

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O MÉTODO CONVENCIONAL E O MÉTODO DA PEROXIDASE ANTI-PEROXIDASE NA PESQUISA DO PARASITISMO TISSULAR NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA (*)

A. J. A. BARBOSA (1), H. GOBBI (1), B. T. LINO (1), E. LAGES-SILVA (2), L. E. RAMIREZ (3),
V. P. A. TEIXEIRA (4) e H. O. ALMEIDA (4)

R E S U M O

Na maioria dos chagásicos crônicos o *Trypanosoma cruzi* não é detectado no tecido ou apresenta-se com extrema raridade, mesmo quando é pesquisado exaustivamente. Sendo os métodos utilizados, até então, inespecíficos para a demonstração do *T. cruzi*, propôs-se no presente trabalho proceder ao estudo comparativo entre o método convencional (HE) e o método imunocitoquímico pela peroxidase anti-peroxidase (PAP), na avaliação quantitativa do parasitismo. Selecionaram-se 3 casos de cardiopatia chagásica crônica e, de um mesmo fragmento de cada caso, obtiveram-se cortes que foram corados pelo H.E. (média de 100 cortes por caso) e, consecutivamente, outros que foram corados pelo PAP (média de 70 cortes por caso). O caso n.º 1 foi autopsiado em 1952 e apresentava parasitismo freqüente. Nos demais, o exame rotineiro foi negativo. Obtiveram-se os seguintes resultados expressos em n.º de ninhos/100 cortes, respectivamente, corados pelo H.E. e pelo P.A.P. (HE/PAP). Caso n.º 1 = 80/171; caso n.º 2 = 5/116 e caso n.º 3 = 1/2. Os resultados mostram que o método imunocitoquímico empregado, além de facilitar o diagnóstico do parasitismo, demonstra também pequenos ninhos de amastigotas que dificilmente seriam diagnosticados pelos métodos convencionais; além disso mostrou-se útil mesmo em tecido incluídos em parafina há longo tempo.

UNITERMOS: Moléstia de Chagas — PAP — Cardiopatia chagásica crônica — Parasitismo cardíaco.

I N T R O D U Ç Ã O

Admite-se ser extremamente rara a presença do *Trypanosoma cruzi* nos tecidos da quase totalidade dos portadores de doença de Chagas crônica⁷. No coração, principal órgão de choque da doença, apesar de muitas vezes apresentar miocardite relativamente acentuada, não se de-

monstra a presença do parasita, pelo menos através de exames histológicos rotineiros³. Por outro lado, quando se procedem a exames sistematizados tanto do coração¹, como de outros órgãos^{2,6} a freqüência dos achados do parasita aumenta, às vezes inesperadamente, demons-

(1) Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFMG. Av. Alfredo Balena 190. Belo Horizonte, CEP 30000, MG — Brasil

(2) Centro de Pesquisa René Rachou. FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG — Brasil

(3) Departamento de Parasitologia, Universidade de Antioquia, Medellín, Colombia

(4) Disciplina de Patologia Geral da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, Brasil

(*) Trabalho realizado com auxílio financeiro da FINEP e CNPq

Endereço para correspondência e pedidos de Separatas: Alfredo J. A. Barbosa, Faculdade de Medicina da UFMG Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal, Av. Prof. Alfredo Balena, 190, 30 000 — Belo Horizonte — Brasil

trando que, pelo menos em um certo número de casos, o parasitismo tissular pelo *T. cruzi* pode ser mais freqüente do que o correntemente admitido. O principal ponto sujeito a críticas nos trabalhos que lidam com a pesquisa do parasita nos tecidos é o fato de todos eles utilizarem metodologias convencionais, geralmente a coloração pela Hematoxilina e Eosina (HE), inespecífica para a demonstração do *T. cruzi*, pois, cora também outras estruturas celulares basofílicas como núcleos, fragmentos de núcleos, certos corpúsculos intracelulares e mesmo outros parasitas morfológicamente semelhantes ao *T. cruzi* como *Toxoplasma* e *Histoplasma capsulatum*. Portanto, o diagnóstico do parasitismo tissular somente pode ser feito com segurança pelos métodos convencionais quando se encontram ninhos de amastigotas intracelulares relativamente grandes e com os parasitas exibindo suas características anatômicas peculiares. Ninhos menores, ou pouco típicos, ou mesmo formas isoladas do parasita, geralmente passam despercebidas ou não oferecem elementos suficientes para diagnóstico.

