

LEIOMIÓCITOS SUPRA-RENÁLICOS E MIOCARDIÓCITOS PARASITADOS PELO TRYPANOSOMA CRUZI EM CHAGÁSICOS CRÔNICOS: ESTUDO COMPARATIVO

HIPÓLITO DE OLIVEIRA ALMEIDA, ALFREDO JOSÉ AFONSO BARBOSA, HELENICE GOBBI, MARLENE ANTONIA DOS REIS, VICENTE DE PAULA ANTUNES TEIXEIRA, MARILDA DA COSTA BRANDÃO

Foram estudados os aspectos das células parasitadas pelo T. cruzi em supra-renais e corações de chagásicos crônicos em preparações histológicas coradas pela hematoxilina-eosina e pela técnica da peroxidase anti-peroxidase (PAP). Comparando-se os aspectos dos leiomiócitos parasitados na musculatura da veia supra-renálica (LPSR) com os miocardiócitos parasitados (MP) foram observadas as seguintes diferenças: a) aumento de volume dos LPSR, geralmente acentuado e desproporcional ao número de parasitas, enquanto os MP sofrem aumento volumétrico menor e proporcional ao número de parasitas; b) núcleos gigantes e lobulados com nucléolos, são freqüentes nos LPSR e excepcionais nos MP; c) nos MP o citoplasma não ocupado pelos parasitas permanece organizado, enquanto que os LPSR perdem a estrutura miofibrilar tornando-se, em algumas células, finamente granuloso, basófilos, PAP negativos, ou acidófilos e PAP positivos; d) na parede interna de alguns LPSR forma-se uma faixa PAP positiva que não é observada nos miocardiócitos; e) embora um exsudato leucocitário possa ser encontrado em torno dos MP e dos LPSR, apenas nos MP foram evidentes fenômenos regressivos dos miocardiócitos e das amastigotas e, às vezes, invasão do citoplasma dos MP por mononucleares. As observações indicam profundas diferenças na interação entre o parasita e os dois tipos de células musculares, sendo possível que correspondam a mecanismos de ação distintos no que se refere às lesões teciduais e que o parasitismo do leiomiócito supra-renálico seja responsável pela perpetuação do T. cruzi no organismo do chagásico crônico.

O encontro de células musculares cardíacas parasitadas pelo *Trypanosoma cruzi* em chagásicos crônicos, não tem sido referido ou é citado apenas de passagem como achado ocasional em vários estudos histopatológicos¹⁻³. Entretanto, Köberle⁴ e Andrade e Ramalho⁵ relatam o encontro de parasitas no miocárdio, respectivamente em 32 e 30% dos chagásicos crônicos. Recentemente mostrou-se⁶ que alguns focos de exsudato mononuclear no coração de chagásicos crônicos contêm, na sua intimidade, miocardiócitos parasitados, sugerindo a persistência da ação do *T. cruzi* na gênese da miocardite focal. Por outro lado, outros estudos^{7, 8} mostram que, na musculatura lisa da veia central das supra-renais são encontrados leiomiócitos parasitados com maior facilidade que no miocárdio de chagásicos crônicos com diferentes formas anátomo-clínicas da doença. Sendo o *T. cruzi* um parasita

com ciclo de reprodução intracelular, é possível que o melhor conhecimento da interação entre este parasita e suas células hospedeiras forneça elementos capazes de influir nas decisões terapêuticas. Através de colorações pela hematoxilina-eosina e pela técnica da peroxidase antiperoxidase para *T. cruzi*, verificou-se que o parasitismo dos leiomiócitos supra-renálicos apresenta alguns aspectos que ainda não foram descritos em miocardiócitos⁹. Por isso no presente trabalho, utilizando cortes corados pela HE e pela técnica do PAP, procurou-se fazer um estudo comparativo da interação entre o *T. cruzi* e esses dois tipos de células musculares na tentativa de buscar informações que poderiam ajudar a compreender os mecanismos de sobrevivência do parasita e de sua participação nas lesões do coração chagásico crônico.

