas observações somadas às de Romanha (1982) (11), Andrade et al. (1985) (6) e, posteriormente, às de Silva et al. (1992) (12), indicam que a evolução do parasitismo no hospedeiro vertebrado está associada a fatores intrínsecos à população de parasitos infectantes, além de fatores do hospedeiro.

Observações experimentais e em humanos mostram que, embora o *T. cruzi* possa parasitar qualquer célula do organismo, existem cepas com tropismo dominante para certos tipos celulares. Algumas cepas, como a Colombiana, são miotrópicas; outras, como a Y, são macrofagotrópicas. As diferenças de tropismo podem estar relacionadas à presença de diferentes glicoproteínas na superfície do *T. cruzi* das várias cepas. A porção carboidrato destas moléculas seria determinante nos mecanismos de reconhecimento das células entre si (Araújo & Souza, 1984) (7). Todas as cepas por nós estudadas, independentes da linhagem do camundongo, apresentaram caráter miotrópico; nas de Goiás as lesões predominam no músculo cardíaco, enquanto na cepa do Rio Grande do Sul o músculo esquelético foi o mais afetado.

Tem sido constatada a presença de um mesmo tipo de cepa em uma mesma área, como em São Felipe-BA (Andrade, 1974) (1) e em Mambai (Andrade e Magalhães, 1997) (4). A presente observação de que as cepas do *T. cruzi*, isoladas de diferentes localidades de Goiás, têm um comportamento uniforme e determinam lesões histopatológicas idênticas, sugere que a cepa do parasito pode ser um importante fator na determinação dos quadros clínico-patológicos da doença nessa área.

SUMMARY

Histopathological study in isogenic C3H/HeJ and C57BL/10 mice during the acute phase of the infection with *Trypanosoma cruzi* isolates from central (Goiás) and south (R.G. Sul) regions of Brazil

The histopathological lesions determined in isogenic C3H and B10 mice infected with *T. cruzi* strains isolated from naturally infected triatominae from four different localities of the Goiás State, Brasil, (Mambai, Cabeceiras, Niquelândia and Taguatinga) were studied and compared with another strain from Rio Grande do Sul State. The several isolates from Goiás have been previously characterized according to their biological and biochemical behavior as Type II and zymodeme 2. Histopathological studies have shown similar tropism and tissue lesions for the four strains from Goiás. Cardiac lesions were predominant, with moderate diffuse mononuclear infiltration and myocardial cells parasitism. Skeletal muscle lesions were scarce or absent and macrophagotropism occurred only exceptionally. The lesions were identical for the two strains of mice being slightly more intense in C3H mice with the four *T. cruzi* studied strains. The strain from Rio Grande do Sul State, characterized as Type III, zymodeme 1, determined skeletal muscle lesions and predominance of lesions in B10 mice. The present investigation confirms previous observations showing that the Type II strains are predominant in the central region of Brazil and this may be correlated with the Chagas disease manifestations in this area.

KEYWORDS: *Trypanosoma cruzi*. Strains. Experimental pathology. Inbred mice. Chagas disease.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. Andrade, S.G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano (Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). *Rev. Pat. Trop.*, 3: 65-121, 1974
02. Andrade, S.G. Influence of *T. cruzi* strain on the pathogenesis myocardopathy mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 85:17-27, 1990.
03. Andrade, S.G.; Figueira, R.M. Caracterização morfo-biológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Gaz. Med. Bahia*, 70:32-42, 1970.
04. Andrade, S.G.; Magalhães, J.B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 30:27-35, 1997.
05. Andrade, V.; Brodskyn, C.; Andrade, S.G., Correlation between isoenzyme patterns and biological behavior of different strains of *T. cruzi*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77: 796-799, 1983.

06. Andrade, V.; Barral-Netto, M.; Andrade, S.G. Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. *Bras. J. Med. Biol. Res.*, 18: 499-506, 1985.
07. Araújo-Jorge, T.C.; Souza, W. Effect of carbohydrates periodate and enzymes in the process of endocytosis of *Trypanosoma cruzi* by macrophages. *Acta. Trop.*, 41: 17-20, 1984.
08. Martins, H.M.B. *Estudo comparativo da infecção por cinco cepas de Trypanosoma cruzi em duas linhagens de camundongos isogênicos*. São Paulo, 1994. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. 133 p.
09. Miles, M.A.; Lanham, S.M.; Souza, A.A.; Póvoa, M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 74: 221-23, 1980.
10. Morales, M.C.; Cardoni, R.L.; Rimoldi, M.T.; Esteva, M.; Milei, J. Heart damage comparing three strains of mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Medicina*. Buenos Aires, 47: 493-9, 1987.
11. Romanha, A J. *Heterogeneidade enzimática do Trypanosoma cruzi*. Rio de Janeiro, 1982. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. 110 p.
12. Silva, J.S.; Morrissey, P.J.; Grabstein, K.H.; Mohler, K.M.; Anderson, D.; Reed, S.G. Interleukin 10 and interferon-gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.*, 175: 169-74, 1992.