Com a recente utilização de método imunocitoquímico pela peroxidase anti-peroxidase (PAP) para a demonstração do *T. cruzi* em tecidos incluídos em parafina⁵ abrem-se as portas de uma metodologia nova e altamente específica para estudo do parasitismo tissular na doença de Chagas humana e na tripanosomose cruzi experimental. Entretanto, sendo o método relativamente mais caro e complexo que os rotineiros, a sua utilização para quantificar o parasitismo em tecidos de chagásicos crônicos somente valeria a pena se, além de facilitar o diagnóstico e ser mais específico, também demonstrasse maior número de parasitas, aumentando sensivelmente a probabilidade do diagnóstico dos mesmos e revelando formas parasitárias que não poderiam ser evidenciadas pelos métodos convencionais. No sentido de verificar esta possibilidade realizou-se o presente trabalho.

MATERIAL E MÉTODO

Selecionaram-se três cardiopatias chagásicas crônicas de pacientes falecidos com insuficiência cardíaca congestiva e que apresentavam exame de Machado-Guerreiro positivo. Duas foram de indivíduos autopsiados na Faculdade de Me-

dicina do Triângulo Mineiro, Uberaba. M.G.: N-3404, sexo masculino, 37 anos, mulato, peso do coração 350 g e N-2891, sexo masculino, 40 anos, branco, peso do coração 780 g. O terceiro caso foi autopsiado na Faculdade de Medicina da UFMG, Belo Horizonte, M.G., em abril de 1952 sendo a autópsia de número A-804, referente a indivíduo de sexo feminino, 24 anos, de cor preta, peso do coração 350 g. O quadro histológico da miocardite foi aquele classicamente descrito na doença de Chagas crônica, tendo sido semelhante nos três casos, exceto para o fato de que o caso A-804 apresentava parasitismo relativamente freqüente, motivo pelo qual foi escolhido. Nos outros dois casos evidenciou-se parasitas somente após exame de cortes seriados.

De cada caso escolheu-se 1 fragmento de tecido incluído em parafina, contendo toda a espessura da parede ventricular (A-804) ou um anel de átrio direito incluindo septo interatrial (N-2891 e N-3404). Obteve-se o seguinte número de cortes semi-seriados de cada bloco e que foram corados pelo HE: A-804, 110 cortes; N-2891, 100 cortes e N-3404, 100 cortes. Em seguida, obteve-se de cada caso o seguinte número de cortes semi-seriados que foram utilizados para a coloração pelo método de peroxidase anti-peroxidase: A-804, 71 cortes; N-2891, 100 cortes e N-3404, 61 cortes. Para a aplicação do método da imunoperoxidase utilizou-se anti-soro primário produzido em coelho pela inoculação i.p. de 10^7 tripomastigotas da cepa Y provenientes de camundongo irradiado. O anti-soro utilizado, de n.º 41, apresenta título de anticorpos anti-*T. cruzi* de 1:1280 à imunofluorescência indireta e alta taxa de anticorpos líticos anti-*T. cruzi*, como evidenciada pela reação de lise mediada por complemento⁹. O anti-soro foi diluído em tampão fosfato salino (PBS), pH 7,2 na proporção de 1:1000 e aplicado sobre os cortes que foram incubados em câmara úmida a 4°C por 18 horas, conforme utilizado em trabalho anterior⁵. Anteriormente a esta primeira camada de anticorpos os cortes foram tratados com peróxido de hidrogênio para bloquear a peroxidase endógena e após lavagens repetidas em PBS, foram incubados com soro normal de cabra uma vez que se utilizou como anticorpo de ligação IgG de cabra anti-IgG de coelho (Miles Yeda Ltd., Israel). Após o tratamento com a terceira camada (Peroxidase anti-Peroxi-

dase de coelho, Miles-Yeda Ltd., Israel), os cortes foram tratados com solução de 30 mg% de tetrahydrocloroto de 3,3-diaminobenzidina com 0,03% de peróxido de hidrogênio. Como controles positivos utilizaram-se tecidos de camundongo infectado com tripomastigotas, cepa Y, e sacrificados na fase aguda da tripanosomose. Como controles negativos utilizaram-se ao invés do anti-soro primário, soro normal de coelho ou apenas PBS.

