

MIOCARDITE CHAGÁSICA CRÔNICA HUMANA: ESTUDO QUANTITATIVO DOS LINFÓCITOS CD4+ E DOS CD8+ NO EXSUDATO INFLAMATÓRIO

Sebastião Tostes Junior, Edison Reis Lopes, Fausto Edmundo Lima Pereira e Edmundo Chapadeiro

Em cortes histológicos de fragmentos transmurais congelados da parede livre do ventrículo esquerdo, obtidos em necrópsias de 10 chagásicos crônicos cardiopatas, foram contados os linfócitos CD4+ e os CD8+ do infiltrado miocárdico. As células foram marcadas com anticorpos monoclonais, usando-se a técnica estreptavidina-biotina. Contou-se: 1) os linfócitos em todo o exsudato (LTE) e, separadamente, 2) os linfócitos que estavam em contato ou muito próximos das miocélulas (LCMPM). Foram considerados muito próximos aqueles linfócitos cujos núcleos distavam, das miocélulas, menos que seus próprios menores diâmetros nucleares. Os linfócitos CD8+ foram mais numerosos do que os CD4+, principalmente entre os LCMPM. A relação CD4/CD8 foi de $0,37 \pm 0,20$ entre os LTE, mas foi menor quando considerados apenas os LCMPM ($0,23 \pm 0,11$). Dentre os LTE, $34 \pm 11\%$ dos CD8+ (contra $24 \pm 12\%$ dos CD4+) eram LCMPM. Todas essas diferenças foram estatisticamente significantes. Linfócitos das duas subpopulações foram vistos em íntima relação com miocélulas íntegras ou rotas, e não foram observados parasitas nos cortes examinados. Estes achados concordam com a idéia de que a lesão dos miocardiócitos na forma cardíaca da doença de Chagas humana é mediada principalmente por linfócitos T citotóxicos.

Palavras-chaves: Tripanosomíase cruzi. Doença de Chagas. Miocardite. Patogênese. Linfócitos T.

A caracterização do infiltrado celular da miocardite chagásica crônica humana (MChCrH) pode fornecer informações relevantes para o esclarecimento da patogênese, história natural, terapêutica e prognóstico da doença de Chagas (DCh).

Os métodos convencionais mostram que o exsudato celular na MChCrH é constituído predominantemente de linfócitos e macrófagos, ao lado de menor número de eosinófilos, plasmócitos, neutrófilos e mastócitos⁶. Mais recentemente, estudos imunohistoquímicos têm demonstrado predomínio de células CD8+^{4 7}. Em uma dessas pesquisas, Higuchi e cols.⁴ utilizaram biópsias endomiocárdicas de ventrículo direito, procedimento que apresenta limitações em razão das pequenas dimensões dos fragmentos e da sede em que são colhidos². No outro estudo, Reis e cols.⁷ analisaram

amostras transmurais do ventrículo esquerdo e do septo interventricular.

Com a finalidade de procurar mais elementos que pudessem auxiliar no esclarecimento do papel dos linfócitos T na gênese das lesões das miocélulas cardíacas na DCh, nos pareceu de interesse ampliar os estudos imunohistoquímicos dessas células do exsudato da MChCrH. Para isto, em amostras transmurais do ventrículo esquerdo, quantificamos os linfócitos CD4+ e os CD8+ não só de todo o infiltrado, mas também, separadamente, os que se encontravam em contato ou muito próximos dos miocardiócitos.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes e obtenção dos fragmentos. Fragmentos de ventrículo esquerdo foram obtidos em necrópsias completas de 10 chagásicos crônicos cardiopatas - com insuficiência cardíaca congestiva e/ou arritmias - provenientes do Hospital Escola da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro e do Posto Médico Legal de Uberaba, cujos dados se encontram na Tabela 1.

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG.

Suporte financeiro: CNPq e NIH.

Endereço para correspondência: Dr. Sebastião Tostes Junior.

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana, Hospital Escola.

