

ASPECTOS ULTRA-ESTRUTURAIS DA FORMA EPIMASTIGOTA DO TRYPANOSOMA CRUZI EM MEIO LIT

Wanderley de Souza,* Noemia Grynberg ** e F. Nery-Guimarães **(1)

E feito um estudo da ultra-estrutura da forma epimastigota do Trypanosoma cruzi mantida em meio de cultivo acelular.

O núcleo das formas em divisão apresenta um aspecto homogêneo. Microtúbulos intranucleares são observados durante a divisão. No entanto, a membrana nuclear permanece íntegra.

O citoplasma apresenta-se com vacúolos de dimensões e aspectos variados.

Com o método do ácido periódico-tiosemicarbazida-proteinato de prata, polissacarídeos e/ou glicoproteínas foram localizados na membrana celular e na membrana que delimita certos vacúolos citoplasmáticos.

INTRODUÇÃO

A ultra-estrutura do *Trypanosoma cruzi* tem sido objeto de estudo por vários pesquisadores (3, 6, 7, 9, 11, 12, 13-19, 21, 24-28, 32). No entanto várias dúvidas ainda não foram completamente dissipadas quanto às características morfológicas e funcionais das várias estruturas celulares existentes neste protozoário.

A forma epimastigota do *T. cruzi* representa até o momento a única forma facilmente cultivável em meios acelulares o que permite a obtenção de grandes quantidades de parasitos facilitando a realização de estudos bioquímicos. Por este motivo escolhemos esta forma para realizarmos uma série de estudos citoquímicos com microscopia eletrônica, cujos resulta-

dos poderão ser correlacionados com dados de natureza bioquímica.

Neste trabalho descrevemos aspectos gerais da ultra-estrutura do *T. cruzi* crescendo em meio LIT, dando ênfase especial aos vacúolos citoplasmáticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo utilizamos a cepa Y (22) do *Trypanosoma cruzi* crescendo a 28°C em meio LIT (5).

Foram estudadas células de culturas com 3,5 e 7 dias de cultivo. As células foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato ou fosfato 0,1 M pH 7,4 durante 1-2 horas a 4°C ou a temperatura ambiente. Após fixação as células eram lavadas em tampão, pós-fixadas em OsO₄ 1%

* Laboratório de Microscopia Eletrônica, Instituto de Biofísica U.F.R.J., Cidade Universitária, Rio de Janeiro — RJ.

** Laboratório de Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro — RJ.

1 Lamentamos informar o falecimento do Prof. F. Nery-Guimarães em 15-4-1975. A sua amizade e a maneira com que se dedicava à investigação científica ficarão para sempre na memória de todos aqueles que com ele conviveram.

em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 durante 1 hora a 4°C, desidratadas em etanol ou acetona e incluídas em epon. Cortes ultrafinos foram obtidos com ultramicrótomo LKB Ultratome III e contrastados em citrato de chumbo e acetona de uranila. Para estudo citoquímico os cortes foram coletados em grades de ouro e submetidos ao método de Thiéry (30) tal como descrito em trabalhos anteriores (7-10). As telas foram examinadas com o microscópio eletrônico AEI, EM6-B.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características básicas apresentadas pela forma epimastigota do *T. cruzi* mantido em meio LIT são semelhantes às descritas anteriormente em outros estágios evolutivos deste protozoário (3, 6, 7, 9, 11, 12, 13-19, 21, 24-28, 32).

Apresenta um núcleo que se localiza na região central. No estado interfásico este núcleo apresenta uma estrutura semelhante àquela observada com as formas intracelulares (6). O material cromatínico se dispõe principalmente na periferia podendo no entanto ser encontrado na região central. O nucléolo ocupa uma posição central ou ligeiramente excêntrica (Fig. 1). O núcleo de uma célula em divisão, à semelhança do que ocorre com as formas esferomastigotas (amastigota, leishmania) observadas em cultura de tecidos (6), apresenta um aspecto uniforme, resultante da dispersão do material cromatínico e nucleolar (Fig. 2). Uma característica básica destes núcleos é a existência de microtúbulos que se dispõem longitudinalmente no sentido de alongamento do núcleo. No interior do núcleo se observam algumas estruturas eletrodensas cuja natureza ainda não está esclarecida (Fig. 2). Possivelmente representam fragmentos do nucléolo ou estruturas que correspondam a cromossomos. Estudos autoradiográficos, citoquímicos e digestão enzimática poderão esclarecer melhor a natureza desta estrutura.

Nem todos os perfis de núcleos que apresentam um aspecto uniforme (que utilizamos como critério para identificar uma célula em divisão) mostram microtúbulos intranucleares, devido a localização dos microtúbulos na parte central do núcleo. Tal fato torna-se bastante claro quando se examinam cortes seriados.

Uma outra característica importante na divisão do núcleo do *T. cruzi* é a ausência de centríolo ou placa eletrodensa nos polos do núcleo e a permanência da membrana nuclear. O mesmo ocorre com as formas intracelulares em cultura de tecidos (6) bem como em *T. rhodesiense* e *T. raiae* (31).

