

## AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE DIFERENTES CEPAS DO *TRYPANOSOMA CRUZI* NA INFECÇÃO DE SEIS LINHAGENS ISOGÊNICAS DE CAMUNDONGOS

Virgínia Andrade, Sonla G. Andrade, Manoel Barral Netto, Albélia L. Pontes e  
Rosângela Castro.

*O estudo da infecção de camundongos de seis diferentes linhagens isogênicas (A/J, AKR, Balb/c, C3H, C57BL/10 e DBA) pelas cepas do Trypanosoma cruzi peruana (Tipo I), 21SF (Tipo II) e colombiana (Tipo III) demonstrou que as diferentes cepas do T. cruzi conservam os seus caracteres básicos na infecção das diversas linhagens de camundongos. O grau de resistência de cada linhagem varia conforme o tipo da cepa. Todas as linhagens mostraram alta susceptibilidade à infecção pela cepa peruana; em relação às cepas 21SF e colombiana, os padrões de resistência de cada linhagem variam de acordo com a cepa, formando um espectro, que difere entre as duas cepas citadas, sendo em geral mais resistentes as linhagens DBA e B-10 e menos resistentes as linhagens AKR e A/J. Os animais de todas as linhagens infectados com quaisquer das cepas apresentaram alterações das imunoglobulinas com diminuição precoce da IgG<sub>1</sub> e elevação de IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> e IgM. Houve uma correlação entre o aumento de IgG<sub>2a</sub> e o grau de reação inflamatória. O infiltrado inflamatório variou de acordo com as linhagens de camundongo, sendo moderado e mononuclear nas mais susceptíveis e com predomínio de polimorfonucleares nas mais resistentes. Os resultados sugerem que as características do parasito são o fator determinante do padrão básico da infecção pelo T. cruzi.*

Palavras chaves: *Trypanosoma cruzi*. Cepas do *T. cruzi*. Tipos de cepas. Camundongos isogênicos.

O conceito de que diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* podem ser agrupadas de acordo com caracteres comuns em um número limitado de tipos ou padrões<sup>1</sup> e classificadas em tipo I, II ou III de acordo com vários parâmetros foi recentemente reforçado ao se comprovar que os tipos referidos, além de se distinguirem pelos seus caracteres morfológicos, também se distinguem pelos seus padrões isoenzimáticos<sup>3</sup> além de apresentarem caracteres antigênicos distintos<sup>2</sup>. Outros autores têm descrito diferenças de comportamento de cepas diversas do *T. cruzi*<sup>6</sup>. Re-

centemente, critérios bioquímicos têm permitido classificar as cepas em zimodemas<sup>15 23</sup> de acordo com o padrão isoenzimático, ou em esquidemas<sup>16 17</sup> de acordo com a análise do DNA do cinetoplasto, sem entretanto permitir uma correlação direta com os quadros patológicos determinados pelas diferentes cepas. Deste modo, a classificação em tipos, como foi proposta<sup>1</sup>, levando em conta as relações hospedeiro/parasito, procura relacionar as características intra-específicas e a patogenicidade das cepas para o animal experimental. Os parâmetros utilizados para esta classificação foram a virulência e a patogenicidade, a evolução da parasitemia, a morfologia do parasito no sangue periférico, o tropismo tissular e o tipo de lesão histopatológica. Todos estes dados foram entretanto obtidos no estudo de camundongos suíços, não isogênicos. Levando-se em conta os diferentes graus de susceptibilidade de linhagens isogênicas de camundongos, como descrito por Trischmann<sup>29 30</sup>, torna-se de interesse verificar se as diferentes cepas mantêm os seus caracteres básicos que permitiram classificá-las em tipos, ao serem inoculadas em camundongos isogênicos de diferentes

---

Trabalho desenvolvido no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ/UFBA e financiado pelo National Institute of Health Grant nº 16282; pelo UNDP/ World Bank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIDE V).

Endereço para Correspondência: Dra. Sonia G. Andrade, CPqGM, Rua Valdemar Falcão, 121, Brotas, 40.000 – Salvador, Bahia, Brasil.

Recebido para publicação em 14/07/84

linhagens. É também de interesse verificar o comportamento de cada linhagem em relação às 3 cepas do *T. cruzi* em estudo.

O presente trabalho tem por objetivo: 1) descrever as alterações produzidas por três diferentes tipos de cepas do *T. cruzi* em seis linhagens isogênicas de camundongos e 2) verificar se os caracteres de um determinado tipo de cepa se mantêm, independentemente da linhagem utilizada para a infecção.

## MATERIAL E MÉTODOS

*Cepas do Trypanosoma cruzi* – Foram utilizadas cepas do *T. cruzi* de três diferentes tipos, as quais foram caracterizadas de acordo com os caracteres morfológicos, histopatológicos e isoenzimáticos e vêm sendo mantidas em laboratório por passagens sucessivas em camundongos: 1) *Cepa peruana* isolada de caso humano do Peru<sup>18</sup> e caracterizada como de Tipo I; 2) *Cepa 21 SF*, isolada de caso humano agudo de São Felipe – Bahia, caracterizada como de Tipo II<sup>24</sup>; *Cepa Colombiana* isolada de caso humano da Colombia<sup>11</sup> e caracterizada como de Tipo III.

*Linhagens de camundongos* – Foram utilizados camundongos de ambos os sexos, com peso entre 13 e 17g, das seguintes linhagens isogênicas: A/J (H-2<sup>a</sup>), AKR (H-2<sup>k</sup>), Balb/c (H-2<sup>d</sup>), C<sub>3</sub>H/He (H-2<sup>k</sup>), C57BL/10 (H-2<sup>b</sup>) e DBA/1 (H-2<sup>q</sup>). Os camundongos isogênico vêm sendo mantidos no Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, através de cruzamentos exclusivos irmão/irmã e alimentados com ração padronizada e água “ad libitum”.

*Inóculos* – Foram utilizadas formas sanguíneas obtidas de camundongos suíços infectados, após três lavagens por centrifugação, com salina tamponada. O inóculo foi de 100.000 tripomastigotas por camundongo, calculado pelo método de Pizzi e Prager<sup>19</sup> modificado por Brener<sup>5</sup>.

*Grupos experimentais* – Foram utilizados 60 camundongos de cada linhagem, divididos em três grupos, de 20 camundongos cada um, correspondendo à infecção com uma das três cepas do *T. cruzi*: Peruana, 21SF ou Colombiana. Foram assim feitos 18 grupos experimentais sendo três grupos para cada linhagem de camundongo utilizada.

Os parâmetros utilizados para a avaliação dos resultados foram: parasitemia, mortalidade, dosagem

das imunoglobulinas do soro, títulos de anticorpos específicos, teste cutâneo de hipersensibilidade celular e estudo histopatológico.

