

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DE TRÊS AMOSTRAS DE  
TRYPANOSOMA CRUZI ISOLADAS DE PACIENTES DO INSTITUTO  
"DANTE PAZZANESE" DE CARDIOLOGIA**

Vera Lucia PEREIRA (1), Mabel M. B. ZAMORANO (2) & Elias BOAINAIN (3)

**RESUMO**

Foram estudadas três amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes. As amostras foram observadas sob os seguintes parâmetros: níveis parasitêmicos, morfologia das formas sanguíneas, alterações histopatológicas, virulência e mortalidade em camundongos. A amostra IDPC-1 foi isolada de um paciente naturalmente infectado e tratado com benzonidazol. Provocou baixos índices parasitêmicos e mostrou baixa virulência, sendo que 83,4% dos animais evoluíram para a fase crônica. Os tripomastigotas eram de forma delgada, tornando-se largas ao final da fase aguda. Mostrou-se como miotrópica, pois as reações inflamatórias foram mais evidenciadas em células musculares persistindo ainda na fase crônica. A amostra IDPC-3 foi isolada anteriormente ao tratamento quimioterápico, de um paciente com infecção aguda por via transfusional. Causou altos níveis parasitêmicos e mostrou alta virulência com mortalidade total até o 12.º dia. As formas delgadas foram predominantes e foi caracterizada como reticulotrópica, por apresentar severa inflamação e parasitismo em linfonodos, baço e fígado. A amostra IDPC-2 foi isolada de um paciente infectado por via transfusional, após o tratamento com três diferentes esquemas terapêuticos. Apresentou moderada virulência, com mortalidade total até o 17º dia e predominância de formas delgadas em todo decurso da infecção; contudo os índices parasitêmicos foram baixos. Houve uma severa reação inflamatória e parasitismo sistêmicos, porém mais evidenciados em células musculares, mostrando-se como miotrópica. Esta amostra apresentou comportamento biológico similar a IDPC-3, com pequenas divergências como baixos índices parasitêmicos e tendência ao miotropismo. Estes dados sugerem que amostras de *T. cruzi* isoladas de pacientes considerados fracasso terapêutico apresentam padrões de comportamento biológico similares a outras cepas já estudadas, porém provocam infecção menos severa no animal experimental, fazendo supor que drogas tripanosomicidas poderiam alterar padrões de comportamento, promovendo melhor adaptação entre parasita-hospedeiro.

**UNITERMOS:** Tripanosomíase sul-americana; amostras isoladas de pacientes.

**INTRODUÇÃO**

Diversas amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas a partir do homem e de outros reservatórios apresentam padrões de comportamento diferentes, apesar de se assemelharem em determinados caracteres<sup>9,10</sup>.

Trabalho realizado no setor de Miocardiopatias do Instituto "Dante Pazzanese" de Cardiologia. Av. Dr. Dante Pazzanese, 500. Caixa Postal 215. CEP 04012 São Paulo, SP — Brasil.

- (1) Pesquisador Científico do Setor de Miocardiopatias.
- (2) Chefe do Serviço de Anatomia Patológica.
- (3) Chefe do Setor de Miocardiopatias.

BRENER e CHIARI<sup>7</sup> demonstraram que de modo geral as diferentes amostras do parasita poderiam ser agrupadas em três padrões morfológicos distintos: 1 — com predominância de formas delgadas; 2 — com predominância de formas largas e 3 — com formas anormalmente largas.

ANDRADE e col.<sup>1</sup>, estudando três cepas de *T. cruzi* de diferentes procedências, verificaram que padrões morfológicos diversos produzem diferentes lesões tissulares e concluíram que diferentes propriedades devem ser estudadas conjuntamente para a caracterização das cepas, objetivando o estabelecimento de padrões das mesmas. Mais tarde um destes autores sugeriu o agrupamento das diversas amostras de *T. cruzi* em três grupos: Tipo I, Tipo II e Tipo III<sup>2</sup>.