R. Getúlio Guaritá 130, 38025-440 Uberaba, MG.

Recebido para publicação em 05/04/94.

Tabela 1 - Dados dos pacientes, todos cardiopatas, brancos e do sexo masculino.

Caso	Caso	Peso do coração (gramas)	ICC	Mega- esôfago	Mega- côlon	Outros achados significativos
1	46	190	-	+	-	broncopneumonia, desnutrição, infarto cerebral
2	52	480	+	-	-	HAS, infarto cerebral antigo
3	57	580	+	-	-	tromboembolismo pulmonar
4	50	450	-	+	-	-
5	38	450	+	-	-	-
6*	24	350	-	-	-	-
7	40	420	+	-	-	broncopneumonia, cirrose hepática, etilismo crônico
8	45	470	+	-	+	caquexia
9	38	240	+	-	-	broncopneumonia, infarto cerebral antigo, pielonefrite aguda bilateral
10	52	410	-	+	-	-
Média	45	404				
Desvio padrão	11	116				
Mediana	45	435				

ICC = Insuficiência cardíaca congestiva presente em algum momento da vida.

* = morte súbita inesperada.

+ = presente.

- = ausente.

HAS = hipertensão arterial sistêmica.

O diagnóstico de DCh baseou-se nos dados clínicos e anatomopatológicos macro e microscópicos e nas reações sorológicas (fixação de complemento, hemaglutinação e imunofluorescência) realizadas no sangue e/ou no líquido pericárdico.

As necrópsias foram realizadas imediatamente após a comprovação do óbito e o preenchimento das formalidades legais para sua execução; quando necessário, os cadáveres foram conservados em câmara frigorífica a 4°C.

Os fragmentos foram retirados da porção lateral da parede livre do ventrículo esquerdo, na junção dos terços superior e médio, em toda espessura exceto as trabéculas cárneas, e embalados e colocados em nitrogênio líquido, 3 a 10 horas após a morte.

Imunohistoquímica. Utilizamos a técnica estreptavidina-biotina, com os anticorpos monoclonais murinos "DaKoT4", código M716, e "DaKoT8", código M707. O anticorpo "DaKoT4" marca células T auxiliares/indutoras, alguns monócitos do sangue periférico, alguns macrófagos

e células de Langerhans¹. O anticorpo "DaKoT8" marca células T citotóxicas/supressoras e células citotóxicas naturais¹. Resumidamente, cortes de 6 micrômetros de espessura eram obtidos no criostato, secados ao ar, fixados em acetona e embalados e armazenadas a -70°C. Uma a quatro semanas após, eram submetidos à coloração, sendo todos os procedimentos realizados à temperatura ambiente. Primeiramente eram incubados por 15 minutos com um dos anticorpos monoclonais, diluídos 1:10 em TBS pH 7,6. Continuava-se o procedimento com o "kit" para coloração rápida "Dako", código K687. Os cortes eram sucessivamente incubados com: 1) imunoglobulina biotinilada anti-imunoglobulina de camundongo; 2) estreptavidina ligada a fostatase alcalina e 3) uma mistura de tampão tris, naftol fosfato (substrato), fucsina (cromógeno) e acelerador. A seguir, os cortes eram contraincubados com hematoxilina de Gill ("Sigma") e montados. Como controle positivo foi usado um corte de linfonodo obtido de necrópsia, em condições semelhantes às do coração, e como controles negativos um corte desse linfonodo e um de coração

de cada caso, os quais recebiam TBS ao invés do anticorpo monoclonal.

Como resultado dessa técnica de coloração, as células portadoras dos antígenos pesquisados mostram citoplasmas densamente avermelhados (Figuras 3A-3F).

Quantificação dos Linfócitos CD4+ e dos CD8+. Foi feita com a ocular integradora Zeiss II (Figura 1), aumento de 400 vezes, e simultaneamente através de dois sistemas em cada campo. No sistema 1 foram contadas as células que estavam dentro do quadrado ($1,4 \times 10^{-2} \text{mm}^2$) ou que eram superpostas ou tangenciadas por seus lados; no sistema 2 foram contadas as células superpostas ou tangenciadas pelas barras horizontais com traços verticais (Figuras 2 e 3A).