Trabalho realizado na Disciplina de Patologia Geral da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba-MG e no Departamento de Anatomia Patológica da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MATERIAL E MÉTODOS

De chagásicos crônicos necropsiados estudaram-se as glândulas supra-renais (n = 5) e os corações (n = 8) fixados em solução de formol a 4%. O material foi processado para inclusão em parafina, sendo obtidos cortes seriados de um fragmento de cada coração e de todos os fragmentos das supra-renais. Um corte em cada 5 era corado pela hematoxilina-eosina, sendo levado ao microscópio para pesquisa do parasita. Os ninhos encontrados eram marcados para posterior estudo. Algumas lâminas não coradas, com número de série imediatamente anterior ou posterior àquelas nas quais foram identificados ninhos do *T. cruzi*, foram coradas pela técnica da peroxidase antiperoxidase (PAP) para identificação do *T. cruzi*, segundo padronização de Barbosa¹⁰. Tanto os leiomíocitos quanto os miocardiócitos parasitados foram analisados quanto à forma, aspectos do núcleo e do citoplasma não ocupado pelos parasitas, aspectos dos parasitas e suas relações com o exsudato inflamatório. O diâmetro transversal de 40 miocardiócitos sendo 20 parasitados e 20 não parasitados, bem como de 20 leiomíocitos parasitados e de 20 não parasitados foram tomados com auxílio de ocular micrométrica.

RESULTADOS

As médias e desvios-padrão do diâmetro dos leiomíocitos renálicos e miocardiócitos com e sem parasitas, podem ser vistos na tabela I. Foram encontrados nos corações, através do exame de várias lâminas coradas pela hematoxilina, 20 miocélulas parasitadas, sendo que em apenas 4 dessas foi possível observar o núcleo, que se mostrava pequeno, distorcido, aparentando picnose (fig. 1). Em apenas uma dessas o núcleo era moderadamente volumoso, com 3 nucléolos. Nos miocardiócitos parasitados as amastigotas tinham aspecto uniforme, geralmente compactadas, deixando pouco espaço entre si. Na maioria das miocélulas parasitadas foi notada uma porção pouco regular de citoplasma mais periférico que apresentava a mesma estrutura miofibrilar do citoplasma das células normais. Em apenas um corte de miocélula os parasitas ocupavam completamente o citoplasma tornando-o ligeiramente fusiforme devido ao abaulamento de seu terço médio. Os demais miocardiócitos parasitados mantiveram-se cilíndricos, sem grandes deformações de seu contorno externo. Algumas miocélulas parasitadas vistas na intimidade de focos de exsudato inflamatório (fig. 2 e 3) apresentavam citoplasma hialinizado com perda da estrutura fibrilar. Nessas, as amastigotas, em sua maioria, perdiam parte de sua estruturação, sendo identificadas geralmente por minúsculos núcleos picnóticos envoltos por citoplasma pouco distinto. Apesar de, às vezes, observarem-se soluções de continuidade no contorno destes miocardiócitos, adesão e até penetração de mononucleares no seu interior, não se observaram sinais que sugeris-

sem rotura por aumento da pressão interna com liberação de parasitas para o interstício. A técnica do PAP evidenciou nos miocardiócitos as amastigotas (fig. 4 e 5) como corpúsculos castanho-dourados, geralmente de contornos nítidos, às vezes mal definidos. Em dois casos a musculatura da veia supra-renálica apresentava parasitismo abundante e nos demais foram encontrados de 1 a 5 ninhos por caso. Embora pudessem ser encontrados ninhos semelhantes aos descritos no miocárdio, os leiomíocitos supra-renálicos parasitados apresentavam uma faixa de variação muito grande, a qual parecia representar etapas evolutivas do parasitismo celular (fig. 6, 7 e 8). Observaram-se frequentemente leiomíocitos com poucos parasitas (2 e 4 por secção) que se transformaram em células ovais ou globosas, às vezes apresentando núcleo volumoso, lobulado, com citoplasma perdendo sua característica fibrilar, aumentando seu volume e assumindo aspecto finamente granuloso ou reticular, corando-se levemente pela hematoxilina e sendo PAP negativo. Nestas células, as amastigotas geralmente apresentavam-se envoltas por halo claro. Outros leiomíocitos com número de parasitas um pouco maior apresentavam aspecto geralmente globoso com núcleo volumoso quando visível; os parasitas, isolados ou em pequenos grupos estavam dispersos num citoplasma quase sem afinidade tintorial ou no interior de "lojas claras", completa ou incompletamente delimitadas por septos e apenas parcialmente ocupadas pelos parasitas. Pequena parte do citoplasma do leiomíocito era preenchida por material granuloso, geralmente paranuclear, parcialmente basófilo ou acidófilo e quase sempre PAP positivo, particularmente onde predominam os grânulos acidófilos. O contorno do ninho geralmente exibia membrana irregular, basófila e PAP positiva. Uma delicada "névoa" PAP positiva, às vezes, era vista estendendo-se para fora do limite da célula parasitada. Podiam ser encontradas células com pequena ou nenhuma porção de citoplasma granuloso e grande espaço sem nenhuma afinidade tintorial, contendo apenas alguns amastigotas, o núcleo, quando visto, era volumoso e atípico, sendo a "membrana" PAP positiva identificável ou não. Nos leiomíocitos supra-renálicos os parasitas apresentavam maior variação de forma e volume, sendo geralmente maiores que os observados no miocárdio. Apesar do exsudato mononuclear, geralmente rico em plasmócitos, ser ocasionalmente encontrado nas adjacências de leiomíocitos parasitados, a invasão destes pelos leucócitos não foi observada, da mesma forma que não se observou relação entre o exsudato inflamatório e as modificações morfológicas das amastigotas; essas geralmente apresentavam-se preservadas, mesmo quando a célula hospedeira estava envolta por células inflamatórias.