A introdução de métodos bioquímicos aperfeiçoaram os conhecimentos a respeito da caracterização do parasita. No nível fenotípico, a análise do perfil de isoenzimas divide as amostras de *T. cruzi* em zimodemos<sup>4,12</sup>. No nível genotípico, a análise do perfil dos fragmentos do DNA do cinetoplasto, digeridos por endonuclease de restrição, divide as amostras em esquizodemos<sup>11,12</sup>.

Segundo ANDRADE e cols.<sup>3</sup>, tais critérios, entretanto, não permitem estabelecer correlação direta com os quadros patológicos determinados pelas diferentes cepas, no animal experimental.

A caracterização de padrões de comportamento biológico de amostras de *T. cruzi* provenientes do homem e observadas experimentalmente sob vários parâmetros (níveis de parasitemia, morfologia de formas sanguíneas, alterações histopatológicas, virulência e mortalidade) permite não só obter subsídios para um melhor entendimento da relação parasita-hospedeiro, mas também para o tratamento do portador da doença de Chagas<sup>5</sup>.

O objetivo do presente trabalho é o estudo do comportamento biológico de três amostras de *T. cruzi* isoladas, através do xenodiagnóstico, de pacientes matriculados no Instituto "Dante Pazzanese" de Cardiologia.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1 — Animais experimentais

Foram utilizados camundongos isogênicos de 30 dias com peso entre 15 a 18g, da linhagem A/Sn.

### 2 — Isolamento das amostras de *T. cruzi*

#### 2-1 — IDPC-1

Amostra isolada a partir de um paciente em fase crônica proveniente de zona endêmica, naturalmente infectado. Este foi submetido ao tratamento com benzonidazol e o controle da supressão do flagelado foi realizado por xenodiagnósticos mensais. O 14.º exame revelou-se positivo e os triatomíneos foram dissecados para a retirada do tubo digestivo. O conteúdo intestinal contendo tripomastigotas metacíclicos foi inoculado em camundongos isogênicos por via intraperitoneal.

#### 2-2 — IDPC-2

Amostra isolada de um paciente infectado por via transfusional e submetido ao tratamento quimioterápico com benzonidazol ainda na fase aguda. O controle da supressão do *T. cruzi* foi feito através de xenodiagnósticos mensais. Já na fase crônica, após a repositivação do xenodiagnóstico, o paciente foi submetido ao tratamento com nifurtimox. Diante do fracasso terapêutico, foi novamente medicado com associação benzonidazol-nifurtimox. Após os três esquemas de tratamento, o xenodiagnóstico manteve-se positivo, sendo isolada a amostra no mesmo esquema que a IDPC-1.

#### 2-3 — IDPC-3

Amostra isolada como as anteriores de um xenodiagnóstico positivo, proveniente de um paciente também infectado por via transfusional. O xenodiagnóstico foi realizado ainda na fase aguda, anteriormente ao tratamento quimioterápico.

### 3 — Estudo dos níveis de parasitemia e mortalidade no animal experimental

Foram selecionados 30 animais para cada amostra. Após o 3.º dia de infecção foram feitas contagens das formas sanguíneas segundo método descrito por PIZZI e PRAGER<sup>14</sup> e modificado por BRENER<sup>6</sup>. As contagens foram

realizadas diariamente até a ausência de parasitemia circulante (IDPC-1) ou a total mortalidade dos animais (IDPC-2 e IDPC-3) a qual foi observada em todas amostras.

#### 4 — Manutenção das amostras de *T. cruzi*

Os animais infectados foram anestesiados com éter-sulfúrico no pico máximo da parasitemia circulante e o sangue citratado foi coletado pelo plexo axilar. Após a centrifugação do sangue, os tripomastigotas foram coletados juntamente com o plasma. Dois novos lotes de 10 camundongos cada foram infectados, para cada amostra, com  $10^5$  tripomastigotas/camundongo, por via intraperitonal. Um dos lotes foi utilizado para o estudo dos níveis de parasitemia e morfologia das formas sanguíneas bem como os índices de mortalidade. O segundo lote prestou-se à retirada de órgãos para o estudo histopatológico e manutenção das amostras.