Contava-se os linfócitos CD4+ e os CD8+ inicialmente de todo o infiltrado e, posteriormente, apenas aqueles que estavam em contato ou muito próximos das miocélulas. Foram considerados muito próximos os linfócitos cujos núcleos distavam, das miocélulas, menos que seus próprios menores diâmetros nucleares (Figura 3B).

Em cada caso a objetiva era colocada no centro do corte e eram contadas as células em 100 campos obtidos por movimentos horizontais e verticais alternados, sendo desprezados aqueles em que as miocélulas ocupavam menos da metade da área de contagem.

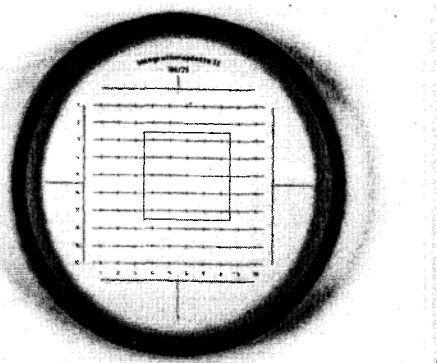


Figura 1 - Ocular integradora ZEISS II, composta de quadrado cujos lados medem 0,12mm e de barras horizontais cruzadas por traços verticais.

A contagem em 100 campos foi realizada três vezes, não imediatamente consecutivas, em cada corte, obtendo-se daí o número médio dos subtipos de linfócitos por campo em cada caso. Com esses dados foram calculados os totais dos linfócitos CD4+ e dos CD8+, e a relação CD4/CD8, em cada caso. Calculamos também as porcentagens dos subtipos de linfócitos, do infiltrado miocárdico em geral, que estavam em contato ou muito próximos das miocélulas, através da comparação dos números médios, por campo, de cada tipo e de cada caso. Determinou-se as médias, os desvios padrões e as medianas dos dados obtidos.

Análise estatística. Foram utilizados o teste "t" de Student e o teste de Wilcoxon, ambos a um nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Em todos os casos o miocárdio apresentava inflamação e fibrose, que variaram de moderada a severa, e não foram observados parasitas nos cortes examinados.

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os valores dos dois sistemas de contagem, e por isso nos limitaremos a apresentar os dados obtidos através do sistema de barras horizontais, expostos nas Tabelas 2, 3 e 4.

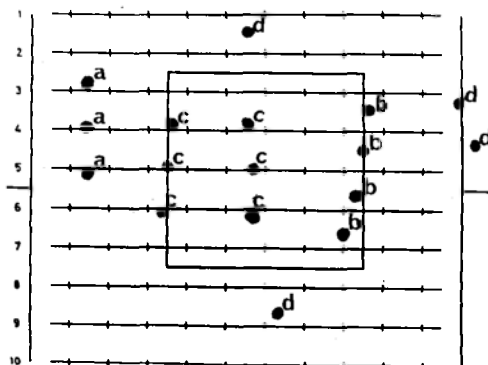


Figura 2 - Ilustração da contagem de células: a) apenas no sistema de barras horizontais; b) somente no sistema do quadrado; c) nos dois sistemas; d) células não contadas.