Tanto os cortes corados pelo HE como os corados pela peroxidase anti-peroxidase, foram examinados exaustivamente pelo menos por dois examinadores, sendo todos os ninhos ou figuras suspeitas observadas marcadas na lâmina. Os ninhos ou figuras suspeitas que persistiam em dúvida não foram considerados. Deste modo, foi contado o número total de ninhos de amastigotas, diferenciando-se em cortes seqüenciais ninhos iguais e diferentes.

RESULTADOS

Nos três casos examinados, A-804, N-2891 e N-3404, o método da imunoperoxidase para a identificação do *T. cruzi* apresentou bons resultados (Figs. 1 e 2). Em todos eles o número de ninhos de amastigotas foi sempre maior nas preparações coradas pela imunoperoxidase do que naquelas coradas pelo HE (Tabela I). Mesmo no caso A-804, cujo tecido foi incluído em parafina há 33 anos, os ninhos de amastigotas, que neste caso em particular eram relativamente freqüentes, foram corados nitidamente pelo método imunocitoquímico e diagnosticados em quantidade significativamente maior do que nos cortes corados pelo HE. Nas preparações coradas pela peroxidase anti-peroxidase a maioria dos ninhos podia ser facilmente identificada no pequeno ou médio aumento do microscópio; mesmo aqueles de pequenas proporções onde somente era possível observar um ou alguns

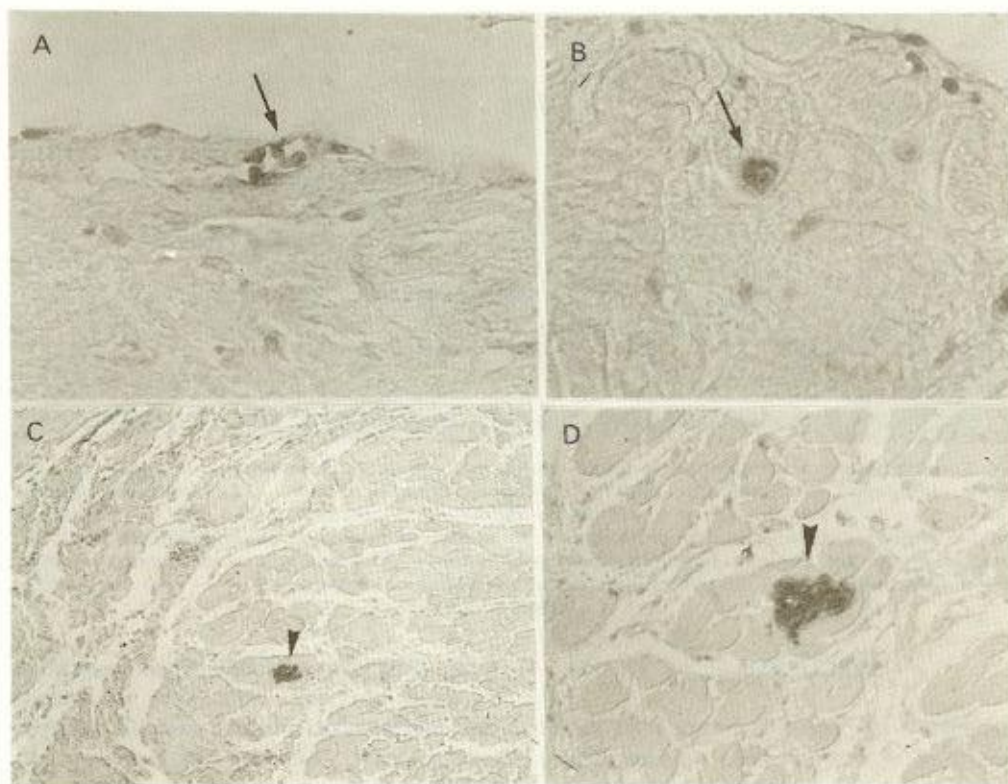


Fig. 1 — Preparações histológicas de miocárdio coradas pelo método da peroxidase anti-peroxidase para evidenciar amastigotas do *Trypanosoma cruzi* em cardiopatia chagásica crônica. Contracoloração: Hematoxilina. Pequenos ninhos de amastigotas fortemente corados (setas), sendo que em A e B apresentam apenas 4 ou 5 parasitas. Em D observa-se ampliação de C. A, B e D = 500x; C = 200x.