#### 5 — Estudo da morfologia das formas tripomastigotas sanguíneas

Amostras de sangue periférico foram coletadas diariamente de três animais em cada lote. Os esfregaços foram corados pelo método May-Grünwald-Giemsa em solução salina fosfatada, pH 7,2, e observados em objetiva de imersão. De acordo com os critérios estabelecidos por BRENER<sup>7,8</sup>, os parasitas que vistos opticamente apresentavam cinetoplasto afastado da extremidade posterior foram considerados de forma delgada e os que apresentavam cinetoplasto de localização junto a extremidade posterior como de forma larga.

#### 6 — Estudo das lesões histopatológicas e tropismo celular

Quatro animais foram utilizados para cada amostra estudada. Foram estudados coração, esôfago, fígado, baço, músculo esquelético de membro inferior e linfonodo inguinal. Os órgãos foram retirados nos 5., 7., 10. e 12. dias de infecção para as três amostras estudadas. Na amostra IDPC-1 foram incluídos os dias 14, 20, 25, 30 e 60 e na amostra IDPC-2 o 14. dia. As peças foram fixadas imediatamente após sua retirada em formaldeído 10% e posteriormente incluídas em parafina. Os cortes foram corados pela hematoxilina-eosina e examinados em

microscopia óptica para a avaliação da topografia, intensidade do parastismo, resposta inflamatória e outras alterações secundárias à infecção. As lesões foram quantificadas como leves, moderadas ou intensas seguindo-se os seguintes parâmetros: 1 — leve: ocasionais células parasitadas, com reação inflamatória ausente ou discreta; 2 — moderada: frequentes células parasitadas, com infiltrado inflamatório significativo, necrose e degeneração esporádicas em células isoladas e 3 — intensa: parasitismo abundante, acompanhado por infiltrado inflamatório e severa necrose do parênquima.

## RESULTADOS

### Amostra IDPC-1

A parasitemia por esta amostra no camundongo mostrou baixa virulência onde 83,4% dos animais evoluíram para a forma crônica da infecção. Os níveis parasitêmicos foram de baixa intensidade e, apesar da irregularidade da curva parasitêmica, apresentaram pico máximo em torno do 16.º dia (Fig. 4). O início da infecção foi caracterizada por formas tripomastigotas delgadas tornando-se largas ao final da fase aguda. As lesões tissulares instalaram-se gradativamente com pico de parasitismo tissular em torno da segunda para a terceira semana. Caracterizou-se como miotrópica, pois persistiram reações inflamatórias em miocárdio e esôfago, ainda na fase crônica, porém, sem parasitismo tissular. O fígado e baço mostraram resposta inflamatória que acompanhou plenamente a curva correspondente à do miocárdio, sendo raros os parasitas nesses dois órgãos (Tab. 1).

### Amostra IDPC-2

Os níveis parasitêmicos mantiveram-se baixos mas foram caracterizados por uma curva bem definida com pico máximo em torno do 9.º dia de infecção (Fig. 1.). A virulência apresentou-se moderada com mortalidade total até o 17.º dia de infecção. Durante toda a evolução da infecção as formas mantiveram-se delgadas e miotrópicas. As lesões evoluíram até por volta do 12.º dia, sendo que então, instalou-se um quadro intenso de inflamação e parasitismo sistêmico, porém mais acentuado em tecidos musculares (Tab. 1).