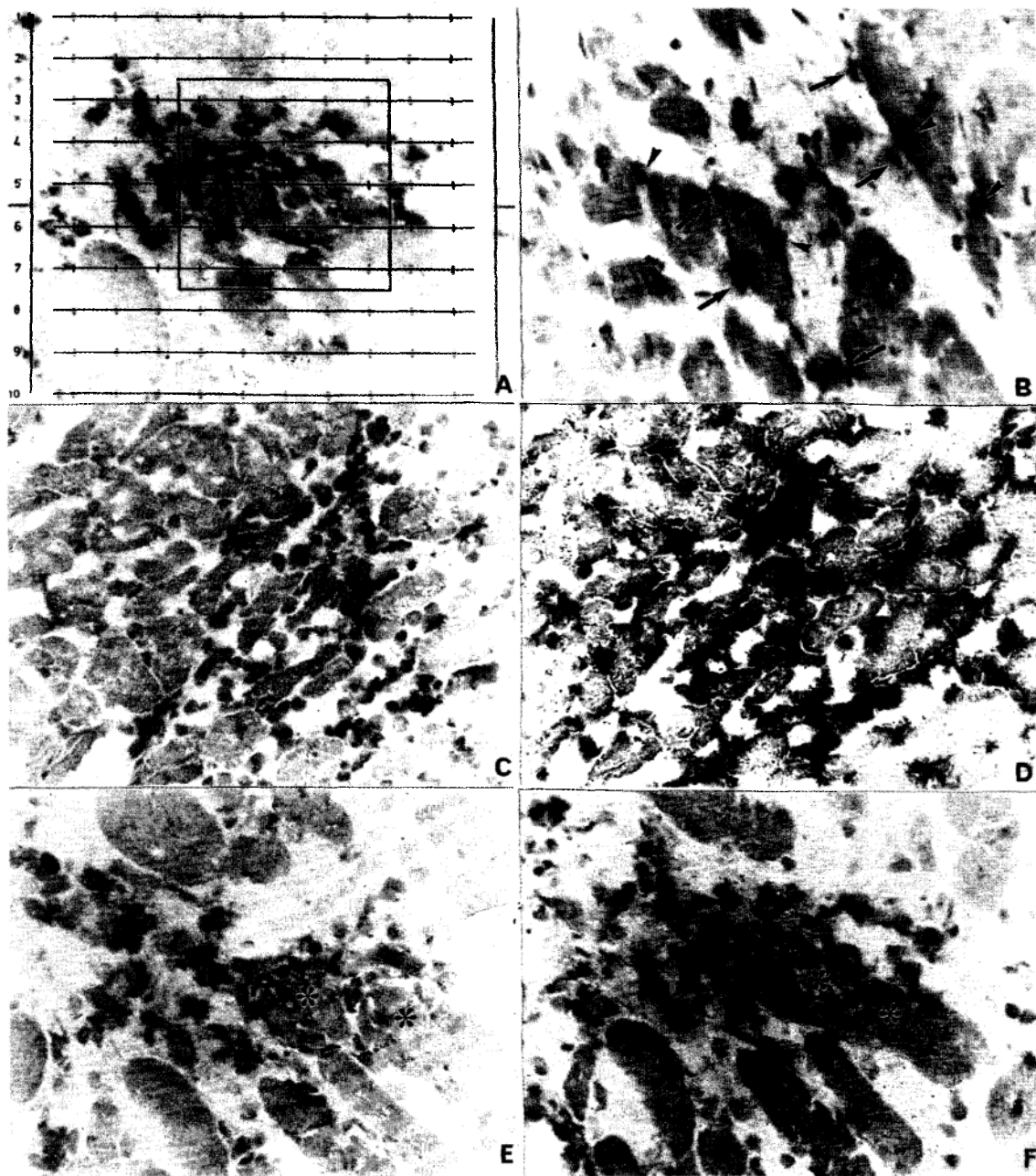


Figura 3 - Linfócitos do infiltrado miocárdico fenotipificados com anticorpos monoclonais e técnica estreptavidina-biotina (aumentos de 400x). A) montagem fotográfica mostrando linfócitos CD8+ vistos com a ocular integradora; B) linfócitos CD8+ com destaque para os que estão em contato (cabeças de seta) ou muito próximos (setas) das miocélulas; C) e D) dois cortes próximos, com linfócitos CD4+ (C) e CD8+ (D) intimamente associados a miocélulas, a maioria delas sem lesões evidentes; E) e F) dois cortes próximos, com linfócitos CD4+ (E) e CD8+ (F) intimamente associados a miocélula em destruição (asteriscos).