O cinetoplasto apresenta uma estrutura semelhante à descrita para formas intracelulares (Figs. 1 e 3). O flagelo apresenta um axonema típico e se caracteriza por apresentar uma estrutura paraflagelar constituída por filamentos dispostos em um arranjo regular, cujo papel funcional ainda não esclarecido.

A forma epimastigota apresenta um complexo de Golgi bastante evidente, sendo constituído por sáculos e vesículas que muitas vezes se dispõem de forma concêntrica (Fig. 4). Está localizado ao lado do cinetoplasto e próximo a região da bolsa flagelar e do citostomo tal como descrito anteriormente (18, 19). O citostomo representa uma estrutura especializada da superfície em que ocorre uma invaginação da membrana celular e dos microtúbulos subpeliculares (Fig. 3). Esta estrutura tem sido encontrada abrindo-se na região da bolsa flagelar ou antes da curvatura da membrana celular que dá origem à formação da bolsa flagelar. Em ambos os casos é nítida a sua relação topográfica com o complexo de Golgi. Admite-se que o citostomo esteja envolvido no processo de ingestão de material nutritivo. No caso das formas epimastigotas do *T. cruzi* as evidências são indiretas e se baseiam principalmente no fato de que vesículas pinocitóticas estão associadas a esta estrutura. Um estudo em que se utilizam traçadores deve ser realizado com o *T. cruzi* afim de esclarecer melhor o papel funcional desta estrutura. Com as formas intracelulares em cultura de tecidos demonstrou-se que o *T. cruzi* é capaz de ingerir elementos citoplasmáticos da célula hospedeira, como por exemplo grânulos de melanina que são estruturas com cerca de 0,7 µm. Esse fato sugere que o *T. cruzi* apresenta um processo de fagotrofia intracelular à semelhança do que ocorre com os parasitos da malária, na fase eritrocitária (18; 23).

Uma organela circular, delimitada por membrana e com uma matriz uniforme, é também encontrada na forma epimastigo-

ta do *T. cruzi*. Tal organela apresenta um diâmetro de aproximadamente $0,6 \mu\text{m}$. Seu aspecto é semelhante ao descrito em *T. brucei*, *T. equiperdum*, *Crithidia fasciculata*, *Herpertomonas muscarum* e *Leptomonas pessoai* como "peroxisome-like organelle" (1, 2, 4, 10, 20, 29). Estudos citoquímicos estão sendo realizados afim de esclarecer melhor a natureza desta estrutura.

No citoplasma do *T. cruzi* observa-se grande número de vacúolos, que apresentam dimensões variadas, sendo encontrados muitos com cerca de $07 \mu\text{m}$ de diâmetro. São delimitados por membrana e apresentam no seu interior áreas de grande eletrodensidade bem como áreas de de pouca eletrodensidade (Figs. 1 e 5). Também observamos outras estruturas com perfil circular, envolvidas por membrana e eletrodensas (Fig. 2, 4 e 5). Estruturas semelhantes foram descritas por Wery & Lasseel (32) como corpos multivesiculares. No entanto, nessas estruturas não se observou a presença de fosfatase ácida.

A natureza dessas estruturas ainda não está bem definida. Quando se aplica a técnica de Thiéry observa-se uma reação positiva em todo o sistema superficial de membranas, o que inclui a membrana que envolve o corpo, a região da bolsa flagelar e o flagelo. Tal resultado indica a presença de carboidratos constituintes do "cell coat" semelhante ao descrito para as formas em cultura de tecidos (7). No entan-

to observamos que a membrana que envolve os vacúolos acima referidos também apresenta uma reação positiva semelhante à observada na membrana celular (Fig. 6 e 7). Uma reação positiva foi também encontrada nas membranas que constituem o complexo de Golgi. É possível que os vacúolos representem uma estrutura formada por vesículas pinocitóticas que se fundem, a fim de formar um "food-vacuole" que posteriormente evolua para lisossomos. Estudos citoquímicos para detecção de fosfatase ácida bem como o uso de traçadores como ferritina e peroxidase estão sendo empregados afim de esclarecer a natureza e papel funcional destes vacúolos na forma epimastigota do *T. cruzi*.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr Raul Dodsworth Machado pela contribuição prestada durante a realização deste trabalho e preparo do manuscrito. Ao Sr. Antonio L. de Oliveira pelos auxílios e a Srta. Sandra C. de Carvalho pelo trabalho de datilografia.

Ao Conselho de Ensino Para Graduados da U.F.R.J., Conselho de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico (BNDE-Contrato Funtec-241) pelos auxílios concedidos ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biofísica — U.F.R.J.

SUMMARY

In this paper the fine structure of the epimastigotes forms of Trypanosoma cruzi maintained in an acellular culture medium, is described.