Foi feita a avaliação diária da parasitemia a partir do 3º dia infecção, em 5 µl de sangue periférico entre lâmina e laminula 22 x 22, através da contagem de formas tripomastigotas em 50 campos microscópicos de 400x.

*Índice de mortalidade* – Foi feita diariamente a contagem do número de animais que morreram durante o curso da infecção, fazendo-se a percentagem em relação ao número total, após a exclusão dos sacrificados.

*Estudo histopatológico* – Durante o curso da infecção foram sacrificados dois animais nos seguintes dias pós-infecção: 5º, 7º, 10º, 12º, 14º, 20º, 25º e 30º. Secções do coração, músculo esquelético, fígado e baço foram incluídos em parafina e as secções de 5 µm coradas pela hematoxilina e eosina.

*Obtenção dos soros* – Ao serem sacrificados os animais, foi feita a colheita do sangue, para obtenção do soro após coagulação e centrifugação a 1000 g/5min.

*Dosagem de imunoglobulinas* – Os soros foram analisados pela técnica da imunodifusão radial quantitativa de acordo com Mancini<sup>14</sup> em placas fornecidas pelo Meloy Lab. Inc. e soro padrão controle fornecido pelo mesmo Laboratório.

*Titulação dos anticorpos específicos* – Foi utilizada a técnica de imunofluorescência indireta de acordo com Camargo<sup>8</sup> utilizando-se como antígeno formas de cultura do *T. cruzi* após lavagem com salina tamponada, fixadas por acetona desidratada em lâminas marcadas. Utilizou-se anti-soro fluoresceinado anti-IgG e anti-IgM fornecidos por Cappel Laboratories, USA, na concentração de 1:40.

*Estudo da resposta celular* – O teste cutâneo foi feito com antígeno de formas de cultura do *T. cruzi* após lavagem em salina e rotura por congelamento e descongelamento (3 vezes) em nitrogênio líquido. Foram injetados 50 µg do antígeno em uma das patas e a pata contralateral injetada com salina. A medida das patas foi feita após 24 e 48 horas, utilizando-se micrômetro circular (marca Starret).

*Estudo estatístico* – A comparação entre os diversos grupos e parâmetros foi feita através de análise de variância, sendo que, quando apenas dois grupos foram comparados entre si, utilizou-se o test T de Student para mostras independentes.

## RESULTADOS

A avaliação dos níveis parasitêmicos dos animais das diferentes linhagens, inoculados com as três cepas do *T. cruzi* constam das Figuras 1, 2 e 3 e Tabelas 1, 3, 4 e 5. Observa-se na infecção pela cepa Peruana, progressão rápida e precoce da parasitemia em todas as linhagens, com piques máximos 12 dias após inoculação, variando, entretanto quantitativamente, os níveis máximos atingidos. Considerando-se a parasitemia média (média do logaritmo), pôde-se considerar como de baixa parasitemia os animais C<sub>3</sub>H e DBA; média parasitemia, A/J e B-10 e alta parasitemia, BALB/c e AKR (Tabela 1). O perfil da curva parasitêmica é característico da cepa Tipo I (peruana) em todas as linhagens. Os animais infectados pela cepa 21SF (Tipo II), independentemente da linhagem analisada, apresentaram piques parasitêmicos irregulares (Fig. 2). Embora o aspecto geral da curva seja semelhante nas diversas linhagens, o valor máximo da

parasitemia variou, podendo-se considerar, de acordo com a parasitemia média (média do logaritmo), os B-10 como de baixa parasitemia; AKR e C<sub>3</sub>H como de parasitemia média baixa; DBA e Balb/c como de parasitemia média alta os A/J como de alta parasitemia (Tabela 1). Na infecção pela cepa Colombiana (Tipo III) a parasitemia tem evolução lenta nas diversas linhagens, variando entretanto os níveis máximos de uma para outra. A média da parasitemia (logaritmo da média), durante toda a infecção, também variou conforme a linhagem (Tabela 1), podendo-se destacar os animais DBA como de baixa parasitemia; AKR e C<sub>3</sub>H como de parasitemia média baixa; A/J e B-10, com parasitemia média alta e os Balb/c como de alta parasitemia.

*Índices de mortalidade* – A mortalidade acumulada dos animais das diversas linhagens, em relação a cada cepa, está expressa na Tabela 2.

Tabela 1 – Distribuição das diferentes linhagens de camundongos infectados pelas cepas Peruana, São Felipe e Colombiana do *T. cruzi*, de acordo com a média da parasitemia\* e títulos de anticorpos específicos\*\*

Cepas		Linhagens					
Peruana	Parasitemia	C <sub>3</sub> H 1,44	DBA 1,47	A/J 1,75	B10 1,76	BALB/C 1,80	AKR 2,38
	IgG anti- <i>T. cruzi</i>	1:8	1:4	Neg	Neg	1:2	1:8
		Linhagens					
São Felipe	Parasitemia	B10 0,93	AKR 1,19	C <sub>3</sub> H 1,27	DBA 1,59	BALB/C 1,75	A/J 3,75
	IgG anti- <i>T. cruzi</i>	1:16	1:4	1:128	1:32	1:4	1:128
		Linhagens					
Colombiana	Parasitemia	DBA 0,99	AKR 1,29	C <sub>3</sub> H 1,30	A/J 1,38	B10 1,39	BALB/C 1,80
	IgG anti- <i>T. cruzi</i>	1:32	1:32	1:16	1:32	1:2	1:32

\* Parasitemia: Média do logaritmo da parasitemia de cinco animais durante a infecção. As linhagens estão organizadas em ordem crescente em relação à média de parasitemia.

\*\* Título máximo de anticorpos específicos (IgG), para cada linhagem, durante a infecção com as três cepas do *T. cruzi* (este de imunofluorescência indireta).

Tabela 2 - Mortalidade acumulada (%) de camundongos de diferentes linhagens infectados com três diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*

Linhagens	Cepa peruana						Cepa 21 SF						Cepa colombiana					
	C <sub>3</sub> H	DBA	AKR	B <sub>10</sub>	Balb/c	A/J	C <sub>3</sub> H	DBA	AKR	B <sub>10</sub>	Balb/c	A/J	C <sub>3</sub> H	DBA	AKR	B <sub>10</sub>	Balb/c	A/J
11 - 15	100	80	100	90	100	100	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16 - 20		100		100			30	10	100	0	10	50	0	20	40	0	20	90
21 - 25							40	10	0	20	50	0	20	100	30	60	90	90
26 - 30							60	10	0	20	50	70	20		90	90	90	90

Mortalidade acumulada, em porcentagem, observada na fase aguda da infecção em seis linhagens de camundongo por três cepas do *T. cruzi*.