**T A B E L A I**  
**Relação entre os níveis parasitêmicos, mortalidade em camundongos da linhagem A/Sn, parasitismo e reação inflamatória tissular nos diferentes dias de infecção nas três amostras de T. cruzi**

Amostras	Dias de infecção	Parasitemia n.º trip/5 mm <sup>3</sup>	Mortalidade cumulativa (%)	Coração		Músculo esquelético		Baço		Fígado		Linfonodo	
				Pt	I	Pt	I	Pt	I	Pt	I	Pt	I
IDFC-1	5.º	209	—	—	nl	nl	nl	—	+	—	+	—	+
	7.º	730	—	+	nl	nl	nl	—	+	—	+	—	+
	10.º	1075	—	++	++	++	nl	—	+	—	++	—	+
	12.º	955	—	+	+	+	nl	—	+	—	+	—	+
	14.º	1558	3,4	+++	+	+	+	—	+++	—	+++	—	nl
	20.º	1471	13,8	+++	+++	+++	+	—	+++	—	+++	—	+++
IDFC-2	25.º	296	13,8	+++	—	—	+	—	+++*	—	+++	—	+++
	30.º	—	13,8	+++*	nl	nl	+	—	+++*	nl	+	—	+++
IDFC-3	60.º	—	13,8	+++*	nl	nl	+	—	+++*	nl	+	—	nl
	5.º	652	—	—	nl	nl	nl	—	+	—	+	—	+
	7.º	253	—	+	nl	nl	nl	—	+	—	+	—	+
	10.º	1034	6,6	+	nl	nl	nl	—	+	—	+	—	+
IDFC-3	12.º	415	96,4	+++	+	+	nl	—	+++	—	+++	—	+++
	14.º	277	100,0	+++	+++	+++	+	—	+++	—	+++	—	+++
	5.º	5139	—	—	nl	nl	nl	—	+	—	+	—	nl
	7.º	12782	—	+++	nl	nl	nl	—	+	—	+++	—	+++
IDFC-3	10.º	2000	86,6	+	nl	nl	nl	—	+	—	+++	—	+++
	12.º	1640	100,0	+	nl	nl	nl	—	+	—	+++	—	+++

(Pt): parasitismo tissular. (I): inflamação, (—): parasitismo inaparente ou mortalidade nula, (+): leve, (++): moderado, (+++): intenso, (nl): normal, (\*): crônica, (?) : necrose.

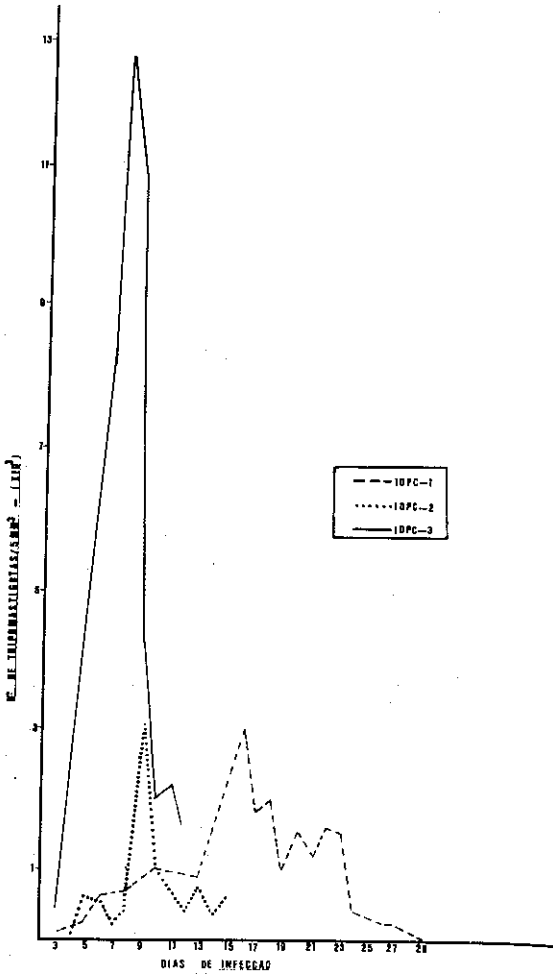


Fig. 1 — Níveis parasitêmicos das três amostras de *T. cruzi* desenvolvidos em camundongos de linhagem A/Sn.