Tabela 2 - Linfócitos T do infiltrado miocárdico. Números médios das subpopulações e do total, por campo, e relações CD4/CD8.

Caso	Barras horizontais			
	números médios por campo			relação CD4/CD8
	CD4*	CD8*	Total**	
1	1,38	2,99	4,37	0,46
2	1,63	2,63	4,26	0,62
3	0,53	1,42	1,95	0,38
4	1,07	1,51	2,58	0,71
5	0,31	1,90	2,21	0,16
6	1,12	3,13	4,25	0,36
7	0,51	1,41	1,91	0,36
8	0,15	1,51	1,66	0,10
9	0,06	0,39	0,45	0,15
10	1,39	3,71	5,10	0,37
Média	0,81	2,06	2,87	0,37
Desvio padrão	0,57	1,02	1,51	0,20
Mediana	0,80	1,71	2,40	0,37

* Os números médios dos linfócitos CD4 e dos CD8 positivos foram obtidos pela média após três contagens de cada subpopulação em 100 campos, com aumento de 400 vezes ao microscópio.

** Resultados das somas das duas colunas anteriores, exceto as médias, os desvios padrões e as medianas.

Análises estatísticas: 1. Comparação entre o número de linfócitos CD4+ e o de CD8+ (teste "t" de Student para populações não correlatas) - o número por campo de linfócitos CD8+ foi maior que o de CD4+ ($p=0,0045$).

Tabela 3 - Linfócitos T, do infiltrado miocárdico, em contato ou muito próximos das miocélulas*. Números médios das subpopulações e do total, por campo, e relações CD4/CD8.

Caso	Barras horizontais			
	números médios por campo			relação CD4/CD8
	CD4**	CD8**	Total***	
1	0,29	0,84	1,13	0,35
2	0,14	0,68	0,83	0,21
3	0,12	0,30	0,41	0,39
4	0,19	0,48	0,67	0,40
5	0,12	0,75	0,87	0,16
6	0,24	1,57	1,81	0,15
7	0,13	0,68	0,81	0,19
8	0,04	0,43	0,47	0,09
9	0,03	0,18	0,21	0,17
10	0,17	0,71	0,87	0,24
Média	0,15	0,66	0,81	0,23
Desvio padrão	0,08	0,38	0,44	0,11
Mediana	0,14	0,68	0,82	0,20

* Foram considerados muito próximos os linfócitos cujos núcleos distavam, das miocélulas, menos que seus próprios menores diâmetros nucleares.

** Os números médios dos linfócitos CD4+ e dos CD8+ foram obtidos pela média após três contagens de cada subpopulação em 100 campos, com aumento de 400 vezes ao microscópio.

*** Resultados das somas das duas colunas anteriores, exceto as médias, os desvios padrões e as medianas.

Análises estatísticas: 1. Comparação entre o número de linfócitos CD4+ e o de CD8+ (teste "t" de Student para populações não correlatas) - o número por campo de linfócitos CD8+ foi maior que o de CD4+ ($p=0,0025$).

Tabela 4 - Porcentagens dos linfócitos CD4 e dos CD8 positivos, do infiltrado miocárdico, que estavam em contato ou muito próximos das miocélulas*.

Caso	CD4	CD8
1	21	28
2	09	26
3	22	21
4	18	32
5	39	40
6	21	50
7	26	49
8	27	28
9	50	46
10	12	19
Média	24	34
Desvio padrão	12	11
Mediana	22	30

* As porcentagens em cada caso foram calculadas pela comparação dos respectivos números médios, por campo, das Tabelas 2 e 3 (n° médio Tabela 3x100/n^o médio Tabela 2).

Análise estatística: (teste de Wilcoxon) - A porcentagem de linfócitos CD8+ foi maior do que a de CD4+ ($p=0,041$).

Representação simplificada e esquemática dos resultados encontra-se na Figura 4.

Linfócitos das duas subpopulações foram encontrados em íntima associação com miocélulas morfológicamente íntegras (Figuras 3C e 3D) ou em destruição (Figuras 3E e 3F).

DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que na MChCrH parte do exsudato é constituído por células CD4+ e por células CD8+, sendo estas últimas mais numerosas. Obtivemos relação CD4/CD8 de $0,37 \pm 0,20$ em amostras transmuralis de ventrículo esquerdo, muito próxima à de $0,36 \pm 0,03$ observada por Reis e cols.⁷ em fragmentos transmuralis de ventrículo esquerdo e do septo interventricular. Valor semelhante foi também obtido por Higuchi e cols.⁴, que observaram relação CD4/CD8 de $0,3 \pm 0,2$ em biópsias endomiocárdicas de ventrículo direito. Portanto, as amostras de ventrículo direito, utilizadas por essa autora, parecem ser representativas do miocárdio ventricular do

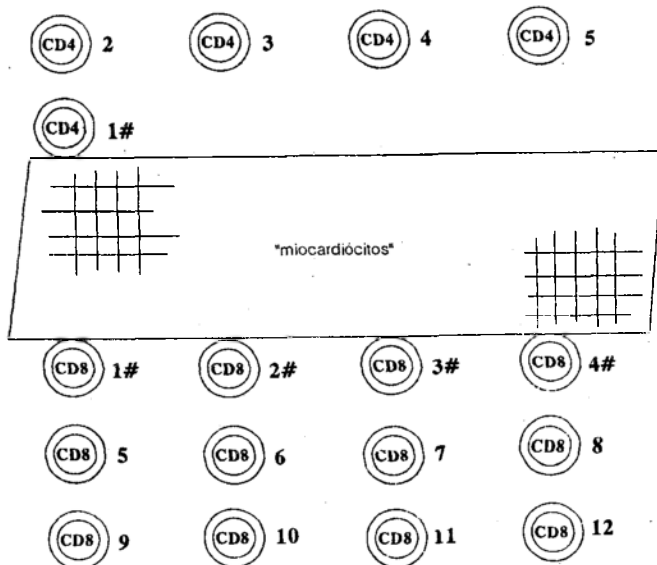


Figura 4 - Representação esquemática dos resultados. A relação CD4/CD8 no infiltrado miocárdico foi de 0,37, o que significa que, para cada 17 linfócitos CD4+ ou CD8+, aproximadamente 5 eram CD4+ e 12 eram CD8+. Vinte e quatro por cento dos CD4+ (aproximadamente um em cada cinco) e 34% dos CD8+ (aproximadamente quatro em cada doze) estavam em contato ou muito próximos das miocélulas. Nesta localização, a relação CD4/CD8 foi de 0,24 (aproximadamente um linfócito CD4+ para quatro CD8+).

Linfócitos em contato ou muito próximos dos miocardiócitos.

chagásico crônico no que se refere à relação CD4/CD8 no exsudato inflamatório. Cabe ressaltar que os números absolutos de linfócitos, por nós constatados no presente estudo, diferem dos relatados por Higuchi e cols.⁴ e por Reis e cols.⁷. Isto se deve a que, nestes três trabalhos, foram empregadas metodologias diversas para contagem das células.

Por outro lado, nossa observação da presença de linfócitos CD8+ em contato com miocardiócitos em destruição sugere fortemente uma ação patogênica dessas células na MChCr. Em concordância com essa idéia, verificamos que a fração CD8+ dos linfócitos fenotipificados foi maior na intimidade dos miocardiócitos (CD4/CD8 = 0,23 ± 0,11) do que em todo o exsudato (CD4/CD8 = 0,37 ± 0,20), e que 34 ± 11% dos linfócitos CD8+ (contra 24 ± 12% dos CD4+) do infiltrado inflamatório estavam em contato ou muito próximos das miocélulas cardíacas. Ademais, além das células CD8+ constituírem a maior parte do exsudato^{4,7} e expressarem Granzima A⁷, que é um marcador de citotoxicidade em linfócitos T, a expressão de antígenos de classe I do complexo maior de histocompatibilidade (CHPI) nas miocélulas está aumentada⁸, propiciando a atividade citotóxica desses linfócitos. Há, portanto, evidências de que a lesão dos miocardiócitos na forma cardíaca da doença de Chagas crônica humana é mediada principalmente por linfócitos T citotóxicos, via CHPI.