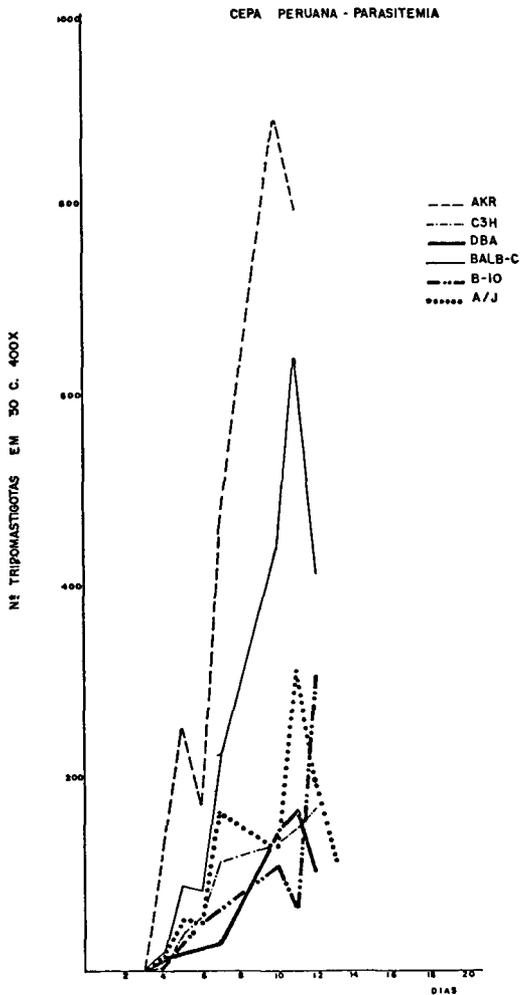


Figura 1 - Níveis parasitêmicos de camundongos de seis diferentes linhagens infectados com a cepa Peruana do *T. cruzi*.

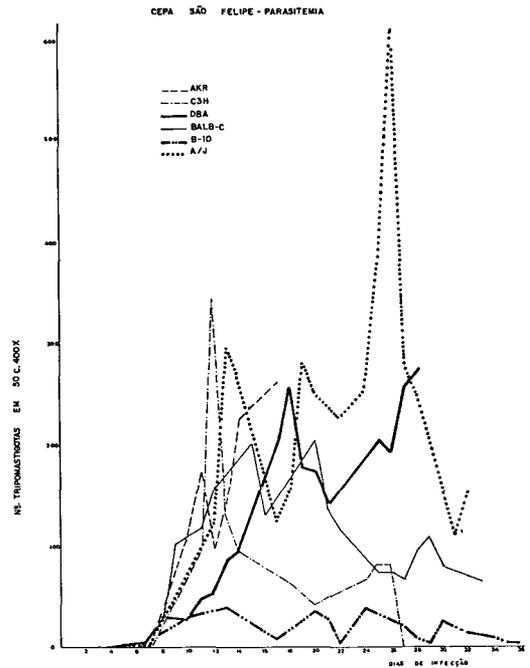


Figura 2 - Níveis parasitêmicos de camundongos de diferentes linhagens infectados com a cepa 21 SF do *T. cruzi*.

Andrade V, Andrade SG, Barral Netto M, Pontes AL, Castro R. Avaliação do comportamento de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* na infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 18: 143-154, Jul-Set, 1985

Tabela 3 – Correlação entre níveis parasitêmicos, parasitismo tissular, inflamação, estado reacional do baço e os níveis das frações de imunoglobulinas em camundongos de diferentes linhagens, infectados pelo *T. cruzi*.

Cepa peruana – Tipo I

Linhagem	Dias Infec.	Parasitemia Nº Trip/50c	Parasitismo tissular			Inflamação		Baço		Níveis de Imunoglobulinas			
			Coração	M. esquel.	Fígado	Coração	M. esquel.	Parasi- tismo	Hiperplasia Polpa branca	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgM
C <sub>3</sub> H	7	104,71	+	-	+	+	-	++	++	0,30	1,52	0,76	0,59
	10	120,23	++	-	+	++	+focal	-	+++	0,12	1,52	0,76	0,59
	12	169,82	++	-	++	+	+	+++	+++	0,12	3,04	0,76	1,02
DBA	7	21,88	+	-	+	-	-	+	++	0,42	0,71	3,24	4,58
	10	134,90	+	-	+	-	+focal	+	++	0,18	1,42	3,24	4,58
	12	102,33	++	-	++	++	++	+	++	0,18	1,83	4,21	4,58
Balb/c	7	169,82	-	-	+	-	-	+	+	0,23	0,41	0,75	0,59
	10	380,19	+	+	-	++	-	+	++	0,07	1,64	1,00	2,03
	12	263,03	++	-	+	++	+	+	+++	0,07	1,10	1,00	2,03
B <sub>10</sub>	6	45,71	-	-	+	+focal	-	+	+	0,71	1,33	0,73	0,30
	10	95,50	+	+focal	+	+	-	+++	++	0,35	1,33	0,36	0,52
	13	288,40	+	+	+	++	+	+	++	0,27	2,67	0,54	2,06
AKR	7	446,68	++	-	+	-	-	+++	+++	0,21	0,70	0,85	5,15
	11	758,58	++	-	++	-	-	+++	+++	0,21	0,70	1,02	5,15
	13	-	+++	+	+	+	+focal	+++	++++	0,17	1,72	1,62	5,15
A/J	7	194,98	+	-	+	-	-	+	+	0,16	0,27	0,13	2,03
	10	131,82	++	-	++	+focal	+focal	++	+++	0,13	0,71	0,31	2,03
	12	147,91	++	+	+	++	++	+++	+++	0,16	1,06	0,39	3,04
	13	-	+	-	+	+	-	++	++	0,16	0,42	0,31	2,01

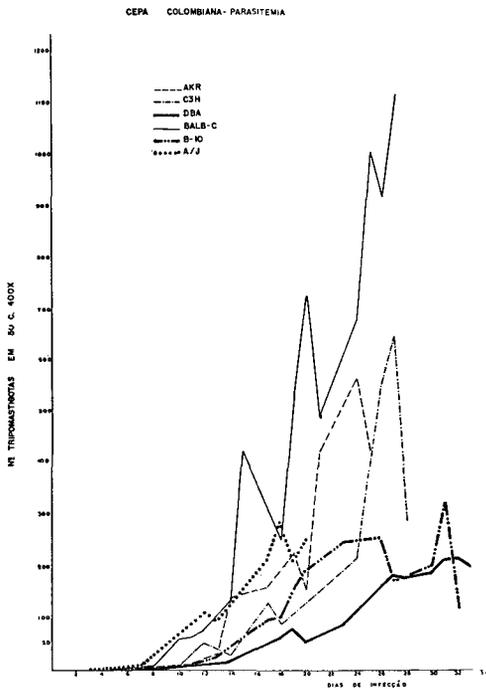


Figura 3 – Níveis parasitêmicos de camundongos de seis linhagens infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*.

