

CARACTERÍSTICAS DAS CÉLULAS PARASITADAS PELO *TRYPANOSOMA CRUZI* NA PAREDE DA VEIA CENTRAL DAS SUPRA-RENAIS DE CHAGÁSICOS CRÔNICOS

Hipolito de Oliveira Almeida, Elizabeth Martins, José Umberto Franciscon, Vicente de Paula Antunes Teixeira, Alfredo José Afonso Barbosa, Helenice Gobbi e Marlene Antonia dos Reis

Foram analisados os aspectos das células musculares parasitadas pelo Trypanosoma cruzi, na veia da supra-renal de chagásicos crônicos, através de exame ao microscópio óptico de lâminas coradas pela hematoxilina-eosina (HE), PAS, Feulgen e peroxidase-antiperoxidase (PAP) para antígenos do T. cruzi. Além das modificações nucleares descritas anteriormente, os leiomiócitos parasitados exibem alterações citoplasmáticas que podem ser vistas mesmo em células que albergam poucos parasitas. As formas amastigotas geralmente estão envoltas por halo claro e o citoplasma restante adquire aspecto granuloso ou reticular, basófilo pelo HE, sendo sempre PAS e Feulgen negativos. Estes dados sugerem que o material basófilo no citoplasma deve ser RNA ribossômico. A periferia dos ninhos que mostram uma "membrana" com reação do PAP para antígenos do T. cruzi fortemente positiva, poderia ser devida a reação cruzada de material celular rechaçado para a periferia ou a difusão de antígenos do T. cruzi e sua adsorção à periferia celular. O material citoplasmático PAP positivo poderia resultar de artefato, de reação imunocitoquímica cruzada, de antígenos tripanossomóticos difundidos ou de antígenos tripanossoma-símile resultantes de interações entre o leiomiócito e o parasita.

Palavras chaves: *Trypanosoma cruzi*. Doença de Chagas. Músculo liso. Supra-renal. Veia central da supra-renal.

Há alguns anos iniciamos estudos que nos permitiram concluir ser a veia central das supra-renais uma importante sede de parasitismo nos chagásicos crônicos^{3 14}. Neste local observam-se com frequência, modificações nucleares nas células parasitadas^{4 5}, semelhantes às descritas por Rubio e Howard¹³ em casos humanos congêntos da tripanossomose e por Torres e Azevedo¹⁵ no tatu ("armadillo") infectado pelo *T. cruzi*. Acreditamos que uma exploração mais minuciosa destas células poderá contribuir para o melhor conhecimento da fase intracelular do ciclo biológico do parasita no chagásico crônico. No presente trabalho tentamos analisar os aspectos morfológicos e algumas características histoquímicas do citoplasma de leiomiócitos da veia supra-renal, parasitados pelo *T. cruzi*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 40 secções de células parasitadas pelo *T. cruzi* na veia da medula das supra-renais de 8 chagásicos crônicos, coradas pela hemato-

xilina-eosina (HE), 20 secções de células semelhantes, coradas pelo Feulgen e outras 20 pela técnica imunocitoquímica da peroxidase-antiperoxidase (PAP), de acordo com a padronização seguida por Barbosa⁶ e Barbosa e cols⁷. Este material foi obtido através de seleção preliminar que obedecia à seguinte padronização: as supra-renais de chagásicos crônicos eram fixadas em solução de formaldeído a 4%, a seguir recortadas em vários fragmentos que eram incluídos em parafina e submetidos à microtomia seriada, sendo os cortes numerados, corando-se inicialmente pela hematoxilina-eosina apenas os números ímpares ou apenas os números pares. Nestes, era feita a procura de ninhos cujos locais eram marcados para estudo posterior. Algumas lâminas não coradas pela hematoxilina-eosina, próximas daquelas que apresentavam ninhos, eram coradas pelo método de Feulgen para DNA e outras pela técnica do PAP ou PAS. A seleção dos chagásicos crônicos era feita baseando-se nos achados anatômicos, associados às reações de imunofluorescência e de fixação do complemento positivas para *T. cruzi*.