During division the nucleus shows a homogenous structure owing to the dispersion of its chromatin and nucleolar material. Microtubules similar to those of a mitotic spindle in metazoan cells appear, running from one pole to the other. During the whole process of division the nuclear membrane remains intact.

The cytoplasm shows many vacuoles. With the cytochemical method of acid periodic-thiosemicarbazide-silver proteinate, a polysaccharide surface coat is observed on the whole surface membrane system of T. cruzi. A positive reaction is also observed in the membranes of some vacuoles in the cytoplasm of the parasites.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAYNE, R. A., MUSE, K. E. & ROBERTS, J. F. — Regulation of oxidase enzyme systems in trypanosomes. *Comp. Biochem. Physiol* 30: 61-72, 1969.
2. BAYNE, R. A., MUSE, K. E. & ROBERTS, J. F. Isolation of bodies containing the cyanide-insensitive glycerol-phosphate oxidase of *Trypanosoma equiperdum*. *Comp. Biochem. Physiol*, 30: 1049-1054, 1969.
3. BRACK, C. — Elektronem mikroskopische Untersuchungen zum Lebenszyklus von *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 25: 289-356, 1968.
4. BRUN, R. — Ultrastruktur und Zyklus von *Herpetomonas muscarum*, *Herpetomonas mirabilis* und *Crithidia luciliae* in *Chrysomia chloropyga*. *Acta Trop.*, 31: 219-290, 1974.
5. CAMARGO, E. P. — Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Trop. São Paulo*, 6: 93-100 1964.
6. DE SOUZA, W. & MEYER, H. — On the fine structure of the nucleus in *Trypanosoma cruzi* in tissue culture forms. Spindle fibers in the dividing nucleus. *J. Protozool.* 21: 48-52, 1974.
7. DE SOUZA, W. & MEYER, H. — An Electron Microscopical and Cytochemical study of the cell coat of *Trypanosoma cruzi*, in tissue cultures. *Z. Parasitenk.*, 1975 "in press".
8. DE SOUZA, W. — Cytochemical detection of polysaccharides on the surface of Trypanosomatids. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1975 "in press".
9. DE SOUZA, W. — Associations membrane-microtubules chez *Trypanosoma cruzi*. *J. Microscopie*, "in press".
10. DE SOUZA, W., ROSSI, M. A., KITAJIMA, E. W., SANTOS, R. R. & ROITMAN, I. An Electron Microscopic of *Leptomonas pessoai* Submetido para publicação.
11. INOKI, S., OZEKI, Y. & KAMBARA, R. — Ultrastructural changes in the kinetoplast of *Trypanosoma cruzi* during transition of form in vitro. *Biken J.* 14: 37-50, 1971.
12. MARIA, T. A., TAFURI, W. & BRENER, Z. — The fine structure of different bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasit* 66: 423-431, 1972.
13. MEYER, H. & PORTER, K. R. — A study of *Trypanosoma cruzi* with the electron microscope. *Parasitology*, 44: 16-23, 1954.
14. MEYER, H., OLIVEIRA MUSACCHIO, M. & ANDRADE MENDONÇA, I. — Electron microscopic study of *Trypanosoma cruzi* in thin sections of infected tissue cultures and blood agar forms. *Parasitology* 48: 1-8, 1958.
15. MEYER, H. & QUEIROGA, L. T. — Submicroscopical aspects of *Schizotrypanum cruzi* in thin sections of tissue culture forms. *J. Protozool.* 7: 124-127, 1960.
16. MEYER, H. — The fine structure of the flagellum and kinetoplast chondriome of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in tissue culture. *J. Protozool.* 15s 614-621, 1978.
17. MEYER, H. — Further studies on the fine structure of the kinetoplast-chondriome of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in thin sections of infected tissue culture. *Rev. Inst. Trop. São Paulo* 11: 48-56, 1979.
18. MEYER, H. & DE SOUZA, W. — On the fine structure of *Trypanosoma cruzi* in tissue culture of pigment epithelium from the chick embryo. Uftake of melanin granules y the parasite. *J. Protozool.* 20: 590-593, 1973.
19. MILDER, R. & DEANE, M. P. — The cytostome of *Trypanosoma cruzi* and *T. conorrhini*. *J. Protozool.* 16: 730-737, 1969.
20. MUSE, K. E. & ROBERTS, J. F. — Microbodies in *Crithidia fascicula*, *Protoplasma* 78: 343-348, 1973.
21. OZEKI, Y., SOOKSRI, V., ONO, T. & INOKI, S. — Studies on the ultrastructure of kinetoplasts of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma gambiense* by autoradiography and enzymatic digestion. *Biken's J.* 14: 97-118, 1971.
22. PEREIRA DA SILVA, L. H. & NUSSENZWEIG, V. — Sobre uma cepa do *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol. São Paulo* 20: 191-201, 1953.
23. RUDZINSKA, M. A. & TRAGER, W. — Intracellular phagotrophy by malaria parasites: an electron microscope study of *Plasmodium lophurae*. *J. Protozool.* 4: 190-199, 1957.
24. SANABRIA, A. — Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* in mouse myocardium. I. Trypanosome form. *Exp. Parasit.* 14: 81-91, 1963.
25. SANABRIA, A. — The Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. II. Crithidial and Leishmanial forms. *Exp. Parasit.* 15: 125-137, 1964.