### Amostra IDPC-3

Amostra caracterizada por apresentar rápida evolução com quadro de parasitemia severa e elevados níveis parasitêmicos, com pico máximo em geral no 7.º dia (Fig. 1). Causou alta virulência e mortalidade total até o 12.º dia de infecção no camundongo. Predominaram as formas delgadas e comportou-se como reticulotrófica porque, embora precoce, o parasitismo miocárdico foi pouco acentuado e fugaz, além de estar ausente do esôfago e músculo esquelético. Já no fígado, baço e linfonodos, precocemente se instalou um quadro grave de inflamação, com parasitismo severo. Embora tenha sido

verificada regressão do processo nos linfonodos, o quadro permaneceu importante no fígado e no baço (Tab. 1).

### DISCUSSÃO

Os dados obtidos sugerem que a amostra IDPC-3, isolada anteriormente ao tratamento quimioterápico de um paciente infectado por via transfusional, apresenta-se semelhante às cepas Y<sup>15</sup> e Peruana<sup>13</sup> classificadas por ANDRADE<sup>2</sup> como cepas do Tipo I.

A IDPC-2, isolada posteriormente ao tratamento com três esquemas distintos de drogas tripanosomicidas, de um paciente infectado por via transfusional, revelou-se semelhante às cepas agrupadas no Tipo I, porém com pequenas divergências, como níveis parasitêmicos baixos e miotropismo, apesar da infecção não se estender até a fase crônica.

As amostras IDPC-2 e IDPC-3 poderiam ser enquadradas nas do Tipo I, não obstante a IDPC-3 apresentar altos níveis de parasitemia contrastando com os baixos níveis apresentados pela IDPC-2. Nota-se que a IDPC-3 é altamente virulenta, agredindo órgãos de defesa imunológica no animal experimental e levando-os à óbito precocemente. A IDPC-2, por sua vez, tende a miotropismo e manifesta um relativo grau de adaptação, pois foi menos agressiva aos órgãos de defesa imunológica e conduziu os animais à óbito menos precocemente. Estes fatos nos levam a supor que amostras de *T. cruzi* isoladas de pacientes considerados "fracasso terapêutico" apresentam padrões de comportamento biológico semelhantes às de outras cepas já estudadas. Entretanto mostram pequenas divergências que podem ser consideradas "benéficas", pelo menos em relação ao animal experimental, parecendo haver uma melhor adaptação parasita-hospedeiro.

A amostra IDPC-1, isolada após o tratamento com o benzonidazol, mostrou-se semelhante às cepas isoladas no Recôncavo Bahiano, estudadas por ANDRADE e agrupadas no Tipo II<sup>2</sup> mas não dispomos, pelo menos até o presente momento, de outras amostras deste grupo para realizar um estudo comparativo.

## SUMMARY

### A study of the biological behaviour of three *Trypanosoma cruzi* samples isolated from patients in the Instituto "Dante Pazzanese" de Cardiologia

The biological behaviour of three different *T. cruzi* samples isolated from patients through xenodiagnosis was observed. Samples were studied considering parameters such as parasitemic levels, morphology of blood forms, histopathological changes, virulence and mice mortality. The IDPC-1 sample isolated from a naturally infected patient, who had been treated with benzonidazole, showed low virulence. 33.4% of the animals reached the chronic phase and had low parasitemic levels. In the beginning of the infection trypomastigote forms were slender, but they became broad at the end of the acute phase.