No entanto, estas avaliações imunohistoquímicas não permitem concluir que os achados sejam os mesmos em todo o miocárdio. Por isso, nos parece necessário que novos estudos sejam realizados naqueles locais onde o *T. cruzi* ou seus antígenos estão presentes, inclusive porque tem sido demonstrado parasitismo cardíaco em número apreciável de casos^{3,5}. Além disso, seria também fundamental que estudos similares fossem feitos em outras estruturas, como por exemplo, nos músculos liso e esquelético, no sistema nervoso autônomo etc. É importante ressaltar que estes conhecimentos poderiam auxiliar no esclarecimento da patogênese da DCh e, por conseguinte, na sua orientação terapêutica.

SUMMARY

Myocardial exsudate CD4+ and CD8+ lymphocytes

were counted in transmural left ventricular free wall frozen sections taken from 10 necropsied chronic cardiac chagasic patients. The cells were labeled with monoclonal antibodies using a streptavidin-biotin technique. We counted: 1) lymphocytes in the total exsudate (LTE) and, separately, 2) the lymphocytes touching or very near to myocells (LTVNM). Lymphocytes were considered very near whenever their own nuclear shortest nuclear diameter was larger than their distance from myocells. CD8+ lymphocytes were more numerous than CD4+ lymphocytes, especially among the LTVNM. The LTE CD4/CD8 ratio was 0,37 ± 0,20, but the LTVNM CD4/CD8 ratio was smaller (0,23 ± 0,11). Among the LTE, 34 ± 11% of CD8+ (against 24 ± 12% of CD4+) were LTVNM. All these differences were statistically significant. Both subtypes of T-lymphocytes were found to have an intimate relationship with both ruptured and unruptured myocells, and parasites were not seen. These findings are in accordance with the idea that the myocardial cell lesions in the cardiac form of human Chagas' disease are mediated mainly by T-cytotoxic lymphocytes.

Key-words: Trypanosomiasis cruzi. Chagas' disease. Myocarditis. Pathogenesis. T lymphocytes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chan JKC, Ng CS, Hui PK. A simple guide to the terminology and application of leucocyte monoclonal antibodies. *Histopathology* 12:461-480, 1988.
2. Chow LH, Ye Y, Linder J, McManus BM. Phenotypic analysis of infiltrating cells in human myocarditis. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 113:1357-1362, 1989.
3. Higuchi ML, Brito T, Reis MM, Barbosa A, Bellotti G, Pereira-Barreto AC, Pilleggi F. Correlation between *Tripanosoma Cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovascular Pathology* 2:101-106, 1993.
4. Higuchi ML, Gutierrez PS, Aiello VD, Palomino S, Bocchi E, Kalil J, Bellotti G, Pilleggi F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Archives A, Pathological Anatomy and Histopathology* 423:157-160, 1993.

5. Jones EM, Colley DG, Tostes Jr S, Lopes ER, Vnencak Jones CL, McCurley TL. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 48:348-357, 1993.
6. Lopes ER, Chapadeiro E, Tafuri WL, Prata AR. Patologia das principais doenças tropicais no Brasil. Doença de Chagas. In: Lopes ER, Chapadeiro E, Raso P, Tafuri WL (eds) *Bogliolo Patologia*. 4ª edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro p.1047-1065, 1987.
7. Reis DD, Jones E, Tostes Jr S, Lopes ER, Chapadeiro E, Gazinelli G, Colley DG, McCurley TL. Expression of MHC antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 49:192-200, 1993.
8. Reis DD, Jones E, Tostes Jr S, Lopes ER, Gazinelli G, Colley DG, McCurley TL. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of TNF-alfa⁺ cells and dominance of granzyme A⁺, CD8⁺ lymphocytes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 48:637-644, 1993.