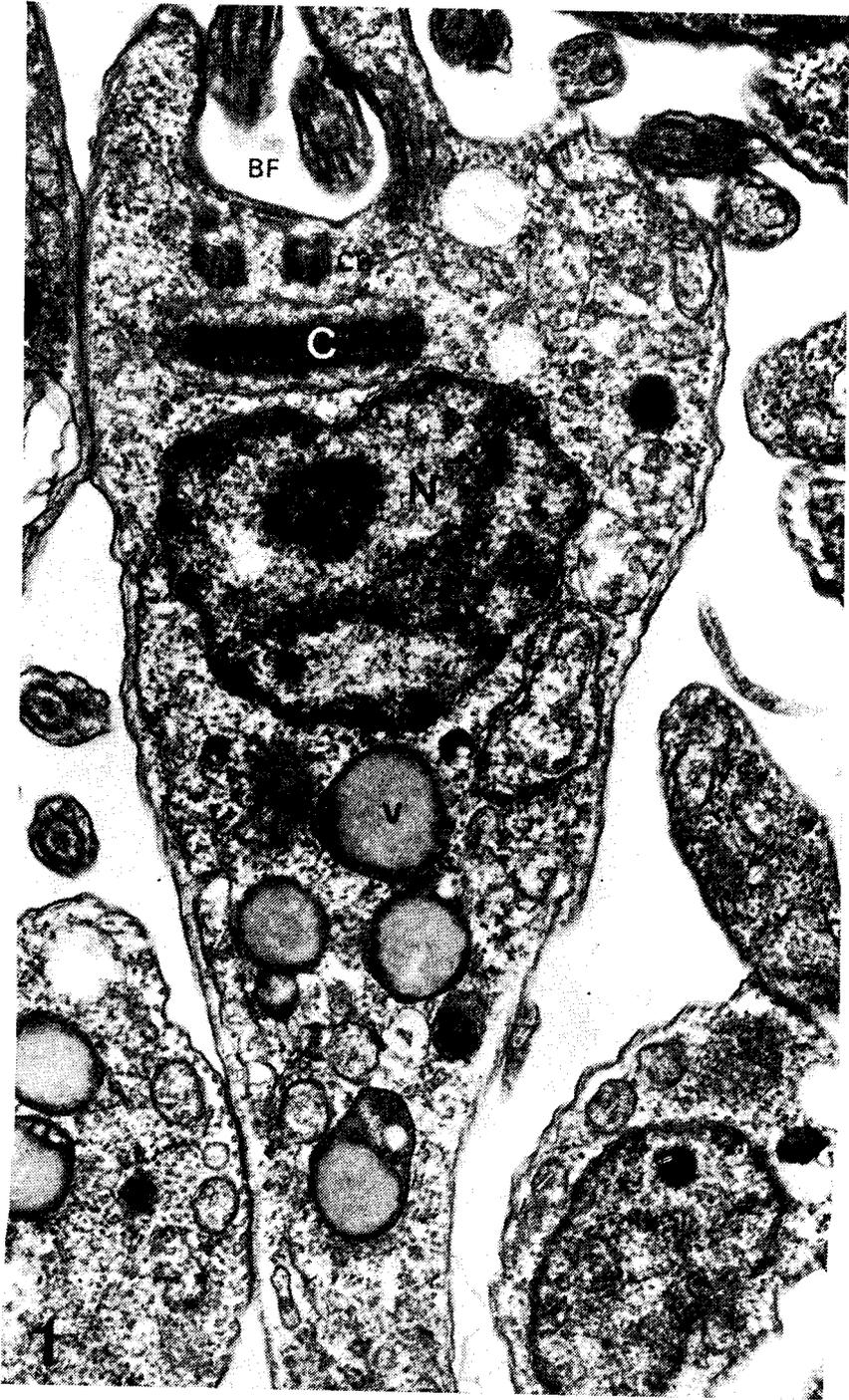
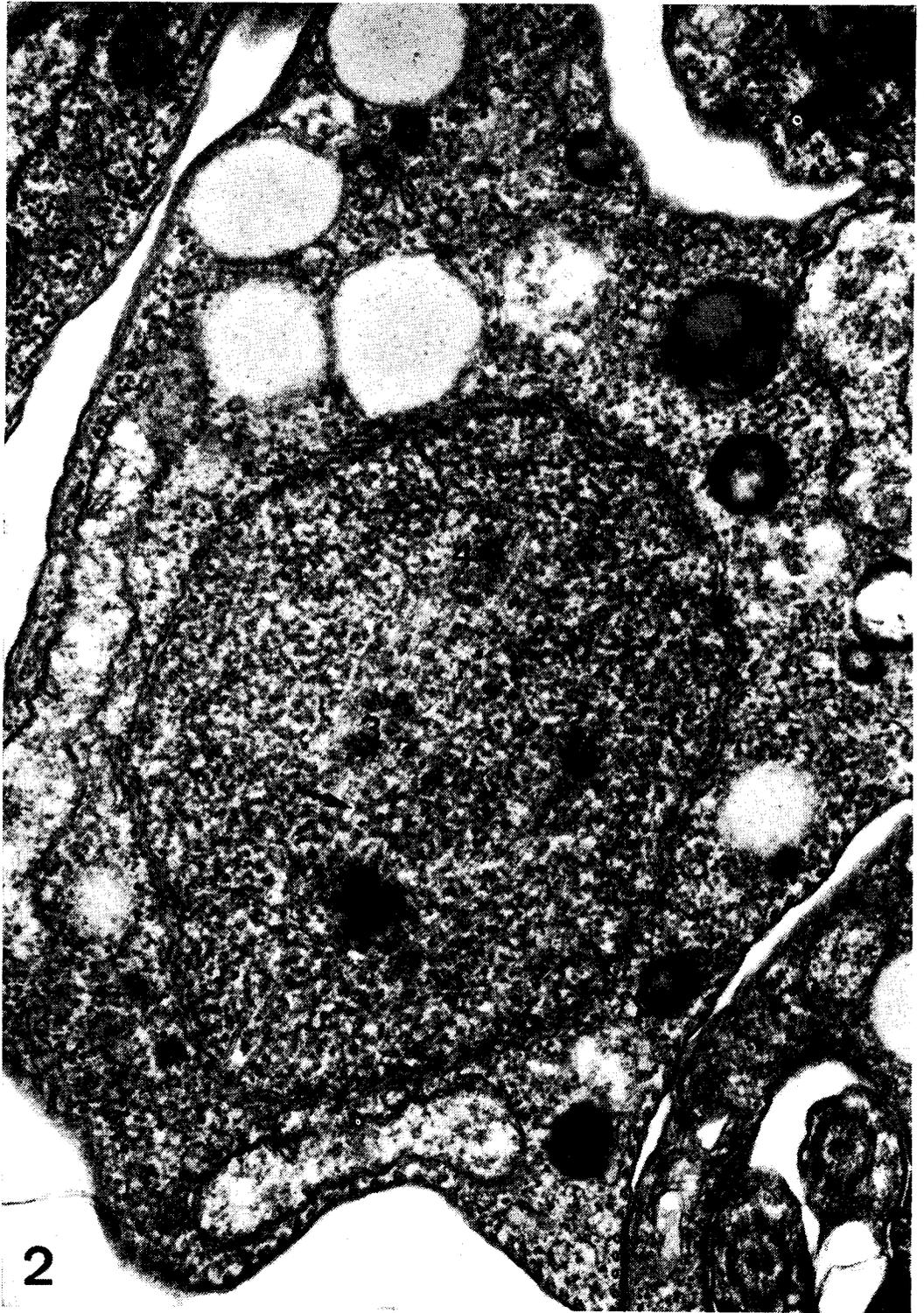