DISCUSSÃO

Em trabalhos anteriores mostrou-se, nos chagásicos crônicos, a existência de miocardiócitos parasi-

tados em associação com focos de miocardite ⁶ e sugeriu-se que os granulomas encontrados em corações de tripanosomóticos poderiam representar uma etapa evolutiva dessa inflamação antitripanosoma ¹¹. Com a descoberta do parasitismo de leiomíocitos da veia supra-renálica, em indivíduos falecidos com a forma crônica da doença ⁷, aventou-se a hipótese de que o ambiente tissular na parede venosa, favorecendo a sobrevivência do parasita, seria um dos fenômenos responsáveis pela manutenção da infecção crônica por dezenas de anos e, conseqüentemente, teria importância na patogênese das lesões cardíacas ^{7,8,12}. O presente estudo mostra diferenças morfológicas marcantes entre o miocardiócito e o leiomíocito supra renálico que parecem apoiar tal hipótese. As modificações nucleares, com aumento de volume e formação de nucléolos, comuns nos leiomíocitos supra-renálicos parasitados e excepcionais nos miocardiócitos, sugerem que as interações entre o parasita e o genoma do leiomíocito sejam mais intensas que as estabelecidas com os miocardiócitos.

TABELA I - Diâmetro transversal médio (em μm) dos leiomíocitos supra-renálicos e miocardiócitos parasitados e não parasitados em chagásicos crônicos (D.P. = Desvio Padrão).

Tipo de célula		Diâmetro transversal Médio	D.P
Leiomíocitos Suprarrenálicos	Não-Parasitados n = 20	4,2	0,3
	Parasitados n = 20	49,7	35,9
Miocardiócitos	Não-Parasitados n = 20	17,7	4,6
	Parasitados n = 20	26,2	8,2

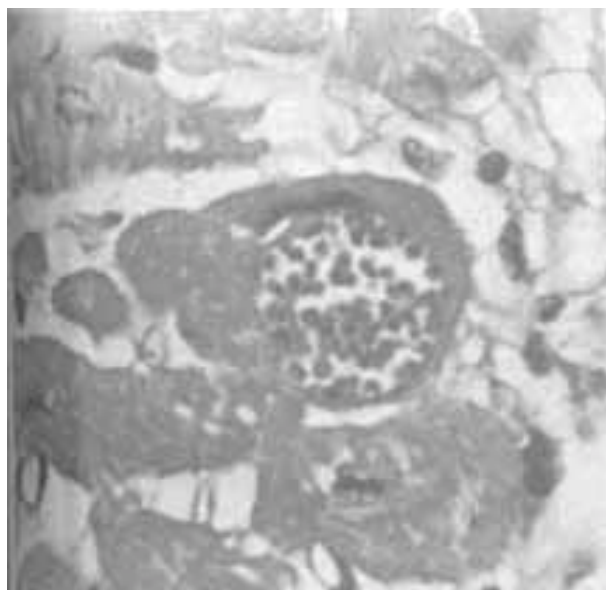


Fig. 1 - Miocardiócito parasitado pelo *T. cruzi*, apresentando núcleo deformado e deslocado para a periferia da célula. Uma faixa irregular de citoplasma do miocárdio permanece com estrutura miofibrilar idêntica às células não-parasitadas. A forma e o volume do miocardiócito parasitado se modificaram apenas discretamente. HE X 800.