A resistência das diferentes linhagens a cada uma das cepas do *T. cruzi* foi avaliada através da comparação, pela análise da variância, da média harmônica da sobrevivência. Na infecção pela cepa peruana (Tipo I), todas as linhagens se mostraram muito susceptíveis, com mortalidade total até o 20º dia nos camundongos DBA e B-10 e até o 15º dia nos demais. Na infecção pela cepa 21 SF (Tipo II), a

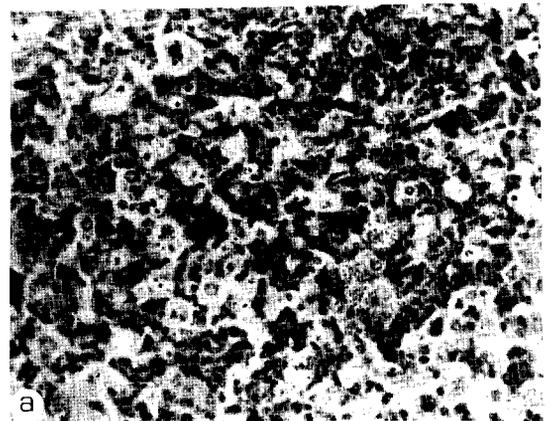


Figura 4a – Hiperplasia do centro germinal de folículo linfóide do baço com macrófagos contendo amastigotas do *T. cruzi*; linhagem AKR infecção pela cepa Peruana; 250 X.

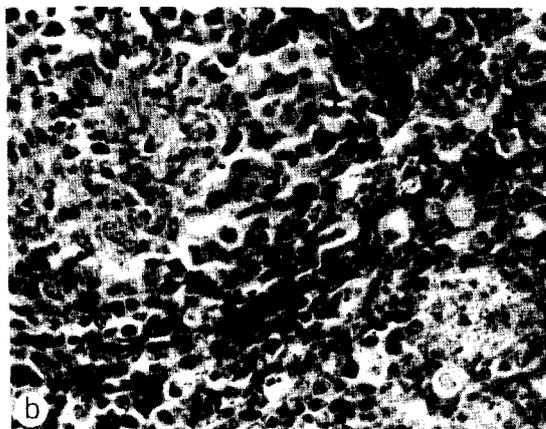


Figura 4b – Reação epitelióide na polpa vermelha do baço e presença de macrófagos contendo amastigotas do *T. cruzi*: linhagem DBA infectada pela cepa Peruana 400X.

resistência variou entre dois extremos, sendo os AKR muito susceptíveis, com 100% de mortalidade até o 20º dia de infecção e os B-10 muito resistentes, com mortalidade nula. Em ordem decrescente quanto à resistência, podemos estabelecer o seguinte espectro de resistência à infecção pela cepa 21 SF:

B-10 – DBA – Balb/c – C3H – A/J – AKR.

Na infecção pela cepa colombiana (Tipo III) as diferenças entre as linhagens são menos acentuadas. Considerando em ordem decrescente quanto ao espectro da resistência, as diversas linhagens podem ser organizadas na seguinte seqüência: DBA – C3H – B-10 – Balb/c – AKR – A/J.

Tabela 4 – Correlação entre níveis parasitêmicos, parasitismo tissular, inflamação, estado reacional do baço e os níveis das frações de imunoglobulinas em camundongos de diferentes linhagens, infectados pelo *T. cruzi*.

Cepa 21 Sf (São Felipe) – Tipo II

Linhagem	Dias Infec.	Parasitemia Nº Trip/50c	Parasitismo tissular		Inflamação		Baço	Níveis de Imunoglobulinas			
			Coração	M. esquel.	Coração	M. esquel.	Hiperplasia Polpa branca	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgM
C3H	12	234,42	–	–	+	–	++	0,23	0,76	2,35	5,7
	14	74,13	+	–	++	+	+++	0,31	0,76	2,87	5,7
	20	31,62	–	+	+focal	+++	+	0,61	1,52	3,16	7,96
	25	33,88	+	+	+focal	++++*	+	1,83	6,09	3,93	5,7
	27	–	+	+	+focal	++++*	++	1,22	6,09	3,93	7,96
DBA	12	47,86	+	+	+	+	++	0,22	–	6,07	2,73
	16	251,19	–	–	++	+++	++	0,16	–	8,07	5,97
	20	165,96	+	+	+	+	+	0,22	–	10,16	3,64
	25	186,21	+	+	++	+++*	+	0,22	–	12,14	1,69
	32	–	+	+	++	+++*	–	0,44	–	12,21	3,64
Balb/c	12	138,04	–	+	+	+	+++	1,85	2,19	2,12	8,11
	15	22,39	+	+	+++	++++*	++	0,69	3,29	2,12	4,06
	20	204,17	+	++	+	++++*	++	1,84	4,39	4,0	4,06
	26	36,31	+	+	++	+++	+++	1,39	4,39	3,20	6,09
	30	52,48	–	–	++	++++*	+++	2,77	3,29	16,0	16,23
B10	12	33,88	+	+	+	++	++	0,13	2,67	1,45	4,95
	15	–	–	+	++	+++*	++	0,26	5,34	2,18	6,60
	20	24,55	+	++	++	+++*	++	0,13	2,67	1,24	3,71
	26	8,51	–	++	++	++	++	0,35	24,54	2,91	11,54
	30	4,17	–	+	++	++	++	1,42	10,67	2,91	11,54
AKR	12	93,32	–	–	–	–	+++	0,10	0,86	1,68	3,84
	14	218,78	+	+	+	++	+++	0,10	3,58	2,93	5,25
	17	251,19	+	++	+	+++	+++	–	3,58	2,93	7,08
A/J	12	87,10	–	++	–	+	+++	0,07	0,19	0,47	2,64
	14	186,21	–	+	+	++	++	0,06	0,27	0,47	2,64
	20	239,88	++	+++	++	+++*	++	0,32	0,71	0,95	4,06
	23	141,25	++	+++	+++	+++	+++	1,26	5,67	1,95	8,12
	30	48,98	++	–	++	+++*	+++	1,26	5,67	0,95	5,68

(\*) Lesões musculares predominantemente necróticas.

