

MODIFICAÇÕES NUCLEARES EM CÉLULAS PARASITADAS PELO *TRYPANOSOMA CRUZI* EM CHAGÁSICOS CRÔNICOS

Hipólito de Oliveira Almeida, Vicente de Paula Antunes Teixeira, Marlene Antonia dos Reis, José Umberto Franciscan e Elizabeth Martins

*Através do estudo da musculatura-lisa da parede da veia central das supra-renais de chagásicos crônicos foram identificados núcleos em 18 dentre 40 células parasitadas pelo Trypanosoma cruzi. Com o auxílio de uma ocular micrométrica foram tomados dois diâmetros de cada ninho e núcleo, obtendo-se suas médias e desvios padrões ($25,7 \mu\text{m} \pm 17,2$ e $12 \mu\text{m} \pm 5,3$ e $7,5 \mu\text{m} \pm 2,82$ para diâmetros dos ninhos e dos núcleos para células mononucleadas e binucleadas respectivamente). A relação diâmetro do núcleo/diâmetro do ninho foi de $0,5 \pm 0,16$. 83,3% dos ninhos eram mononucleados e apenas 16,7% binucleados. A média do volume nuclear para as células parasitadas foi de $1204 \mu\text{m}^3 \pm 807,0$ e para as células musculares lisas não parasitadas foi de $69,6 \mu\text{m}^3 \pm 7,2$. A forma e o contorno nucleares eram variados e irregulares. Os núcleos hiper-cromáticos ou vesiculosos, com membrana cromatinica geralmente espessa e bem definida, freqüentemente mostrando um a dois nucléolos por seção, podendo, no entanto, serem encontrados até 8 nucléolos. Sendo as alterações nucleares descritas freqüentes nos chagásicos crônicos, é possível que sejam a expressão morfológica de importantes interações entre o *T. cruzi* e o leiomiócito.*

Palavras chaves: Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. Supra-renal. Núcleo celular. Célula muscular lisa.

Núcleos volumosos em células parasitadas pelo *T. cruzi* foram descritos em casos de transmissão congênita da doença de Chagas por Rubio⁶, Rubio e Howard^{7,8} no esôfago, sendo considerada uma peculiaridade das células fetais⁷. Entretanto, há poucos anos, quando começávamos a estudar as supra-renais de chagásicos crônicos, tivemos a oportunidade de descrever, em 3 chagásicos adultos, ninhos de amastigotas na camada muscular da veia da medular que apresentavam alterações nucleares muito semelhantes àquelas observadas no esôfago de casos congênitos da Tripanosomose americana¹. Na época chamamos a atenção para a possibilidade de que o melhor conhecimento do fenômeno poderia auxiliar no entendimento de particularidades da relação hospedeiro-parasita, com potencial importância para o controle do parasitismo. Como não foram feitos estudos morfológicos sistematizados sobre o assunto, o que consideramos ponto de partida para outras abordagens e dispondo de apreciável número de ninhos de amastigotas do *T. cruzi* cujos núcleos são visivelmente alterados, procuramos descrevê-los, ampliando nossas observações anteriores.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados os núcleos encontrados em 18 dentre 40 células parasitadas pelo *T. cruzi*,