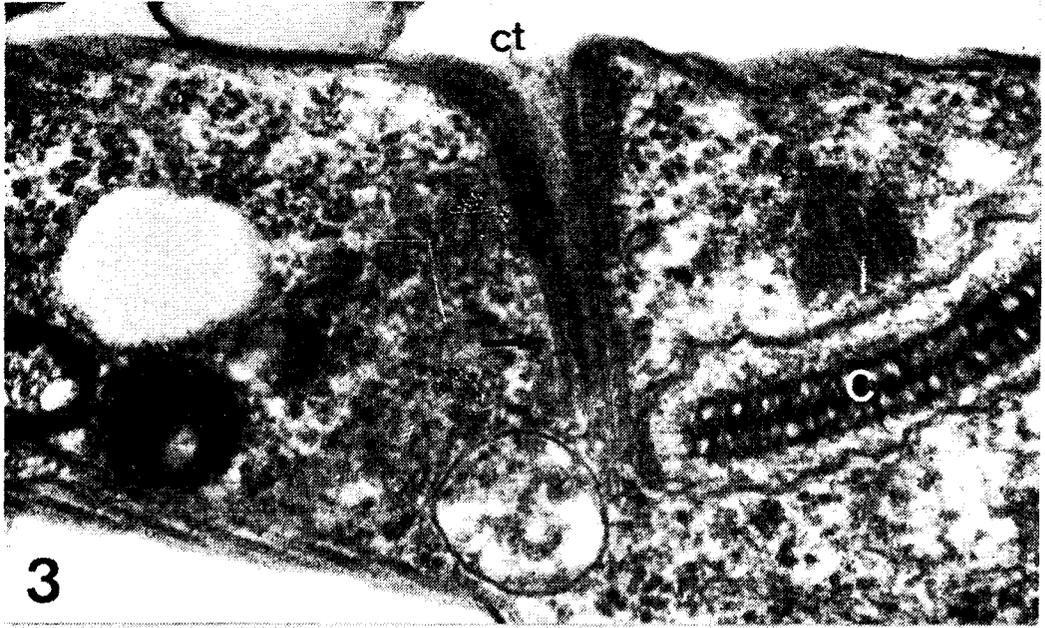