Tabela 5 - Correlação entre níveis parasitemicos, parasitismo tissular, inflamação, estado reacional do baço e os níveis das frações de imunoglobulinas em camundongos de diferentes linhagens, infectados pelo *T. cruzi*.

*Cepa colombiana - Tipo III*

Linhagem	Dias Infec.	Parasitemia Nº Trip/50c	Parasitismo tissular		Inflamação		Baço Hiperplasia Polpa branca	Níveis de Imunoglobulinas			
			Coração	M. esquel.	Coração	M. esquel.		IgG1	IgG2a	IgG2b	IgM
C3H	12	27,54	+	-	-	-	nd	0,12	0,76	0,50	1,02
	15	9,77	+	-	+	-	++	0,30	2,28	0,76	1,02
	20	120,23	++	++	+	++	++	0,61	3,04	1,01	0,59
	26	457,09	+++	+++	+++	+++	+++	1,22	6,09	2,02	2,03
DBA	12	9,77	-	-	+focal	-	nd	0,66	0,88	4,16	5,19
	15	8,71	+	+	+	++	++	0,42	2,13	4,23	6,10
	20	41,69	++	++	++	+++	++	0,24	2,82	5,29	6,10
	26	147,91	++	+++	++	+++	++	0,48	4,23	5,93	-
Balb/c	12	69,18	+	+	-	-	++	0,92	2,19	2,12	4,06
	15	128,82	+++	+	+++	++	++	1,35	4,39	3,20	4,06
	20	602,56	++	++	++	+++	++	1,85	4,39	8,00	6,09
B10	12	18,20	+	-	+	+focal	++	0,35	0,63	1,45	1,84
	14	42,66	+	-	++	+	+++	0,71	1,29	1,74	2,47
	21	-	++	+++	+++	+++	+++	0,35	2,67	2,53	4,95
	25	257,04	++	++	+++	+++	+++	0,35	10,67	1,74	4,95
	30	-	++	++	+++	+++	+++	0,35	4,00	1,45	3,71
AKR	11	6,92	-	-	-	-	++	0,77	0,89	1,63	4,43
	13	16,22	+	-	-	-	++	0,77	8,67	2,50	5,14
	17	107,15	++	++	++	+++	+++	1,21	2,78	2,50	8,86
	20	69,18	+++	+++	+++	+++	+++	1,21	1,19	3,69	8,86
A/J	12	107,15	+	+	+	+	+++	0,03	0,07	0,39	2,64
	14	120,23	++	++	+	+	+++	0,04	0,19	0,47	2,64
	20	223,87	+++	+++	+	+++	+++	0,08	0,71	0,76	4,06

**Avaliação da variação das imunoglobulinas** - Nas Tabelas 3, 4 e 5, estão expressos, por vezes de aumento em relação ao normal, os níveis de IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> e IgM. Em todos os grupos experimentais, com quaisquer das linhagens e com as três cepas do *T. cruzi* observou-se queda dos níveis de IgG<sub>1</sub> a níveis abaixo do normal, em geral precocemente (entre o 3º e o 7º dia de infecção). As demais imunoglobulinas apresentaram um aumento no decorrer da infecção, de caráter progressivo para a IgG<sub>2a</sub> e IgG<sub>2b</sub>; a IgM apresentou em geral um aumento precoce, que se manteve fixo no decorrer da infecção. Os maiores aumentos observados foram nos níveis de IgG<sub>2b</sub>, na infecção pelas cepas Colombiana e 21 SF (Tabelas 4 e 5). Nas infecções pela cepa Peruana a imunoglobulina que atinge níveis elevados é a IgM (Tabela 3). Observou-se uma correlação positiva entre o aumento de IgG<sub>2a</sub> e a maior intensidade das lesões tissulares (Tabelas 3, 4 e 5).

**Os títulos de anticorpos específicos (IgG)**, estão expressos na Tabela 1. A cepa Peruana acompanhada até o 12º dia determinou níveis muito baixos em todas as linhagens, com o máximo de 8. Na

infecção pela cepa 21 SF os títulos de anticorpos específicos variaram de uma linhagem para outra, sendo máximo nas linhagens C3H e A/J, aos 30 dias de infecção (128). Na infecção pela cepa Colombiana o título máximo foi de 32, nas linhagens DBA, A/J e AKR.

O teste cutâneo de hipersensibilidade retardada foi negativo em todos os animais.

**Estudo histopatológico** - Nas Tabelas 3, 4 e 5 estão resumidos os resultados da histopatologia e sua correlação com a parasitemia e os níveis de Ig. A infecção pela cepa Peruana (Tipo I) do *T. cruzi* (Tabela 3) determinou nos camundongos das seis diferentes linhagens, lesões caracterizadas pelo envolvimento predominante de células do sistema fagocítico mononuclear, com parasitismo variando de discreto a intenso em macrófagos do baço, do fígado e em tecido adiposo (Figs. 4a, b); o parasitismo de coração e músculo esquelético variou de discreto a moderado durante a evolução da infecção e nos diversos grupos. Em todas as linhagens, o parasitismo tissular e a parasitemia foram sempre crescentes no decorrer da infecção. O número de parasitos nos

tecidos foi sempre maior do que a reação inflamatória. O parasitismo tissular foi mais acentuado nas linhagens AKR e A/J e menor nas linhagens DBA e Balb/c.

A cepa peruana conservou em toda as linhagens o comportamento básico das cepas de Tipo I.

Na infecção pela cepa 21 SF, Tipo II, o parasitismo inicial de fibras cardíacas nas diversas linhagens foi discreto entre o 12º e o 14º dias de infecção, com infiltrado inflamatório difuso e focal de miocárdio de intensidade variável, em geral discreto ou moderado. Nos camundongos A/J houve intensificação do

parasitismo e do infiltrado mononuclear, do 20º ao 30º dia de infecção; parasitismo discreto a moderado em músculo esquelético em todas as linhagens, com exceção da linhagem A/J em que é acentuado após o 20º dia de infecção. Em toda as linhagens, chama a atenção na infecção pela cepa 21 SF, a presença de lesões necróticas de fibras musculares parasitadas ou não. Nas linhagens C<sub>3</sub>H, AKR e A/J, estas lesões não se acompanham de exsudato ou apresentam apenas focos de infiltração mononuclear (Figs. 5-a, b, 6-a, b). Entretanto, em áreas focais de destruição de fibras parasitadas, observam-se infiltrados de polimorfonucleares neutrófilos; este processo se torna mais intenso a partir do 20º dia, na linhagem A/J. Não houve

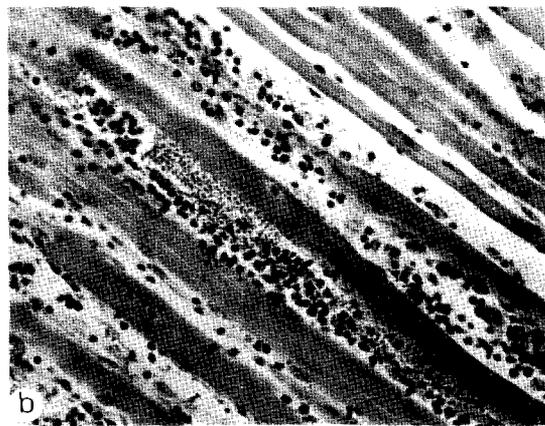


Figura 5a - Necrose de fibras musculares não parasitadas, sem infiltrado inflamatório. Linhagem C<sub>3</sub>H infectada pela cepa 21 SF. 250X.