poucos amastigotas presentes em fibras musculares cortadas obliquamente ou transversalmente e sem nenhuma reação inflamatória circunjacente (Fig. 1 A, B). Por algumas vezes, (caso A-804 e caso N-3404) identificaram-se pelo método da imunoperoxidase, amastigotas de perimeio a exsudato inflamatório aparentemente na vizinhança de fibras musculares parcialmente rotas ou no interior de macrófagos (Fig. 2 B, C). Como pode ser deduzido da Tabela I, o resul-

tado das contagens expresso em número de ninhos de amastigotas/100 cortes, corados pelo HE e pela peroxidase anti-peroxidase (PAP), respectivamente HE/PAP, é: Caso A-804, 80/171; Caso N-3404, 5/116; Caso N-2891, 1/2. Entretanto, muitos desses ninhos se repetiam em cortes sequenciais; o resultado expresso em número de ninhos diferentes por 100 cortes é: Caso A-804, 25/70; Caso N-3404, 3/26 e Caso N-2891, 1/2.

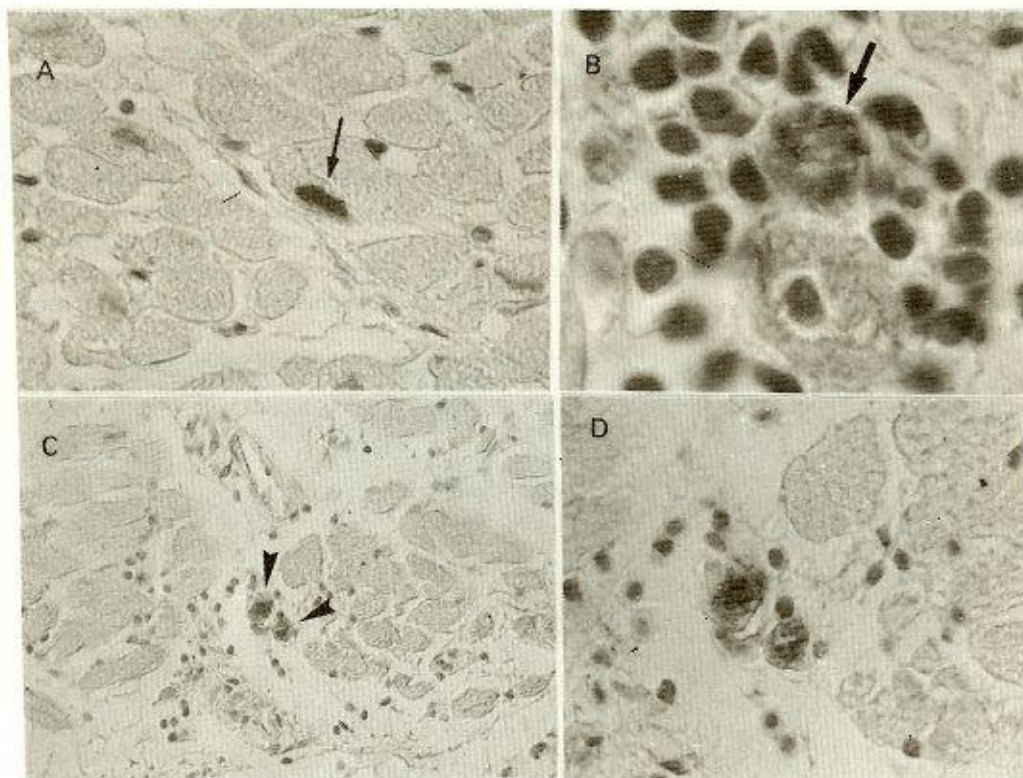


Fig. 2 — Preparações histológicas de miocárdio coradas pelo método da peroxidase anti-peroxidase para evidenciar amastigotas do *Trypanosoma cruzi* em cardiopatia chagásica crônica. Contracoloração: Hematoxilina. A) e B) — Pequenos ninhos de amastigotas (setas), em A ocupando apenas parte do sarcoplasma cortado transversalmente e em B), provavelmente no interior de macrófago, na intimidade de foco inflamatório. C) Dois pequenos ninhos de amastigotas (setas) e, como os anteriores, dificilmente identificáveis em preparações coradas convencionalmente. Em D) observa-se ampliação de C. A e D = 500x; B = 1000x; C = 200x.