Fig. 1 — Epimastigota do *T. cruzi*. Observa-se o núcleo (N) de uma forma interfásica, contendo cromatina e o nucléolo (NU). O cinetoplasto (C), parte do corpúsculo basal (CB) bem como a região da bolsa flagelar (BF) são observadas. Junto a núcleo e observaram vacúolos com vários aspectos (V). Microtúbulos são observados tanto em corte transversal como longitudinal.
X 10.000



2

Fig. 2 — Parte de uma célula em divisão. O núcleo apresenta um aspecto uniforme. O material cromatinico e nucleolar não se encontra organizado. A membrana nuclear permanece integra. No interior do núcleo observa-se a presença de microtúbulos (seta) bem como 4 massas eletrodensas (1-4).
X 45.000



3

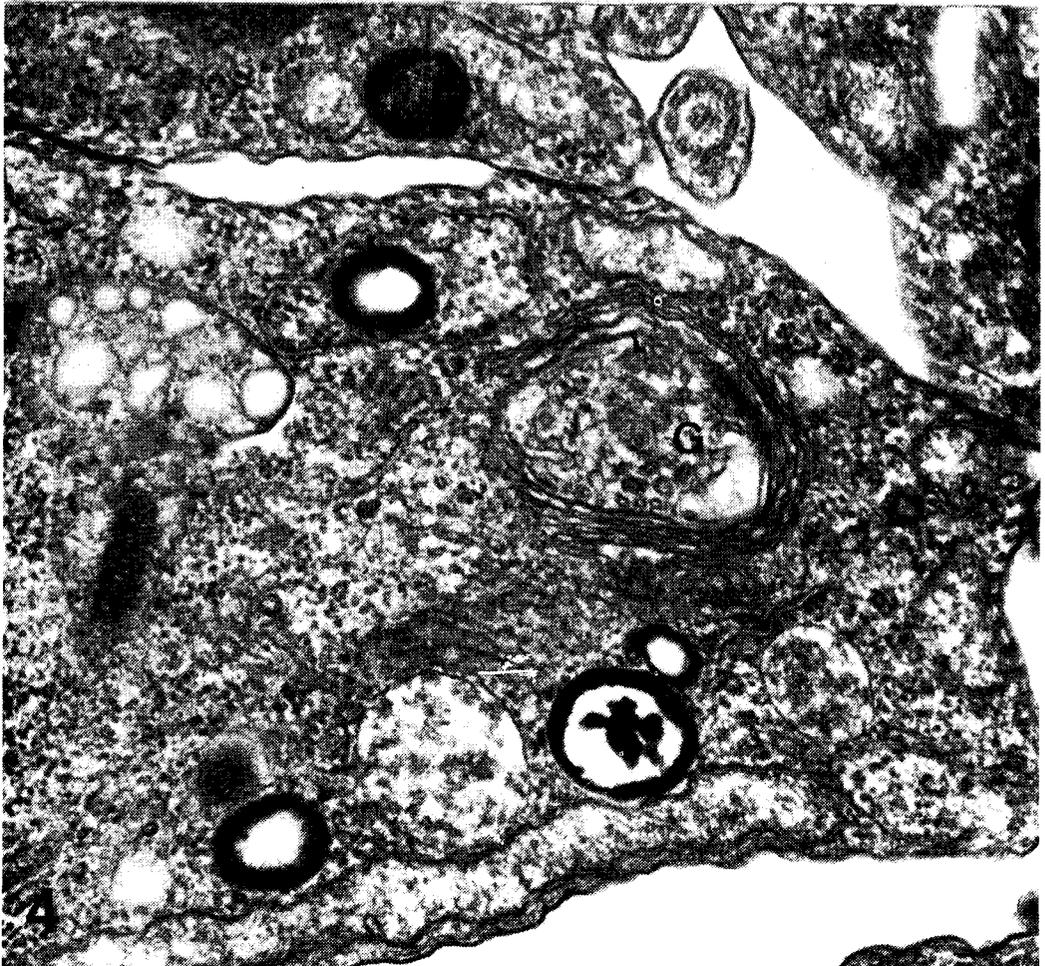


Fig. 3 — Detalle do citostemo (CT). Corresponde a uma invaginação da membrana celular e dos microtúbulos subpeliculares (seta). Também se observa o corpúsculo basal (CB) e parte do cinetoplasto (C).
X 60.000

Fig. 4 — Parte do citoplasma mostrando a região do complexo de Golgi (G) que apresenta um aspecto concêntrico. Observam-se os sáculos e vesículas constituintes desta estrutura.
X 45.000