observadas na musculatura lisa da veia da medular das supra-renais de 8 chagásicos crônicos. Para a pesquisa de parasitas na veia da medular das supra-renais temos feito cortes seriados que são corados pela hematoxilina-eosina e analisados ao microscópio. Deste estudo preliminar, as lâminas e os locais dos preparados histológicos que apresentam células parasitadas, cujos núcleos estão presentes, são marcados. As características de cada núcleo eram descritas e dois diâmetros perpendiculares do ninho e de cada um de seus núcleos e/ou lobos nucleares (quando existentes) eram medidos com auxílio de uma ocular micrométrica. A partir destes valores foi calculada a média e desvio padrão para os diâmetros dos ninhos e dos núcleos. A partir dos dois diâmetros de cada ninho e de seu núcleo era obtida a relação diâmetro nuclear/diâmetro do ninho. Quando binucleado o ninho, esta relação era calculada a partir do seu diâmetro médio e da soma dos diâmetros médios de seus núcleos. Baseado na forma de cada núcleo e nos seus diâmetros, calculou-se o seu volume aproximado; quando duplo, lobulado ou irregular, calculava-se o volume das partes de acordo com sua semelhança às figuras geométricas, sendo a estimativa do volume nuclear obtida pela soma dos valores das partes. Para comparação, tomamos dois diâmetros perpendiculares dos núcleos de células musculares lisas em cortes transversais e em cortes longitudinais, nos mesmos segmentos venosos onde se alojavam as células parasitadas pelo *T. cruzi*. A partir dos diâmetros, calculamos para cada célula muscular não parasitada, vista em corte longitudinal, o volume nuclear, considerando-o um cilindro; deste valor individual foi

Disciplina de Patologia Geral e de Parasitologia da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro. Praça Manoel Terra s/n. 38100 Uberaba-MG.

Recebido para publicação em 9/9/85.

calculada a média e desvio padrão dos volumes nucleares das células normais.

RESULTADOS

De um total de 40 células parasitadas (ninhos de *T. cruzi*) vistas na musculatura lisa da veia da medular das supra-renais, observamos 18(45%) com núcleos, sendo 15(83,3%) com apenas um núcleo e 3(16,7%) com dois núcleos. As médias e os desvios padrões dos diâmetros das células parasitadas (ninhos), dos seus núcleos e dos núcleos das células musculares lisas não parasitadas, estão na Tabela 1. O teste t de Student mostrou que apenas as diferenças entre os diâmetros dos núcleos das células normais em cortes transversais e das células parasitadas mono e binucleadas são altamente significativas ($t = 6,12, P < 0,01$) e significativas ($t = 2,36, P < 0,05$). A Tabela 2 mostra as médias e desvios padrões dos volumes nucleares aproximados das células musculares parasitadas e das células musculares lisas normais, sendo altamente

significativas as diferenças observadas ($t = 5,8, P < 0,01$). O coeficiente de correlação de Pearson calculado para os diâmetros dos ninhos e seus núcleos foi de 0,79 ($P < 0,01$). Os núcleos das células parasitadas (Fig. 1, 2, 3 e 4), além de volumosos, mostravam contorno irregular com angulações, saliências, bocelações e sulcos ou clivos. Apesar de irregularidade dos núcleos, pode-se dizer que se aproximavam grosseiramente das seguintes formas: oval (6 vezes), arredondado (4 vezes), retangular (2 vezes), fusiforme (2 vezes), lobulado (2 vezes), triangular (1 vez), quadrangular (1 vez), piriforme (1 vez) e muito irregular (2 vezes). Frequentemente mostravam cromatina condensada na periferia formando uma membrana cromatinica bem marcada, às vezes de espessura irregular. O restante do espaço nuclear pode ser de baixa afinidade tintorial, às vezes bastante claro, outras sendo preenchido por grumos e filamentos grosseiros com grande afinidade pela hematoxilina, podendo ainda ser homoganeamente hiperromático. A maioria dos núcleos mostrava de um, dois, até oito nucléolos, quase sempre

Tabela 1 – Média e desvio padrão dos diâmetros das células parasitadas (dois diâmetros para cada célula), dos diâmetros dos seus núcleos e dos núcleos das células musculares lisas não parasitadas (dois diâmetros para cada núcleo) e da relação entre o diâmetro médio do núcleo e da célula parasitada.