DISCUSSÃO

A utilização de método imunocitoquímico específico para a demonstração de amastigotas do *T. cruzi* no tecido foi primeiramente empregado por Andrade & col.⁴ na tripanosomose experimental através da imunofluorescência indireta. Esta, embora possa se constituir em

meio útil para a identificação qualitativa do *T. cruzi*, apresenta uma série de inconveniências inerentes ao próprio método e amplamente conhecidas¹². Pode ser útil, por exemplo, para a confirmação da natureza antigênica de achados suspeitos à microscopia de rotina. Entretanto, o encontro de figuras fluorescentes suspeitas, quando se pesquisa o parasitismo em

T A B E L A I

Número de ninhos de amastigotas (n.º N) encontrados pelo método de coloração pela Hematoxilina e Eosina (HE) e pelo método da peroxidase anti-peroxidase (PAP) em um mesmo fragmento de tecido de 3 casos de cardiopatia chagásica crônica. n.º C = número de cortes histológicos.

Casos	N.º de cortes		N.º de ninhos		Relação n.º N/n.º C	
	HE	PAP	HE	PAP	HE	PAP
A-804	110	71	87	123	0,79	1,73
N-3404	100	61	05	71	0,05	1,16
N-2891	100	100	01	02	0,01	0,02

determinado tecido, torna necessário proceder-se a colorações rotineiras com finalidade de confirmação ou de localização dos amastigotas. Em virtude desta série de inconveniências, os diversos Autores têm empregado somente as técnicas convencionais de coloração quando se procedem à pesquisa e quantificação do parasitismo na doença de Chagas humana e na tripanosomose cruzi experimental^{1,2,6,11}. O grande inconveniente dos métodos convencionais deriva de sua especificidade limitada que se torna ainda mais relevante quando os parasitas são escassos ou se distanciam de sua morfologia padrão. Entretanto, com a possibilidade de utilização do método imunocitoquímico pela peroxidase anti-peroxidase, altamente sensível e específico para a demonstração do *T. cruzi* em tecidos fixados rotineiramente⁵, abrem-se novas perspectivas para o estudo do parasitismo tissular na doença de Chagas. Além disto, o método apresenta duas vantagens: 1.ª contra-coloração do tecido que pode ser estudado do ponto de vista morfológico e 2.ª a estabilidade da coloração em cortes que podem ser diafanizados, montados entre lâmina e lamínula e guardados para exame posterior. Esta série de vantagens da imunoperoxidase tem contribuído para que este método seja empregado em histoquímica de forma crescente, tanto para a identificação das substâncias antigênicas as mais variadas em tecidos normais e patológicos, como também, de agentes biológicos causadores de doenças, entre estes, alguns parasitas de difícil identificação em preparados rotineiros, como *Toxoplasma*⁸ e *Leishmania*¹⁰.

Em relação à pesquisa do *T. cruzi*, os resultados do presente trabalho demonstram que o método imunocitoquímico empregado parece significativamente mais eficaz que o convencion-

nal, mesmo em tecidos conservados em parafina há longo tempo. No material estudado, o método da imunoperoxidase demonstrou amastigotas isolados, ou ninhos de amastigotas que não puderam ser visualizados ou identificados pelo método rotineiro. A análise do material mostrou que estes parasitas não identificados pela coloração convencional foram principalmente aqueles isolados ou formando pequenos aglomerados intracelulares e que apareciam nos cortes constituídos aparentemente por apenas 2, 3 ou 4 parasitas (Fig. 1A, B e Fig. 2). Este fato explica porque nos casos A-804 e N-3404 o número de ninhos de parasitas foi sensivelmente maior nos cortes corados pelo método da imunoperoxidase. Além disto, os dois casos típicos de miocardite chagásica crônica aqui estudados (N-3404 e N-2891), comportaram-se diferentemente em relação ao parasitismo. Um deles (N-3404) apresentou rico parasitismo evidenciado pela imunoperoxidase (em média, mais de 1 ninho por corte), enquanto que nas lâminas coradas pelo HE apresentou, em média, apenas 1 ninho em cada 20 cortes. No outro caso (N-2891), o parasitismo foi raro tanto nas lâminas coradas pelo HE (1 ninho em 100 cortes), como naquelas coradas pelo método imunocitoquímico (2 ninhos em 100 cortes). Entretanto não podemos afastar que pelo menos parte desta variação do número de parasitas identificados esteja na dependência de variação real da intensidade do parasitismo nos cortes de tecido e não apenas por serem melhor demonstrados pelo método. Apesar de não ter sido o objetivo deste trabalho avaliar o parasitismo na cardiopatia chagásica crônica, o que exigiria estudo mais abrangente, os resultados aqui encontrados podem constituir-se em mais uma evidência de que em determinado número de casos de cardiopatia chagásica crônica a presença do parasita pode ser muito mais frequente e importante do que o correntemente admitido.