RESULTADOS

Em dois casos o número de células musculares lisas parasitadas pelo *T. cruzi* na veia da supra-renal era grande, sendo fácil o encontro de mais de 10 ninhos

Disciplinas de Patologia Geral e de Parasitologia da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro (Uberaba) e de Anatomia Patológica da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte).

Recebido para publicação em 3/1/1986.

por secção transversa da veia em cada lâmina; nos demais encontrava-se um a 4 ninhos por caso. Nos casos com parasitismo mais abundante pudemos identificar células cuja secção mostrava de um a três parasitas envoltos por halos claros, situados periféricamente no citoplasma (Fig. 1). Este, em sua maior extensão,

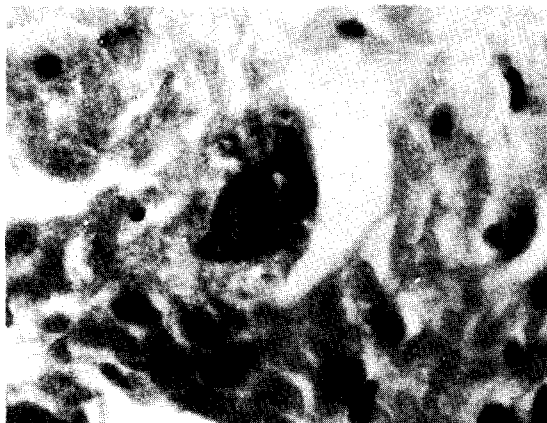


Fig. 1 – Musculatura da veia central da supra-renal de chagásico crônico – célula parasitada contendo pequeno número de amastigotas, apresentando núcleo volumoso de contorno irregular e hiper Cromático; o citoplasma é abundante, finamente reticular, corando-se levemente pela hematoxilina (basófilo). Em torno das amastigotas formou-se halos claros. Hematoxilina-eosina. x800.

perdia o aspecto fusiforme e a característica miofibrilar acidófila, tornando-se oval por expansão do diâmetro transversal, assumindo uma característica de trama reticular ou de grânulos finos, com afinidade tintorial basófila, corando-se em um tom azul ou cinza-claro em preparações pela hematoxilina-eosina. O núcleo destas células apresenta-se aumentado, podendo exibir um ou dois nucléolos. Em outras células (Figs. 2 e 3) o número de parasitas é um pouco maior, estando eles isolados ou em pequenos grupos no interior de grandes espaços claros completa ou incompletamente delimitados por septos ou “membranas”. Estas lojas opticamente vazias contendo formas amastigotas do *T. cruzi*, geralmente dispõem-se periféricamente no citoplasma, em cuja parte central frequentemente observa-se material granuloso, basófilo, às vezes associado a pequena quantidade de material acidófilo. Quando presente, o núcleo é volumoso e mostra-se envolvido pelo citoplasma granuloso da célula hospedeira. O contorno do ninho é marcado por uma “membrana” interna basófila, de espessura um pouco irregular, externamente à qual, geralmente pode-se observar uma faixa eosinófila, homogênea, compactada de citoplasma muscular que circunda todo o ninho, sem que se possa dizer se é citoplasma de

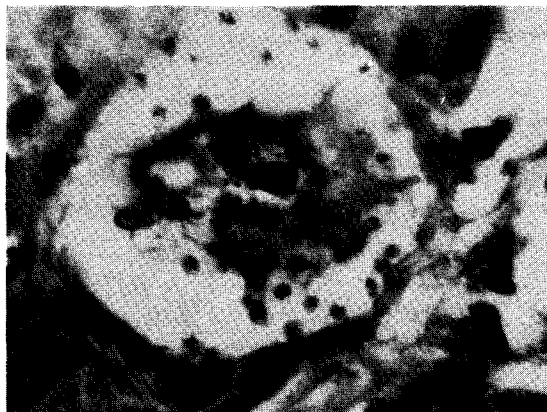


Fig. 2 – Célula da camada muscular da veia da supra-renal de chagásico crônico apresentando núcleo volumoso, claro e de contorno mal definido. Junto a um dos pólos do núcleo o citoplasma apresenta-se formado predominantemente por finos grânulos basófilos; o resto do citoplasma é formado por amplo espaço claro contendo algumas amastigotas. Hematoxilina-eosina. x1250.