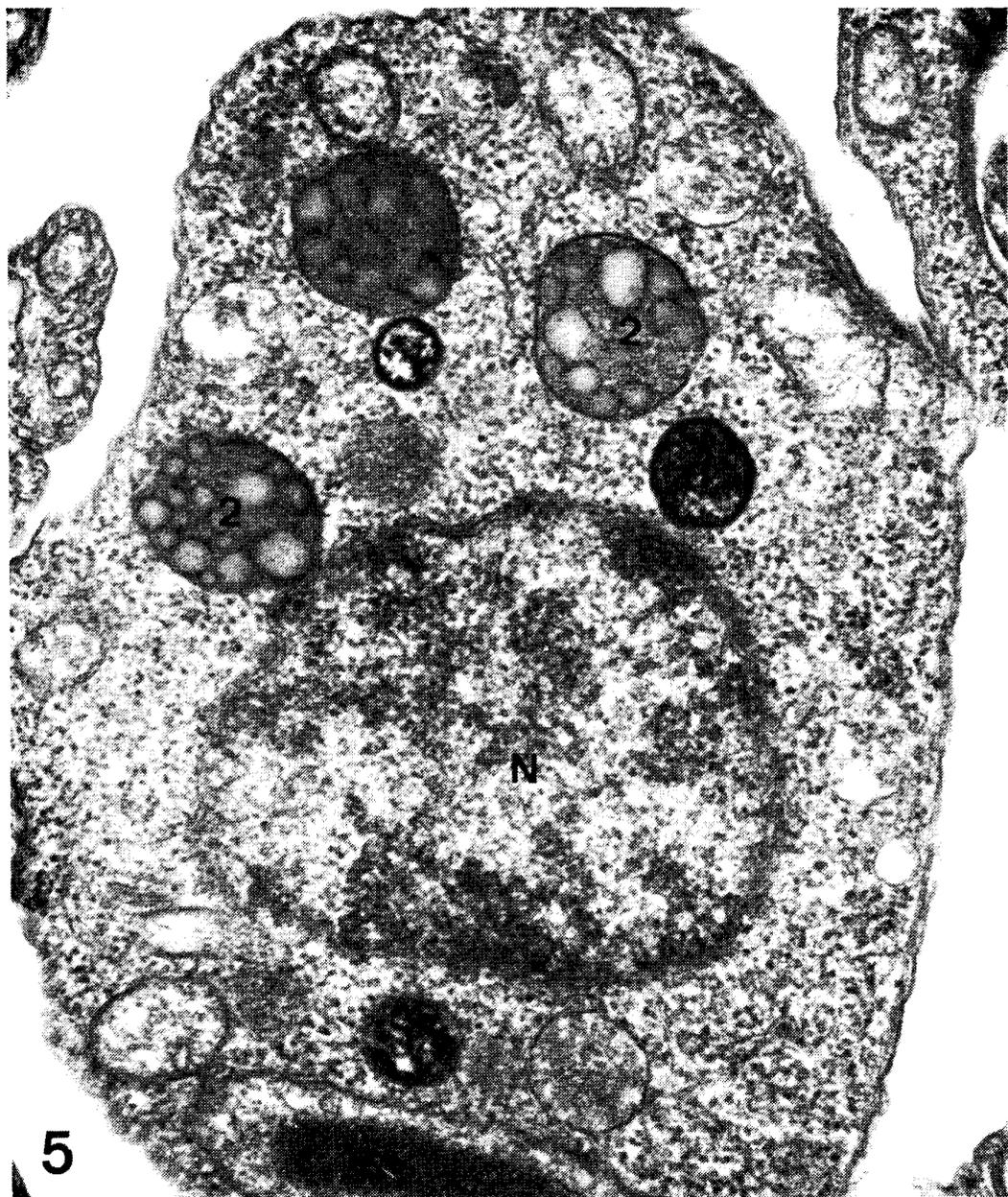


Fig. 5 — Parte do citoplasma mostrando o núcleo (N) bem como alguns vaciúólos. Estes podem ser eletrdensos (1) ou de estrutura mais complexa (2).
X 45.000