Concluindo, os resultados do presente trabalho mostram que, para a identificação e quantificação mais precisa do *T. cruzi* em tecidos de indivíduos chagásicos, o método imunocitoquímico da peroxidase anti-peroxidase oferece importantes vantagens em relação aos métodos puramente morfológicos, usados habitualmente.

SUMMARY

A comparative study between haematoxilin and Eosin and the peroxidase anti-peroxidase stains for tissular parasitism quantification in chronic chagasic cardiomyopathy.

In most patients with chronic Chagas disease the *Trypanosoma cruzi* has been shown to be present in extremely scanty numbers in all tissues extensively studied using conventional non-specific histologic techniques presently available. The present work was carried out in order to compare the immunocytochemical method of peroxidase anti-peroxidase (PAP) with the Haematoxilin and Eosin (HE) technique in the quantification of the parasitism in formalin fixed tissues from chronic chagasic patients. Using the same tissue fragment from each one of 3 cases of chronic chagasic cardiomyopathy, sections were obtained for HE (average: 100 sections per fragment) and for PAP (average: 70 sections per fragment). The fragment from case No. 1 was first studied in 1952 and presented with relatively great number of parasites. The results, expressed as amastigotes nests per 100 sections stained by HE and PAP were, respectively (HE — PAP): case No. 1, 80 — 171; case No. 2, 5-116 and case No. 3, 1-2. The present results show that the immunocytochemical method improves the quantitative evaluation of the parasitism in tissues of chronic Chagas disease. Furthermore, it should be preferred not only for the specific diagnosis but also for quantitative studies on the tissular parasitism even in those tissues included in paraffin wax for long periods of time.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ALMEIDA, H. O.; TEIXEIRA, V. P. A.; GOBBI, H.; ROCHA, A. & BRANDÃO, M. C. — Inflamação associada a células musculares cardíacas parasitadas pelo *Trypanosoma cruzi*, em chagásicos crônicos. *Arch. bras. Cardiol.*, 42-43: 183-186, 1984.

2. ALMEIDA, H. C.; TEIXEIRA, V. P. A. & OLIVEIRA, A. C. F. — Flebite com parasitismo em supra-renais de chagásicos crônicos. *Arch. bras. Cardiol.*, 36: 341-344, 1981.
3. ANDRADE, Z. A. — Anatomia patológica da doença de Chagas. *Rev. goiana Med.*, 4: 103-119, 1958.
4. ANDRADE, Z. A. & ANDRADE, S. G. — Estudo imunocitoquímico da doença de Chagas experimental. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 11: 44-47, 1969.
5. BARBOSA, A. J. A. — Método imunocitoquímico para a identificação de amastigotas do *Trypanosoma cruzi* em cortes histológicos de rotina. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 27: 293-297, 1985.
6. BARBOSA Jr., A. A. & ANDRADE, Z. A. — Identificação do *Trypanosoma cruzi* nos tecidos extra-cardíacos de portadores de miocardite crônica chagásica. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 17: 123-126, 1984.
7. BOGLIOLO, L. — *Patologia*. 3.ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1981. cap. 13, p. 342-395.
8. DUTTON, G. N.; HAY, J. & RALSTON, J. — The immunocytochemical demonstration of *Toxoplasma* within the eyes of congenitally infected mice. *Ann. trop. Med. Parasit.* 78: 431-433, 1984.
9. KRETTLI, A. U.; WEISS-CARRINGTON, P. & NUSSENZWEIG, R. S. — Membrane-bound antibodies of bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis. *Clin. exp. Immunol.*, 37: 416-423, 1979.
10. LIUMI, N.; ABRAMOWITZ, A.; LONDNER, M.; OKON, E. & MORAG, A. — Immunoperoxidase method of identification of *Leishmania* in routinely prepared histological sections. *Virchows Arch. path. Anat.*, 401: 147-151, 1983.
11. SOUZA, M. A. & ALENCAR, A. A. — On the tissular parasitism of *Trypanosoma cruzi* Y strain in swiss mice. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 26: 316-321, 1984.
12. STERNBERGER, L. A. — *Immunocytochemistry*. 2nd ed. New York, John Wiley and Sons, 1979. Chapter 5. p. 104-169.

Recebido para publicação em 28/6/1985.