Fig. 3 – Musculatura da parede da veia da supra-renal – Na intimidade de um fascículo muscular observam-se dois ninhos de amastigotas: o da direita apresenta alguns parasitas e material citoplasmático granuloso; o da esquerda mostra um citoplasma claro contendo algumas amastigotas e na sua periferia vê-se estrutura membranosa formando a parede interna do ninho (setas). Hematoxilina-eosina. x800.

células musculares adjacentes ou da própria miocélula parasitada. Às vezes a célula parasitada apresenta apenas pequena porção de citoplasma granuloso junto ao núcleo volumoso e grande espaço citoplasmático sem afinidade tintorial, contendo algumas formas amastigotas, formando um nítido contraste entre o

grande espaço citoplasmático e o pequeno número de parasitas que o ocupa. Outros ninhos apresentam-se volumosos e com grande número de parasitas que preenche praticamente todo o seu espaço citoplasmático. Nestas células com muitos parasitas o núcleo é mais difícil de ser visto e, quando presente, pode apresentar grau variável de encarquilhamento e/ou cromatina com tendência à homogeneização e hiperchromatismo e, às vezes, desaparecimento da membrana cromatinica. Quando as células parasitadas são coradas pelo método Feulgen para DNA (Fig. 5), em seus núcleos evidencia-se a imagem negativa dos nucléolos e no citoplasma o material granuloso é negativo, sendo o núcleo e o cinetoplasto das amastigotas intensamente corados, tornando a identificação dos parasitas muito fácil por este método. A reação do PAS (ácido periódico de Schiff) não cora nem a membrana basófila da periferia do ninho, nem o material basófilo granuloso do seu citoplasma e nem o corpo do parasita. Já a técnica da peroxidase antiperoxidase para *T. cruzi* (Fig. 4), além de corar bem as amastigotas,

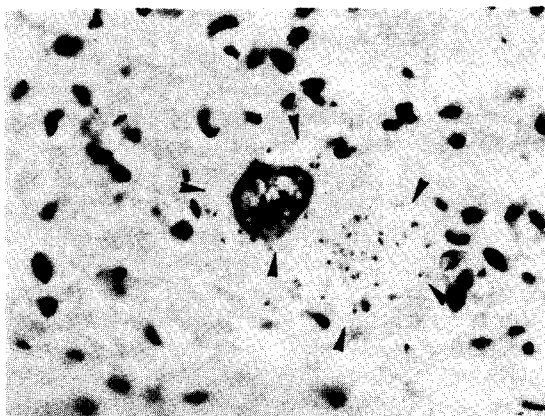


Fig. 5 - Dois ninhos de amastigotas do *T. cruzi* (setas) na musculatura da veia central da supra-renal de chagásico crônico, corados pelo método de Feulgen para DNA. O cinetoplasto e o núcleo dos amastigotas coram-se fortemente da mesma forma que o núcleo de uma das células hospedeiras. Material citoplasmático de ambas as células hospedeiras é Feulgen negativo. x500.

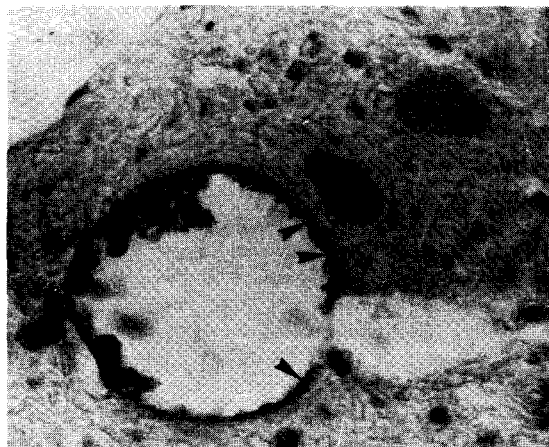


Fig. 4 - Ninhos de amastigotas na veia central da supra-renal de chagásico crônico, corado pelo método da peroxidase-antiperoxidase (PAP) para *T. cruzi*. Próximo ao canto superior direito célula parasitada contendo apenas uma amastigota com reação fortemente positiva enquanto o citoplasma contém grânulos que se coram fracamente pelo PAP. Embaixo à esquerda observa-se volumoso ninho cuja "membrana" periférica (setas) é fortemente positiva pelo PAP, como as amastigotas. Entre os dois ninhos descritos observa-se um terceiro cujo conteúdo cora-se intensamente pelo PAP. x640.

mostra-se fortemente positiva ao nível da membrana periférica (basófila pelo HE) do ninho e ao nível de alguns septos que dividem os espaços opticamente vazios que contêm parasitas. O material citoplasmático granuloso e basófilo que é Feulgen e PAS negativos pode mostrar-se fraco ou moderadamente positivo pelo PAP em algumas células parasitadas.