	Nº de Células	Nº de Medidas	Média em Micrômetro	Desvio Padrão
Diâmetro dos núcleos das células musculares lisas não parasitadas em cortes transversais	10	20	3,0	±0,05
Diâmetro dos núcleos das células musculares não parasitadas em cortes longitudinais	20	40	10,4	±0,6
Diâmetro das células parasitadas	18	36	25,7	±17,2
Diâmetro dos núcleos das células parasitadas quando únicos por célula	15	30	12,0	±5,3
Diâmetro dos núcleos das células parasitadas quando binucleadas	3	12	7,5	±2,8
Relação diâmetro nuclear/diâmetro celular para as células parasitadas	18	18	0,5	±0,16

Tabela 2 – Volume nuclear aproximado calculado para células musculares lisas parasitadas (em cortes longitudinais) e parasitadas pelo *Trypanosoma cruzi*, na parede da veia central das supra-renais de chagásicos crônicos.

	Nº de Células	Média em micrômetros ³	Desvio Padrão
Volume nuclear das células musculares lisas não parasitadas em cortes longitudinais	20	69,6	± 7,2
Volume nuclear das células parasitadas	18	1204,7	±807,0

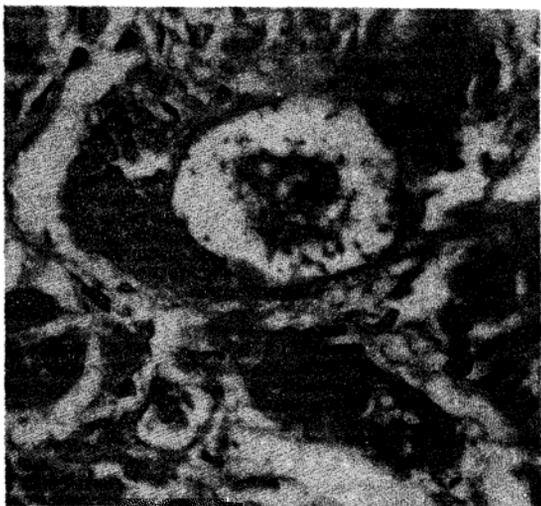


Fig. 1 – Musculatura lisa da veia da supra-renal de chagásico crônico – Observa-se uma célula parasitada apresentando núcleo volumoso, de contorno irregular. O citoplasma é claro e contém poucas formas amastigotas. Hematoxilina-eosina, x400.



Fig. 3 – Célula parasitada na muscular da veia da supra-renal de chagásico crônico. O citoplasma está parcialmente retraído, contendo poucas amastigotas (setas). São vistos dois núcleos hiper cromáticos. Hematoxilina-eosina, x 1000.

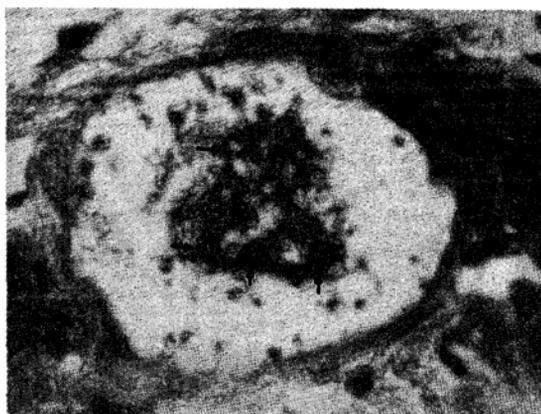


Fig. 2 – Detalhe da figura anterior – Observar o núcleo gigante, atípico, com vários nucléolos (setas). Hematoxilina-eosina, x1000.



Fig. 4 – Célula parasitada na musculatura da veia da supra-renal de chagásico crônico – Os parasitas são mais numerosos e o núcleo é volumoso, homogeneamente corado e sem limites nítidos, sugerindo alterações regressivas do mesmo. Hematoxilina-eosina, x1000.

volumosos, às vezes contendo material acidófilo. As células musculares lisas não parasitadas, quando em cortes transversais, têm núcleos com secção circular ao passo que seus cortes longitudinais exibem núcleos bastante longos (entre 15 e 20 micrômetros) com diâmetro transversal semelhante aos vistos em cortes longitudinais, permitindo considerá-los cilíndricos.