Figura 5b - Fibra muscular parasitada com infiltrado mononuclear 250X. Linhagem C<sub>3</sub>H infectada com a cepa 21 SF.

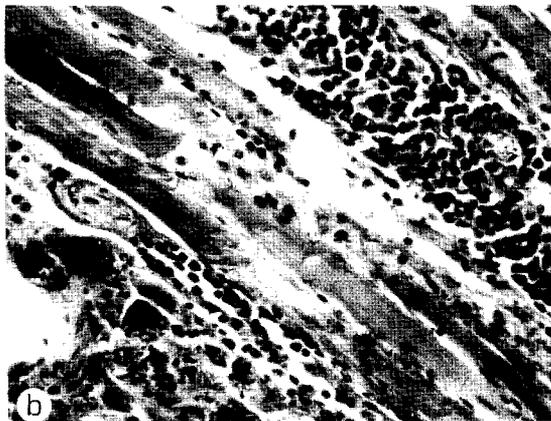
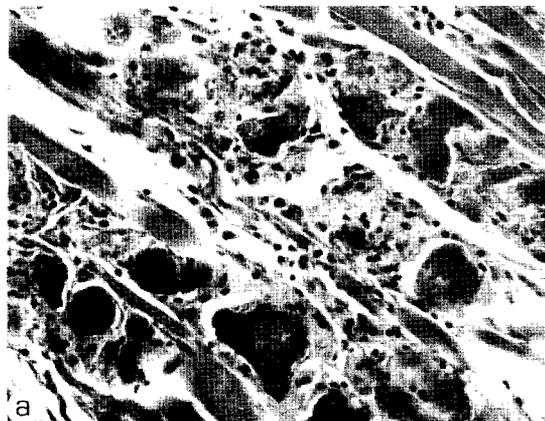


Figura 6a - Linhagem A/J infectada pela cepa 21 SF - extensa necrose de fibras musculares não parasitadas com escasso infiltrado mononuclear. 400X.

Figura 6b - Linhagem A/J infectada pela cepa 21 SF - necrose de fibras musculares com infiltrados mononucleares focais 400X.

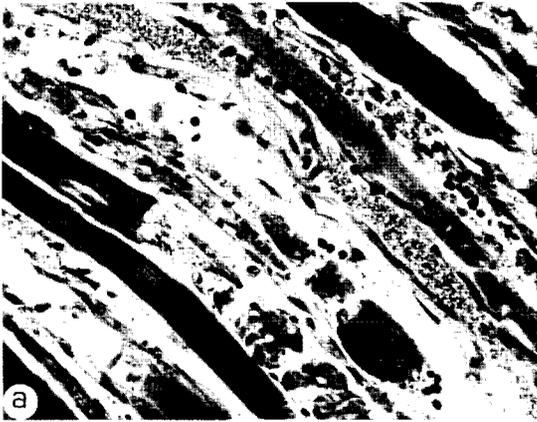


Figura 7a – Fibras musculares parasitadas e em destruição com discreto exsudato inflamatório; cepa Colombiana e linhagem A/J. 250X.

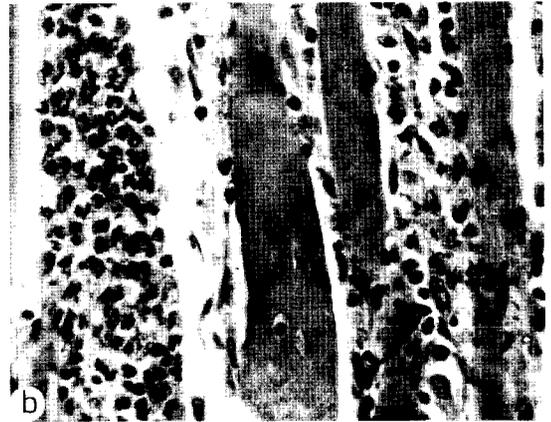


Figura 7b – Destruição focal de fibras musculares com exsudato de polimorfonucleares neutrófilos; linhagem C3H, cepa Colombiana. 400X.

paralelismo entre o grau de destruição muscular e o infiltrado inflamatório ou o discreto parasitismo. Nos camundongos das linhagens DBA, Balb/c e B-10 ao lado de extensas áreas de necrose de fibras musculares, sem parasitos observa-se infiltrado inflamatório mononuclear com polimorfonucleares neutrófilos de permeio. O padrão básico de lesões observados com esta cepa nos animais das diversas linhagens, foi constante.

Na infecção pela cepa Colombiana, aos 15 a 20 dias, observa-se parasitismo discreto de miocárdio, com intensificação após 20 a 30 dias em todas as linhagens, com acentuado processo inflamatório relacionado com fibras parasitadas em destruição (Figs. 7-a, b). Os camundongos da linhagem B-10, com moderado parasitismo de miocárdio, apresentam, entretanto, intenso processo inflamatório. Na linhagem A/J, apesar do acentuado parasitismo, o processo inflamatório persiste discreto ou moderado. Na infecção pela cepa Colombiana, em todas as linhagens, predominaram os aspectos característicos das cepas do Tipo III, com lesões predominantes em músculo esquelético e envolvimento de miocárdio.

*Estado reacional do baço* – Em todas as linhagens observou-se na infecção pelas diferentes cepas, um aumento da celularidade da polpa vermelha, com infiltração de linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Os centros germinais dos folículos linfóides mostraram hiperplasia que evoluiu no curso da infecção, com a presença de células blásticas e macrófagos os quais, na infecção pela cepa peruana, continham amastigotas no

citoplasma (Fig. 4a). Comparando-se o estado reacional dos centros germinais em relação às diferentes linhagens, observa-se nas linhagens AKR, A/J e C3H graus acentuados de hiperplasia com as três cepas. A linhagem Balb/c mostrou reação acentuada com a cepa peruana e moderada com as cepas 21 SF e colombiana. As linhagens DBA e B-10 com reação acentuada com a cepa colombiana e discreta ou moderada com as cepas peruana e 21 SF. Nas linhagens C3H, DBA e Balb/c, na infecção pela cepa peruana, observou-se reação epitelióide da polpa vermelha do baço (Fig. 4b).