DISCUSSÃO

Estudos da interação entre o *T. cruzi* e células de vertebrados foram desenvolvidos "in vitro" por Dvorak e cols⁹, Nogueira e cols¹², Luban e cols¹⁰, Meirelles e cols¹¹ e Alexander¹ dentre outros. Extensa revisão e discussão sobre os vários aspectos da relação hospedeiro-parasita na tripanossomose cruzi é feita por Brener⁸. Apesar da existência de expressiva soma de trabalhos publicados abordando diferentes ângulos desta protozoose, pouca atenção tem sido dada às células musculares lisas parasitadas pelo *T. cruzi*, na fase crônica da doença humana e mesmo experimental. Em trabalhos anteriores^{4 5} chamamos a atenção para as modificações nucleares que se observam frequentemente em células musculares lisas da veia da supra-renal de chagásicos crônicos parasitadas pelo *T. cruzi*. Recentemente observamos gigantismo nuclear em célula muscular cardíaca de chagásico crônico com formas amastigotas do *T. cruzi*². O presente trabalho trás novas contribuições, mostrando as modificações citoplasmáticas que ocorrem nas células musculares lisas parasitadas em supra-renais de chagásicos crônicos. Pode-se dizer que o parasitismo dos leiomiócitos além de promover as modificações nucleares citadas, induz alterações citoplasmáticas que podem ser vistas mesmo em secções de células que albergam apenas um ou poucos parasitas. Geralmente a forma amastigota do *T. cruzi*, mesmo quando única na secção celular, mostra-se envolta por halo claro (opticamente vazio), nitidamente separado do resto do citoplasma. O citoplasma restante perde a caracteris-

tica miofibrilar acidófila e adquire aspecto finamente reticular ou granuloso, corando-se moderadamente pela hematoxilina (basófilo), sendo Feulgen e PAS negativos. Estes dados histoquímicos levam-nos a admitir que a basofilia do citoplasma da célula parasitada seja devida a aumento do teor de RNA, particularmente o ribossômico, o que está de acordo com as características assumidas pelos núcleos que além de volumosos apresentam, às vezes, excepcional desenvolvimento nucleolar⁵. À medida que as formas amastigotas aumentam em número os halos claros são transformados em "lojas" periféricas, delimitadas por septos, às vezes com membrana interna basófila que pode existir também contornando todo o ninho. Estas "lojas" têm grandes espaços opticamente vazios, que são apenas parcialmente preenchidos por grupos de amastigotas pouco numerosos, mas que podem ser volumosos. O citoplasma sem parasitas, geralmente se concentra em torno do núcleo e contém material finamente granuloso e basófilo, podendo ainda apresentar-se constituído por grânulos um pouco mais grosseiros, em parte basófilos e em parte ligeiramente acidófilos. Enquanto as amastigotas mostram núcleo e cinetoplasto facilmente identificáveis pelo Feulgen, o citoplasma da célula hospedeira mantém-se Feulgen e PAS negativos. Entretanto, em algumas células semelhantes às descritas acima, a técnica da peroxidase antiperoxidase para *T. cruzi*, além de demonstrar suas formas amastigotas, coram substâncias livres no citoplasma granuloso da célula hospedeira e, às vezes, esta reação é fortemente positiva na "membrana" que envolve todo o ninho, podendo sê-lo também nas membranas que delimitam as lojas. Estas membranas poderiam ser explicadas tanto por reação imunocitoquímica cruzada de material celular rechaçado para a periferia da célula hospedeira como também por difusão de antígenos do *T. cruzi* e adsorção dos mesmos às estruturas da periferia celular. Já o material citoplasmático granuloso, cuja positividade pelo PAP é menos acentuada, poderia resultar de reação imunocitoquímica cruzada ou simplesmente de um artefato (background), podendo também constituir-se de antígenos tripanossoma-símile resultantes de interação entre o leiomíocito e o parasita.