DISCUSSÃO

O presente estudo confirma e amplia observações anteriores, realizadas em nosso laboratório,

sobre modificações nucleares em células parasitadas pelo *T. cruzi*, nas supra-renais de chagásicos crônicos¹. Ao analisar 40 ninhos do *T. cruzi* na parede da veia da medular das supra-renais destes chagásicos, encontramos núcleos em 18(45%) deles, todos atípicos, bem mais volumosos que nas células musculares não parasitadas. Esta frequência nos permite afirmar que as modificações nucleares não representam uma característica das células fetais, como admitiram Rubio e Howard⁷.

Não há uma forma nuclear constante, sendo esta geralmente atípica, aproximando com frequência

do aspecto ovoides ou arredondado e, menos frequentemente, do triangular, retangular ou piriforme, podendo ainda o núcleo ser muito irregular e lobulado. A cromatina pode ser condensada na periferia, sendo o resto do núcleo claro contendo de um até 8 nucléolos, ou ser formada por grumos e filamentos grosseiros, distribuídos por todo o núcleo, mostrando um padrão de organização do material genético bastante diverso do observado nas células normais. Mais raramente o núcleo é de aspecto homoganeamente hiperchromático, semelhante aos picnóticos, o que poderia representar a morte da célula hospedeira e provável interrupção do ciclo intracelular do parasitismo.

Embora na maioria (82,3%) das células parasitadas o núcleo seja único, algumas podem ser binucleadas (16,7%). Quando únicos, têm um diâmetro médio de quase o dobro dos núcleos duplos ($12 \pm 5,3$ e $7,5 \pm 2,8$ micrômetros respectivamente) sendo ambos os valores significativamente superiores à média dos diâmetros nucleares das células não parasitadas vistas em cortes transversais. Como as células normais têm um núcleo muito alongado e estreito e as células parasitadas têm núcleos e diâmetros pouco diferentes, a comparação dos diâmetros dos núcleos das células normais em cortes longitudinais com os diâmetros das células parasitadas não mostra diferenças significativas ($P > 0,05$). Os maiores valores dos desvios padrões das médias dos diâmetros dos núcleos das células parasitadas mono e binucleadas quando comparadas às normais se explicam pela grande variação do tamanho dos núcleos das primeiras o que, provavelmente estaria associado à evolução do parasitismo intracelular. Por outro lado, o aumento do diâmetro nuclear guarda boa correlação com o aumento de diâmetro do ninho, como o demonstram o coeficiente de correlação de Pearson relativamente alto ($r = 0,79$, $P < 0,01$) e o baixo desvio padrão da média da relação diâmetro nuclear/diâmetro do ninho. O volume nuclear aproximado, calculado para os ninhos, foi muito superior (quase 20 vezes) ao das células musculares lisas não parasitadas da parede venosa ($P < 0,01$). Fizemos a comparação das células parasitadas com as musculares lisas normais, porque em estudos anteriores^{1,9} colhemos dados bastante convincentes de que as células parasitadas da veia suprarrenal são leiomiócitos. Estão sempre na intimidade dos fascículos musculares da veia, jamais entre as células do conjuntivo peri e interfascicular; em algumas células com núcleos atípicos gigantes, podem ser observados feixes de miofibrilas. Recentemente, estudando ao microscópio eletrônico células parasitadas da veia umbilical na doença de Chagas congênita, com características semelhantes às que descrevemos na veia suprarrenal, Lana⁵ constatou sua natureza muscular. Aliás, Barbosa Jr. e Andrade⁴ ao estudarem células parasitadas pelo *T. cruzi* no tubo digestivo e na veia da

medular das supra-renais de chagásicos crônicos, são taxativos em admitirem sua natureza muscular.