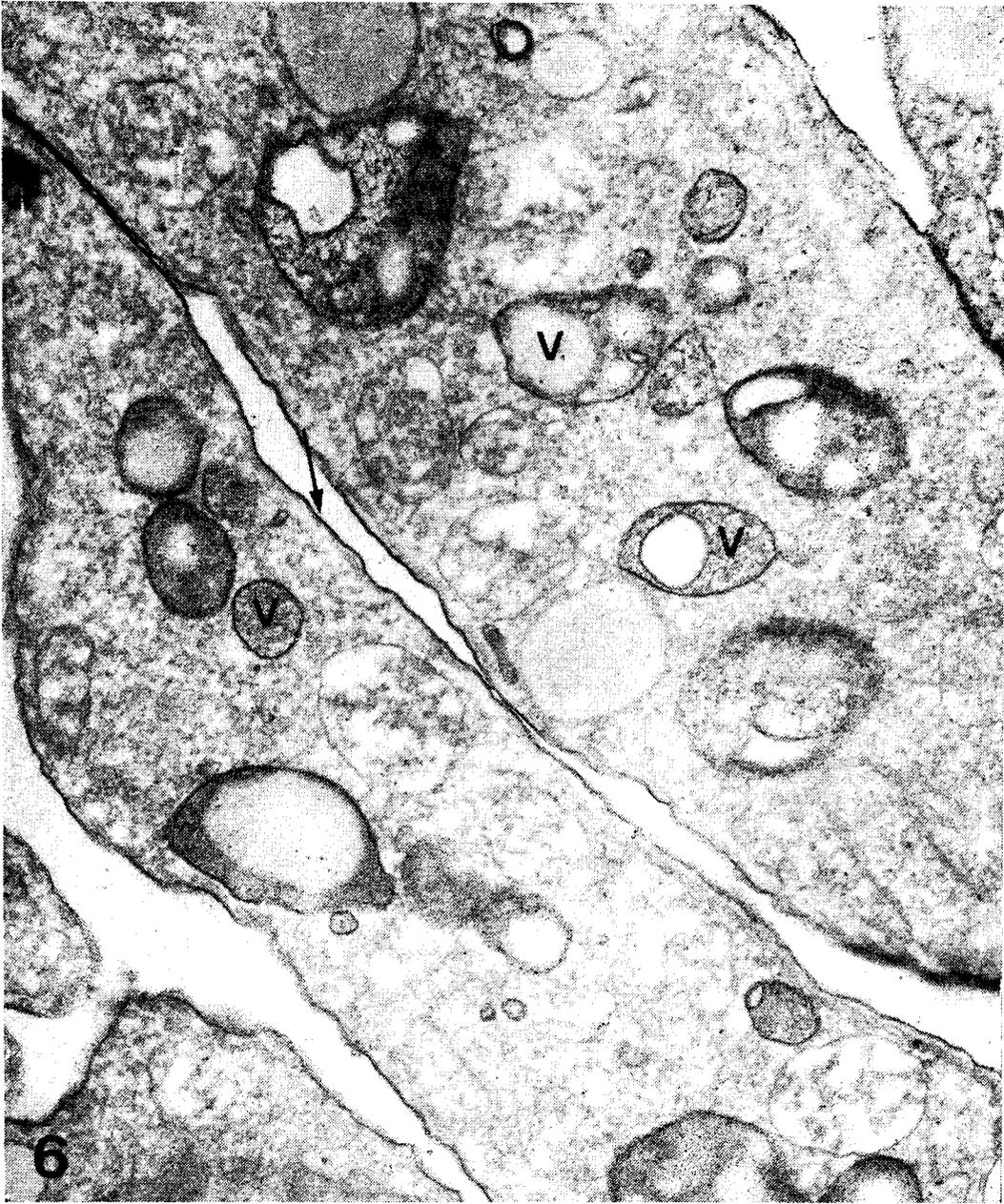


Fig. 6 — Corte não contrastado pelo acetado de uranila ou citrato de chumbo. Submetido ao método de Thiéry com incubação durante 78 hs em tiossemicarbazida. Uma reação positiva é observada na membrana celular (seta) bem como na membrana de determinados vacúolos citoplasmáticos (V).
X 45.000



Fig. 7 — Corte não contrastado pelo acetado de uranila ou citrato de chumbo. Submetido ao método de Thiéry com incubação durante 48 hs em tiosemicarbazida. Uma reação positiva é observada na membrana celular (seta) bem como na membrana de determinados vacúolos citoplasmáticos (V). Pequenas vesículas localizadas na superfície celular (Ve) também reagem positivamente à reação.
X 60.000

26. SANABRIA, A. — Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* in mouse brain. *Exp. Parasit.* 23: 379-391, 1969.
27. SANABRIA, A. — Nuevos estudios acerca de la ultrastructure del *Trypanosoma cruzi* en el miocardio del raton. *Acta Cient. Venezolana* 21: 107-118, 1970.
28. SCHULZ H. & MACCLURE. E. — Elektronenmikroskopische Untersuchungen des *Trypanosoma cruzi* mit besonderer Berücksichtigung des periplasten und des Blepharoplasten. *Z. Zellforsch.* 55: 389-412, 1961.
29. STEIGER, R. F. — On the ultrastructure of *Trypanosoma* (*Trypanozoon*) *brucei* in the course of its life cycle and some related aspects. *Acta Tropica* 30: 64-168, 1973.
30. THIÉRY, J. P. — Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie electronique. *J. Microscopie* 6: 987-1018, 1967.
31. VICKERMAN, K & PRESTON, T. M. — Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes. *J. Cell Sci.* 6: 365-383, 1970.
32. WÉRY, M. & DE GROODT-LASSEEL, M. — Ultrastructure de *Trypanosoma cruzi* en culture sur milieu semi-synthétique. *Ann Soc. belge Méd. Trop.* 46: 337-348, 1966