Histologically the IDPC-1 sample was myotropic as shown by the inflammatory reaction in the muscle cells during the chronic phase. The IDPC-3 sample was isolated from a patient infected by transfusion before chemotherapeutic treatment. This sample presented high virulence with total mortality within twelve days and high parasitemic levels with a predominance of slender forms. Because of a severe inflammation and parasitism of lymph nodes, spleen and liver that sample was characterized as reticulotropic. The IDPC-2 sample was also isolated from a patient infected by transfusion who had three different chemotherapeutic treatment programs. This last sample presented moderate virulence with total mortality within seventeen days. Although the parasitemic levels were low during the evolution of the infection, slender forms were observed. Severe systemic inflammation occurred and also intense tissue parasitism. This parasitism was higher in muscles, showing itself to be myotropic. Biological behaviour, in this sample, was similar to the IDPC-3 sample. However two main divergences were observed: low parasitemic levels and a myotropic tendency. *T. cruzi* samples, which were isolated from patients considered as therapeutic failures, appear, in this research, to have similar biological behaviour patterns to other strains already studied. However, the former cause an infection which is not so se-

vere in the experimental animal. This suggests that drugs could affect the biological behaviour and as such favouring a better host-parasite relationship.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, S. G.; CARVALHO, M. L. & FIGUEIRA, R. M. — Caracterização morfo-biológica e histológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. Gaz. méd. Bahia, 70: 32-42, 1970.
2. ANDRADE, S. G. — Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Bahiano. Rev. Pat. trop., 3: 65-121, 1974.
3. ANDRADE, V.; ANDRADE, S. G.; BARRAL NETTO, M.; PONTES, A. L.; CASTRO, R. — Avaliação do comportamento de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* na infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos. Rev. Soc. bras. Med. trop., 18: 143-154, 1985.
4. BARRET, T. V.; HOFF, R. H.; MOTT, K. E.; MILES, M. A.; GODFREY, D. G.; TEIXEIRA, R.; SOUZA, J. A. A.; SHERLOCK, I. A. — Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zimodemes in Bahia State, Brazil. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 74: 84-90, 1980.
5. BOAINAIN, E. — Tratamento etiológico da doença de Chagas na fase crônica. Goiânia, 1978. (Tese de livre-docência — Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás).
6. BRENER, Z. — Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da moléstia de Chagas. Belo Horizonte, 1961. (Tese de livre-docência — Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de Minas Gerais).
7. BRENER, Z. & CHIARI, E. — Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 5: 220-224, 1963.
8. BRENER, Z. — Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. Ann. trop. Med. parasit., 59: 19-26, 1965.
9. BRUMPT, E. & SILVA, P. — Existence du *Schizotrypanum cruzi* Chagas 1909, à Bahia (Matta de São João). Biologia du *Conorrhinaus megistus*. Bull. Soc. Path. exot., 5: 22, 1912.
10. BRUMPT, E. — Immunité partielle dans les infections à *Trypanosoma cruzi*, transmission de ce trypanosome par *Cimex rotundus*. Rôle régulateur des lotes intermédiaires. Passage à travers la peau. Bull. Soc. Path. exot., 6: 172-176, 1913.
11. MOREL, C. M. & SIMPSON, L. — Characterization of pathogenic *Trypanosomatidae* by restriction endonuclease finger-printing of kinetoplast DNA minicircles. Amer. J. trop. Med. Hyg., 29 (Suppl.): 1070-1074, 1980.

12. MOREL, C. M.; GONÇALVES, A. M. & DEANE, M. P. — Schizodeme characterization of natural and artificial of *Trypanosoma cruzi* as tool in study of Chagas disease. In: NEWTON, E. N., ed. *New approaches to the identification of parasites and their vectors*. Basel, Schwabe, 1984. p. 253-275 (Tropical Diseases Research Series No. 5).
13. NUSSENZWEIG, V. & GOBLE, F. — Further studies on antigenic constitution of *Trypanosoma* (*Schyzotrypanum*) *cruzi* experimental. *Parasitology*, 18: 224-230, 1966.
14. PIZZI, T. & PRAGER, R. — Estabilización de la virulencia de una cepa de *Trypanosoma cruzi* por pasage seriada en ratones de constitución genética uniforme: análisis quantitativa del curso de la infección. *Biología*, 16: 3-12, 1952.
15. SILVA, L. H. P. & NUSSENZWEIG, V. — Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia clín. biol. (S. Paulo)*, 20: 191-208, 1953.

---

Recebido para publicação em 26/11/86.