Embora algumas das alterações nucleares observadas nos tecidos fetais e na veia das supra-renais de chagásicos crônicos adultos possam ser consideradas apenas um efeito colateral do parasitismo intracelular, a hipertrofia nuclear e a freqüente presença de nucléolos, às vezes numerosos, sugerem intensa atividade nuclear e produção de RNA ribossômico, induzidas pelo parasitismo, devendo desempenhar importante papel no ciclo de reprodução e diferenciação que o *T. cruzi* realiza no interior das células musculares lisas do hospedeiro vertebrado. Como o *T. cruzi* continua participando da gênese da inflamação no miocárdio de chagásicos crônicos³ e a veia da medular das supra-renais parece ser uma espécie de reservatório do parasita de onde o mesmo pode ser liberado periodicamente e assim perpetuar a agressão a outros órgãos², o esclarecimento de todos os detalhes desta relação tem potencial importância na busca de caminhos terapêuticos mais eficazes para a fase crônica da doença de Chagas.

SUMMARY

By the study of histological sections of smooth muscle in the wall of the adrenal vein in human chronic Chagas' disease 18 nuclei were identified in 40 cells parasitized by T. cruzi. With an ocular micrometer two diameters of each nest and their nucleus were taken, obtaining their mean size and standard deviation (SD) ($25.7 \mu\text{m} \pm 17.2$ for nest diameters and $12 \mu\text{m} \pm 5.3$ and $7.5 \mu\text{m} \pm 2.82$ for the nuclear diameters of the mononucleated and binucleated cells respectively). The relation nucleus diameter/nest diameter was 0.5 ± 0.16 . 83.3% of the nests had one nucleus and 16.7% were binucleated. The mean nuclear volume of the parasitized cells was $1204 \mu\text{m}^3 \pm 807.0$ and of the non parasitized smooth muscle cells was $69.6 \mu\text{m}^3 \pm 7.2$. Nuclear form and outline were varied and irregular. Hyperchromatic or vesicular nuclei, with a large and well defined chromatinic membrane usually show in cells one or two nucleoli per section but this number can reach 8 nucleoli. These nuclear alterations frequently seen in the wall of the adrenal vein of chagasic patients could be significant in the intracellular cycle of T. cruzi in the leiomyocyte.

Key words: Chagas' disease. *Trypanosoma cruzi*. Adrenal gland. Nucleus. Smooth muscle cell.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almeida HO, Teixeira VPA, Oliveira ACF. Alterações nucleares em células parasitadas pelo *T. cruzi*. *Revista de Patologia Tropical* 10:15-20, 1981.

2. Almeida HO, Teixeira VPA, Oliveira ACF. Flebite com parasitismo em supra-renais de chagásicos crônicos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 36:341-344, 1981.
3. Almeida HO, Teixeira VPA, Gobbi H, Rocha A, Brandão MC. Inflamação associada a células musculares cardíacas parasitadas pelo *Trypanosoma cruzi*, em chagásicos crônicos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 42:183-186, 1984.
4. Barbosa Jr AA, Andrade ZA. Identificação do *Trypanosoma cruzi* nos tecidos extracardíacos de portadores de miocardite crônica chagásica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 17:123-126, 1984.
5. Lana AMA. Estudo morfológico da placenta na Doença de Chagas materna. Contribuição da imunocitoquímica e da microscopia eletrônica. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1986.
6. Rubio M. Compromiso del esofago en dos casos de enfermedad de Chagas congênita. *Bolletín Chileno de Parasitología* 23:157-163, 1968.
7. Rubio M, Howard J. Observación de células gigantes parasitadas por *Trypanosoma cruzi* en niños con enfermedad de Chagas congênita. *Biologica* 34:50-60, 1963.
8. Rubio M, Howard J. Congenital Chagas' disease. II - Pathological findings in nine cases. *Bolletín Chileno de Parasitología* 23:113-120, 1968.
9. Teixeira VPA. Parasitismo da veia central da supra-renal em diferentes formas anátomo-clínicas da Doença de Chagas. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1985.