SUMMARY

Some morphologic aspects of the smooth muscle cells, parasitised by T. cruzi in the adrenal vein of chronic chagasic patients were studied. The staining techniques used were the following: Hematoxylin and Eosin (HE), PAS, Feulgen and the peroxidase antiperoxidase (PAP) immunocytochemical method for identification of T. cruzi antigen. The intracellular amastigotes were often surrounded by a clear halo and the cytoplasm of the parasitised smooth muscle

cells were granular or reticular in appearance being basophil and, PAS and Feulgen negative. These data suggest that the cytoplasmic basophil material could be ribosomal RNA. The intracellular nests of amastigotes were surrounded by a PAP positive "membrane-like" structures. This PAP positive "membrane-like" material, as well as some cytoplasmic PAP positive granulomatous material, could be due to absorbed antigens from the parasite or to T. cruzi-like antigens resulted from the interaction between the parasite and the host cell.

Key words: *Trypanosoma cruzi*. Chagas' disease. Smooth muscle of the central suprarenal vein.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alexander J. Effect of the antiphagocytic agent cytochalasin B on macrophage invasion by leishmania mexicana promastigotes and *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Journal of Protozoology 22: 237-240, 1975.
2. Almeida HO. Gigantismo nuclear em célula muscular cardíaca parasitada pelo *Trypanosoma cruzi*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 18: 121-122, 1985.
3. Almeida HO, Teixeira VPA, Oliveira ACF. Flebite com parasitismo em supra-renais de chagásicos crônicos. Arquivos Brasileiros de Cardiologia 36: 341-344, 1981.
4. Almeida HO, Teixeira VPA, Oliveira ACF. Alterações nucleares em células parasitadas pelo *T. cruzi*. Revista de Patologia Tropical 10: 15-20, 1981.
5. Almeida HO, Teixeira VPA, Reis MA, Franciscan JU, Martins E. Modificações nucleares em células de chagásicos crônicos parasitadas pelo *T. cruzi*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, em preparação.
6. Barbosa AJA. Método imunocitoquímico para identificação de amastigotas do *Trypanosoma cruzi* em cortes histológicos de rotina. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 27: 293-297, 1985.
7. Barbosa AJA, Gobbi H, Lino BT, Lages-Silva E, Ramirez E, Teixeira VPA, Almeida HO. Estudo comparativo entre o método convencional e o método da peroxidase antiperoxidase na pesquisa do parasitismo tissular na cardiopatia chagásica crônica. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 28: 91-96, 1986.
8. Brener Z. O parasito: relações hospedeiro-parasito. In: Brener Z. e Andrade Z. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, p. 1-41, 1979.
9. Dvorak J, Schmunis C. *Trypanosoma cruzi*: interaction with mouse peritoneal macrophages. Experimental Parasitology 32: 289-300, 1972.
10. Luban N, Dvorak J. *Trypanosoma cruzi*: interactions with vertebrate cells "in vitro". III. Selection for biological characteristics following intracellular passage. Experimental Parasitology 36: 139-143, 1974.
11. Meirelles MNL, Martinez-Palomo A, Souto-Padron J, De Souza W. Participation of concanavalin A binding

- sites in the interaction between *Trypanosoma cruzi* and macrophages. *Journal Cell Science*: 62: 287-299, 1983.
12. Nogueira N, Cohn Z. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *Journal of Experimental Medicine* 143: 1402-1420, 1976.
 13. Rubio M, Howard J. Observación de células gigantes parasitadas por *Trypanosoma cruzi* en niños con enfermedad de Chagas congénita. *Biológica* 34:50-60, 1963.
 14. 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, 86p., 1985.
 15. Torres CM, Azevedo AP. Cellules geantes kistiques chez le chien l'armadillo que presente l'infection spontanee par le *Trypanosoma cruzi*: Chagas, 1909. *Comptes Rendus de la Société Biologie* 102: 412-414, 1929.