

RESUMO DE TESE

CARDITE EXPERIMENTAL DO COBAIO PELA CEPA Y DO *TRYPANOSOMA CRUZI*. CORRELAÇÃO ENTRE A HISTOPATOLOGIA E A PRESENÇA DE ANTÍGENOS PARASITÁRIOS IDENTIFICADOS POR IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA.

A cardite chagásica experimental foi reproduzida em 15 cobaios adultos. Cada cobaio foi inoculado com um milhão de tripomastigotas contidos em 0,5 ml de um "pool" de sangue citratado de camundongos infectados com a cepa Y do *T. cruzi*. Os animais foram divididos em 4 grupos e sacrificados 1 mês (Grupo 1-5 cobaios), 2 meses (Grupo 2-2 cobaios), 2 meses e meio (Grupo 3-3 cobaios) e 3 meses e meio (Grupo 4-5 cobaios), após a inoculação. Para cada grupo, foi utilizado, como controle, 1 cobaio adulto, não infectado, mantido nas mesmas condições ambientais.

Os cobaios foram sangrados semanalmente para a verificação da parasitemia e realização de hemaglutinação e imunofluorescência indiretas para a avaliação da anticorpo-gênese anti-*T. cruzi*.

A histopatologia do coração dos animais infectados foi correlacionada com a presença de antígenos parasitários do *T. cruzi* nas lesões. Os antígenos foram identificados através de imunofluorescência indireta, em cortes obtidos pela técnica de Sainte-Marie. Para a reação foram utilizados soros humanos padrões, positivo e negativo, para a doença de Chagas. A presença de fluorescência foi considerada significativa quando observada apenas no corte tratado com o soro padrão positivo.

Como reações testemunhas, foram realizadas: reação de imunofluorescência indireta nos corações dos cobaios-controles, que foi negativa; reação de imunofluorescência indireta, com soro padrão positivo absorvido com *T. cruzi*, nos corações dos cobaios infectados, que foi negativa; reação de imunofluorescência direta, com o conjugado anti-globulina humana, nos corações dos cobaios infectados e controles, que também foi negativa. A preservação da fração antigênica protéica do *T. cruzi*, com o emprego da técnica de Sainte-Marie foi demonstrada na pele, pela mesma técnica usada no coração, através da injeção do antígeno nos cobaios do Grupo 4, por via intradérmica, uma semana antes do sacrifício.

EXPERIMENTAL CARDITIS INDUCED BY *TRYPANOSOMA CRUZI* (Y STRAIN) IN GUINEA PIGS. CORRELATION BETWEEN HISTOPATHOLOGY AND THE PRESENCE OF *T. CRUZI* ANTIGENS IDENTIFIED BY INDIRECT IMMUNOFLOURESCENCE.

Experimental chagasic carditis was induced in 15 adult guinea pigs by subcutaneous inoculation of 1×10^6 trypomastigotes contained in 0.5 ml of a pool of blood samples of mice infected with *T. cruzi* (Y strain). The animals were sacrificed after 1 month (Group 1-5 guinea pigs), 2 months (Group 2-2 guinea pigs), 2.5 months (Group 3-3 guinea pigs) and 3.5 months (Group 4-5 guinea pigs) after inoculation. For each test group, 1 non-infected guinea pig was used as control.

The animals were bled weekly for evaluation of parasitemia and levels of anti-*T. cruzi* antibodies, by hemagglutination and indirect immunofluorescence.

The histopathology findings of the carditis was correlated with the presence of *T. cruzi* antigens in the lesions. The antigens were detected by indirect immunofluorescence according to Sainte-Marie's technique, using a positive and a negative reference human serum to Chagas' disease. A finding was considered specific when observed only in the section stained with the positive serum.

Other data were taken as evidence of specificity of the immunofluorescent findings: i) absence of fluorescence in the hearts of the control guinea pigs; ii) the fluorescence in the hearts of infected guinea pigs stained with the positive serum was abolished with the absorption of the serum with trypomastigotes of *T. cruzi* (Y strain); iii) absence of fluorescence in the heart of infected guinea pigs stained only with the fluorescein conjugated anti-human immunoglobulin. To check whether Sainte-Marie's technique preserved *T. Cruzii* antigens, the guinea pigs from Group 4 were intradermally inoculated with 12 μg of the antigen used in the hemagglutination test one week prior to sacrifice. At the sacrifice, punch biopsies from the skin sites were processed in a similar manner to the hearts. Intense fluorescence was documented in the dermis in sections stained with the positive serum.

Nas condições experimentais utilizadas e com a metodologia empregada, os principais fatos observados foram:

1. Os cobaios infectados, com exceção de quatro, apresentaram parasitemia na 1ª semana.
2. Em todos os cobaios, a parasitemia foi negativa a partir da 7ª semana.
3. As reações sorológicas de imunofluorescência e de hemaglutinação indiretas atingiram títulos máximos na 3ª ou 4ª semana; os títulos se mantiveram até a época do sacrifício dos animais.
4. A reação de hemaglutinação indireta foi mais sensível do que a reação de imunofluorescência indireta.
5. A elevação dos títulos de anticorpos coincidiu, em geral, com a queda dos índices parasitêmicos.
6. Em todos os cobaios infectados, foi observado processo inflamatório intersticial afetando os três folhetos do coração.
7. Os cobaios do Grupo 1 apresentaram numerosos ninhos de amastigotas nas fibras miocárdicas; os do Grupo 2 apresentaram número menor de ninhos e não foi encontrado parasitismo em fibras cardíacas nos animais dos Grupos 3 e 4. Em 1 cobaio do Grupo 3, havia ninho de amastigotas na camada média da porção inicial da aorta.
8. As amastigotas se mostraram antigênicas, com fluorescência mais intensa da membrana celular. Por vezes, o material amorfo intersticial do ninho foi fluorescente, antigênico.
9. Em torno dos ninhos íntegros, não se observou reação inflamatória.
10. Em torno dos ninhos rotos, observou-se sempre infiltrado inflamatório mononuclear, por vezes muito intenso.
11. Em torno dos ninhos rotos, foram observadas amastigotas fluorescentes no interstício ou no citoplasma de macrófagos, e fluorescência difusa do citoplasma de células mononucleares, indicando presença de material antigênico nestes locais.
12. Em todos os cobaios infectados, foi observado processo inflamatório intersticial, aparentemente não correlacionado com o parasitismo tecidual, caracterizado por edema e infiltrado mononuclear com disposição predominante em torno de capilares intersticiais. Por vezes, o processo englobava fibras cardíacas contíguas.
13. O processo inflamatório intersticial se disseminou por entre as fibras do miocárdio, atingindo desta forma o epicárdio e endocárdio.
14. Tanto o parasitismo tecidual quanto o processo inflamatório intersticial foram mais intensos ao nível da base dos ventrículos e nos átrios.

The main results of the present investigation were as follows:

1. Eleven out of 15 infected guinea pigs developed parasitemia within the first week post-inoculation.
2. For all animals, parasitemia became negative from week 7 onwards.
3. Anti-*T. Cruzi* antibody levels peaked at week 3 and week 4 and plateaued onwards.
4. Hemagglutination was more sensitive than immunofluorescence in detecting circulating antibodies.
5. The rising of antibody levels coincided with the decline of parasitemia.
6. The hearts from all infected guinea pigs revealed an inflammatory process involving the endocardium, myocardium and pericardium.
7. Guinea pigs from Group 1 showed numerous amastigote cysts in the myocardium. Cysts were less numerous in Group 2 and absent in Groups 3 and 4.
8. The amastigotes inside the cysts were strongly antigenic showing fluorescence mainly at the cellular membrane. The amorphous intra-cyst interstitial material was also fluorescent.
9. Mononuclear cellular infiltration was observed only around ruptured cysts.
10. In those foci, fluorescent amastigotes were detected in the cardiac interstitium or in the cytoplasm of macrophages. In addition, there was also a diffuse fluorescence in the cytoplasm of some mononuclear cells revealing incorporation of parasitic antigens by those cells.
11. In addition to the inflammation related to ruptured cysts, it was observed in all animals an interstitial inflammatory component, made up by edema and mononuclear cellular infiltration mainly around small vessels. In some foci, the inflammation involved some contiguous normal muscle cells.
12. The inflammation spread alongside the myocardium interstitium reaching in this way the endocardium and the epicardium.
13. The carditis was more intense at the basis of the heart.
14. *T. cruzi* antigens detected by immunofluorescence were found in the cytoplasm of mononuclear cells and endothelial cells along the interstitial inflammation.
15. There were also dilated lymphatic vessels in the inflammatory foci, layered by plump cells and filled by an amorphous material. There were *T. cruzi* antigens in the cytoplasm of the endothelial cells and in the intravascular material.
16. There was a positive correlation between the intensity of the inflammation and the amount of *T.*

15. Antígenos parasitários fluorescentes foram observados no citoplasma de células mononucleares e de células endoteliais de vasos sanguíneos nos focos de inflamação do miocárdio, epicárdio e endocárdio.
 16. Em associação com o processo inflamatório intersticial, observaram-se linfáticos dilatados, revestidos por endotélio tumefeito, contendo na luz material amorfo e células mononucleares. A microscopia de fluorescência revelou antígenos parasitários nas células endoteliais e em mononucleares da luz; por vezes, o material amorfo da luz era fluorescente.
 17. O processo inflamatório intersticial foi mais intenso nos cobaios do Grupo 1. Nos cobaios dos Grupos 2 e 3, ele foi mais focal, mais compacto e por vezes assumiu aspecto granulomatoso.
 18. No Grupo 4, o processo inflamatório foi muito menos intenso e a quantidade de antígenos parasitários menor.
 19. Em um cobaio do Grupo 4, foi observada arterite coronária do tipo necrosante, com morfologia sugestiva de reação de hipersensibilidade.
 20. A íntima associação entre antígenos parasitários e reação inflamatória intersticial, não correlacionada com parasitismo, pareceu indicar a participação de fenômenos imunoalérgicos na patogenia das lesões da cardite chagásica experimental estudada. A drenagem intersticial e linfática de antígenos parasitários deve contribuir de modo importante para a sensibilização do mesênquima do coração. Mesmo na presença de pequeno parasitismo miocárdico, a inflamação intersticial poderá se manter persistente, à custa de fenômenos imunes relacionados com antígenos sequestrados nos interstícios.
- cruzi* antigens in the lesions. Both findings were marked in Group 1, moderate in Group 2 & 3, and mild in Group 4.
17. A guinea pig from Group 4 presented a necrotizing arteritis in a coronary vessel, suggesting a hypersensitivity reaction.
 18. The close relationship between parasitic antigens and interstitial inflammation, in the absence of amastigote cysts, seemed to indicate that hypersensitivity played a role in the pathogenesis of the chagasic carditis. The interstitial and lymphatic drainage of *T. cruzi* antigens should contribute to the sensitization of cardiac structures away from ruptured cysts. Even in the absence of tissular parasitism, the inflammation may persist through hypersensitivity reaction due to parasitic antigens sequestered in the interstitium.

Marcello Fabiano de Franco

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu da Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho para obtenção do Título de Doutor em Medicina Botucatu, São Paulo, Brasil, 1972*

* Esta tese não foi publicada e, apesar do tempo, encerra assunto de interesse.