Em todas as linhagens foi observada depleção dos linfócitos do manguito periarteriolar dos folículos linfóides, a partir do 7º dia de infecção.

## DISCUSSÃO

Analisando o comportamento dos diferentes tipos de cepas, em relação às seis diferentes linhagens isogênicas de camundongos pudemos verificar, em primeiro lugar, que as cepas do *T. cruzi* mantiveram as suas características básicas, independentemente da linhagem analisada. O tropismo tissular e o perfil das curvas parasitêmicas próprios de cada cepa foram mantidos, chamando a atenção entretanto o fato de que, em nenhuma das linhagens foi reproduzido o intenso parasitismo miocárdico descrito para a cepa 21 SF no camundongo suíço<sup>24</sup>. O tempo de sobrevivência variou conforme a susceptibilidade do hospedeiro, mas sempre dentro de um período compatível com o que em sido visto na evolução da infecção por cada tipo de cepa.

Utilizamos neste estudo, cepas de *T. cruzi* já caracterizadas e classificadas de acordo com o seu comportamento morfológico e histopatológico<sup>1 24</sup> quanto à sua estrutura antigênica<sup>2</sup> e o seu padrão isoenzimático<sup>3</sup>, que são característicos para cada tipo de cepa e que têm se mantido constantes após prolongado período de manutenção em laboratório, fato este já observado por Brener e cols.<sup>7</sup> Embora estudos recentes com clonagem do *T. cruzi*<sup>20</sup> relatem diferenças entre dois clones isolados de uma mesma amostra, aparentemente as diferenças apontadas entre estes dois clones estão relacionadas principalmente ao grau de virulência. Por outro lado tem sido demonstrado que o padrão isoenzimático dos clones de uma mesma amostra, são idênticos<sup>10</sup>. Não afastamos entretanto a possibilidade de que cada cepa do *T. cruzi* seja composta de uma população de algum modo heterogênea, como tem sido demonstrado através de estudos utilizando as enzimas de restrição do DNA do cinetoplasto<sup>13</sup>. O que se verifica, entretanto, nas cepas mantidas em laboratório é que os parasitos são aparentemente selecionados de maneira uniforme durante a infecção e, na sua ação patogênica resultante, se comportam de forma constante e característica. É interessante notar que, mesmo em espécies diferentes de animais vertebrados, as cepas de diferentes tipos mantêm o seu comportamento característico, tendo sido verificada a reprodução em animais experimentais, de lesões observadas em caso humano agudo fatal do qual foi isolada uma cepa do *T. cruzi* posteriormente estudada na infecção de cães, camundongos e ratos<sup>4</sup>.

Frente aos dados obtidos no presente trabalho nos parece que, mais do que a estrutura genética do hospedeiro, as características intrínsecas dos parasitos são os fatores determinantes do padrão básico da infecção pelo *T. cruzi* em diferentes linhagens de camundongos isogênicos.

As diferentes linhagens de camundongos utilizadas mostraram um espectro de resistência que diferiu de acordo com a cepa do *T. cruzi* utilizado na infecção. As observações anteriores de Trischman e col.<sup>29</sup> com a cepa Brasil haviam indicado um maior grau de susceptibilidade da linhagem C3H em relação com seis linhagens por ele estudadas. Na nossa observação, a susceptibilidade dos camundongos C3H varia de acordo com a cepa do *T. cruzi* utilizada na infecção, do mesmo modo que as demais linhagens. Postan e col.<sup>21</sup> também observaram que a linhagem C3H foi mais resistente do que a C57BL/6N a dois clones da cepa Sylvio - X10. Na infecção pela cepa

peruana, em todas as linhagens, o caráter disseminado das lesões, devido ao parasitismo de macrófagos em vários setores do organismo, parece ser responsável pela alta mortalidade precoce nesta cepa. Mesmo assim, pôde-se distinguir graus de parasitismo tissular, mais acentuado nas linhagens AKR e A/J e menor nas linhagens DBA e Balb/c.

Considerando-se o processo inflamatório nos animais que se mostraram mais resistentes e nos que se mostraram mais susceptíveis à infecção pelas cepas 21 SF e colombiana, pôde-se verificar que, nas linhagens mais resistentes, o exsudato inflamatório é mais intenso com mononucleares e um nítido componente exsudativo apresentando polimorfonucleares em relação com fibras musculares esqueléticas ou miocárdicas destruídas, parasitadas ou não. Nas linhagens mais susceptíveis o infiltrado inflamatório é em geral discreto e predominantemente mononuclear. Pode-se sugerir a hipótese de que o recrutamento de polimorfonucleares se deve a uma ativação do sistema complemento iniciado pela presença de anticorpos anti-*T. cruzi* reagindo com antígenos parasitários absorvidos nos tecidos ou por reação cruzada com antígenos tissulares<sup>9 22 28</sup>. Tem sido ressaltada a importância da formação de imunocomplexos na gênese das lesões na infecção pelo *T. cruzi* através do desencadeamento de hipersensibilidade de Tipo III. O gasto de IgG<sub>1</sub> através da formação de imunocomplexos poderia ser um dado importante na patogênese da doença. De interesse é a observação de que, nas linhagens que respondem com este aumento, os níveis elevados de IgG<sub>2a</sub> coincidem, cronologicamente, com o aparecimento e aumento de intensidade da reação inflamatória nos tecidos, principalmente miocárdio e músculo esquelético. A possibilidade de que a fração IgG<sub>2a</sub> seja mais eficiente em mediar reações de citotoxicidade poderia conferir um papel importante a esta subclasse no desenvolvimento de lesões tissulares. A elevação tanto da IgG<sub>2a</sub> como IgG<sub>2b</sub> é variável de acordo com a linhagem e parece estar correlacionada ao grau de resistência, confirmando observações de outros autores<sup>26 27</sup>.

Podemos concluir do presente trabalho que as características do parasito são o fator determinante do padrão básico da infecção. A linhagem do camundongo isogênico é responsável pela intensidade e pelas características das lesões tissulares e pela resposta humoral. Além disto pôde-se concluir que o número de parasitos circulantes não se correlaciona com o parasitismo tissular e que, nem sempre os animais mais susceptíveis apresentam o maior parasitismo.

Andrade V, Andrade SG, Barral Netto M, Pontes AL, Castro R. Avaliação do comportamento de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* na infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 18: 143-154, Jul-Set, 1985

Correlacionando-se a reação inflamatória com a gravidade da infecção, através da mortalidade, conclui-se que a maior intensidade da inflamação coincide com maior resistência e portanto "protege" o animal, indicando, pela presença de polimorfonucleares, maior resposta humoral e ativação de complemento.

### SUMMARY

*The behavior of three strains of Trypanosoma cruzi, classified according to their morphological, histopathological and isoenzymic characters, as Type I (Peruvian strain), Type II (21SF strain) and Type III (Colombian strain), was evaluated by the infection of six inbred strains of mice: A/J, AKR, Balb/c C3H, C57BL/10 and DBA. It was observed that the three strains of T. cruzi maintained their basic characteristic in respect to parasitemia, survival time, histopathological lesions and tissue tropism in all the mouse strains. The Peruvian strain (Type I) resulted in a high mortality in all the animals; on the other hand the infection with the 21 SF (Type II) and Colombian /Type III) strains displayed a variable pattern of mortality determining a singular spectrum of resistance to each parasite strain. Early decrease of IgG<sub>1</sub> and progressive rise of IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> and IgM levels, was observed, independently of the mouse or the parasite strain. There was a correlation between increased IgG<sub>2a</sub> levels and intensity of the inflammatory process. Exudative lesions with polymorphonuclear neutrophils occurred in the resistant mice while a scarce infiltrate with predominance of mononuclear cells was observed in the more susceptible mouse strain. Our results suggest that the characteristics of T. cruzi strains are of the utmost importance in the course of the infection, but the host strain also plays a very important role in the process.*

*Key words: Trypanosoma cruzi. Strain of T. cruzi. Strain types. Isogenic mice.*

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andrade SG. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano (Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). *Revista de Patologia Tropical* 3:65-121, 1974.
2. Andrade SG, Andrade V, Rocha F<sup>o</sup> FD, Barral Netto M. Análise antigênica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 23:245-250, 1981.
3. Andrade V, Brodskyn C, Andrade SG. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *T. cruzi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene* 77:796-799, 1983.
4. Andrade SG, Andrade ZA. Estudo de uma mesma cepa do *Trypanosoma cruzi* em diferentes hospedeiros. Resumos do XV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Campinas, p. 15, 1979.
5. Brener Z. Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas. Tese, Belo Horizonte, 1961.
6. Brener Z. Intraspecific variation in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct features. PAHO Scientific Publication 347:11-21, 1977.
7. Brener Z, Chiari E, Alvarenga NJ. Observations on *T. cruzi* strains maintained over an 8 year period in experimentally inoculated mice. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 16:32-38, 1974.
8. Camargo ME. Diagnóstico de laboratório In: Brener Z, Andrade ZA (ed) *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 175-198, 1979.
9. Cossio PM, Diez C, Szarfman A, Krentzen E, Candiolo B, Arana RM. Chagasic cardiopathy. Demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation* 49:13-21, 1974.
10. Dvorak JA, Hartman DL, Milles MA. *Trypanosoma cruzi*: Correlation of growth kinetics to zymodeme type in clones derived from various sources. *Journal of Protozoology* 27:472-474, 1980.
11. Federici EE, Abelmann WB, Neva FA. Chronic progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 13:272-280, 1964.
12. Galvão Castro B, Morgado MG, Schmocker K. Immunopathology of American Trypanosomiasis: immune complexes, complement C3, immunoglobulins and immune response in experimental Chagas' disease. *Anais do Congresso Internacional de doença de Chagas. Rio de Janeiro, Brazil p. 179, 1979.*

Andrade V, Andrade SG, Barral Netto M, Pontes AL, Castro R. Avaliação do comportamento de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* na infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 18: 143-154, Jul-Set, 1985

13. Gonçalves AM, Chiari E, Deane MP, Carneiro M, Romanha AJ, Morel C. Schizodeme characterization of natural and artificial populations of *Trypanosoma cruzi* as a tool in the study of Chagas disease. In: Newton BA (ed). Application of biochemical and molecular biology techniques to problems of parasite and vector identification. Proceedings of an International Symposium, World Health Organization, Geneva, 1-10 Nov. 1982.
14. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Immunological quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2:235, 1965.
15. Miles MA, Lanham SM, Souza AA, Póvoa M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 74: 221-237, 1980.
16. Morel C, Chiari E, Plesmann Camargo E, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 77: 6810-6814, 1980.
17. Morel C, Simpson L. Characterization of pathogenic trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprints of kinetoplast DNA minicircles. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 29 Suppl: 1070-1074, 1980.
18. Nussenzweig V, Goble F. Further studies on the antigenic constitution of strains of *Trypanosoma (Schyzotrypanum) cruzi* experimental. *Parasitology* 18:224-230, 1966.
19. Pizzi T, Prager R. Estabilization de la virulencia de una cepa de *Trypanosoma cruzi* por pasage seriado en ratones de constitution genetica uniforme: analisis quantitativo del curso de la infeccion. *Biologia (16-17)*: 3-12, 1952.
20. Postan M, Dvorak JA, McDaniel JP. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in bred mice. I-A comparison of the course of the infection of C3H/HEN-mice with two clones isolated from a common source. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32: 479-506, 1983.
21. Postan M, McDaniel JP, Dvorak JA. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. II - Course of infection of C57BL/6 mice with single-cell-isolated stocks. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 33:236-238, 1984.
22. Ribeiro dos Santos R, Hudson L. *Trypanosoma cruzi*: binding of parasite antigens to mammalian cell membranes. *Parasite Immunology* 2:1-10, 1980.
23. Romanha AJ. Heterogeneidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi*. Tese, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1982.
24. Rocha Filho FD. Estudo comparativo de cepas do *Trypanosoma cruzi* de diferentes procedências. Tese, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 1979.
25. Silva JC. Doença de Chagas experimental. Possível participação da resposta imune humoral na patogênese das lesões musculares esqueléticas e cardíacas. Tese, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1982.
26. Stefani MMA, Takeara HA, Mota I. Isotype of antibodies responsible for immune lysis in *Trypanosoma cruzi* infected mice. *Immunology Letters* 7:91-97, 1983.
27. Takeara HA. Anticorpos na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*: função das diferentes classes e subclasses no mecanismo de proteção. Tese, São Paulo, 1980.
28. Teixeira ARL, Teixeira G, Macedo V, Prata A. *Trypanosoma cruzi* sensitized T-lymphocyte mediated 51Cr release from human heart cells in Chagas' disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 27:1097-1107, 1978.
29. Trischmann TM, Tanowitz H, Wittner M, Bloom BR. *Trypanosoma cruzi*: Role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Experimental Parasitology* 45:160-178, 1968.
30. Trischmann TM, Bloom BR. Genetics of murine resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity* 35:546-551, 1982.