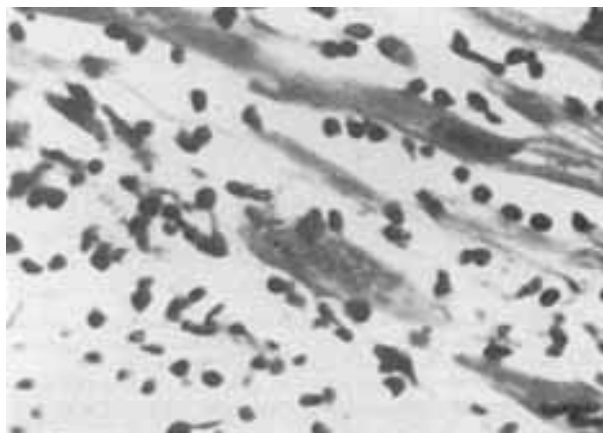


Fig. 2 - Miocardiócito parasitado na intimidade de foco inflamatório, apresentando mononucleares aderidos à sua superfície, sendo que um leucócito já se encontra quase que totalmente no interior do citoplasma que está hialinizado. As amastigotas, visivelmente alteradas, têm contorno mal definido, os núcleos são apagados (cariólise) ou picnócitos. HE X 640.

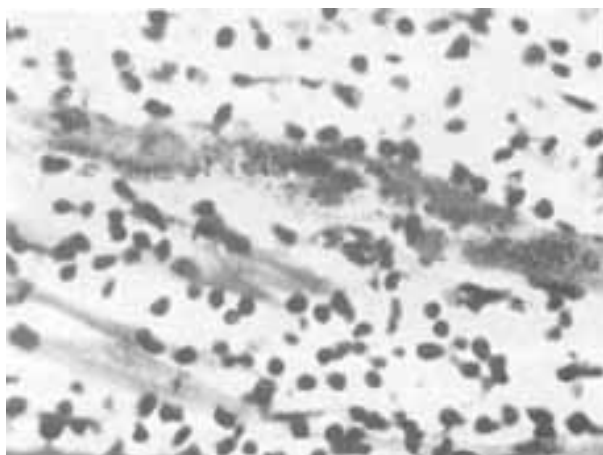


Fig. 3 - Miocardiócito paralisado, mostrando numerosos mononucleares aderidos à sua superfície: o citoplasma está hialinizado, invadido por mononucleares e parcialmente destruído. As amastigotas alteradas como as da figura 2, dispõem-se ao longo do que seria o contorno do miocárdio, aparentemente sem serem liberadas para o interstício HE X 640.



Fig. 4 - Miocardiócito parasitado contendo numerosas amastigotas do *T. cruzi* identificadas pelo método de peroxidase antiperoxidase. Os corpúsculos parasitados têm limites nítidos. PAP X 2000.



Fig. 5 - Miocardiócito parasitado identificado pelo método da peroxidase antiperoxidase para *T. cruzi*. Os corpúsculos do parasita fortemente positivos não mostram limites nítidos PAP X 1250.

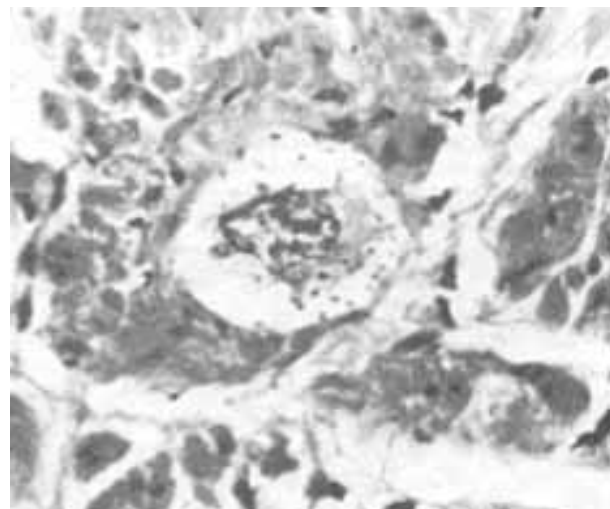


Fig. 6 - Leiomiócito parasitado pelo *T. cruzi*, na veia supra-renálica. Seu núcleo é volumoso, de contorno irregular e heterocromático formando massas grosseiras e irregulares. O citoplasma é muito amplo, contendo poucas amastigotas, sendo finamente granuloso apenas junto a um dos pólos nucleares e sem afinidade tintorial em sua maior extensão HE X 50.

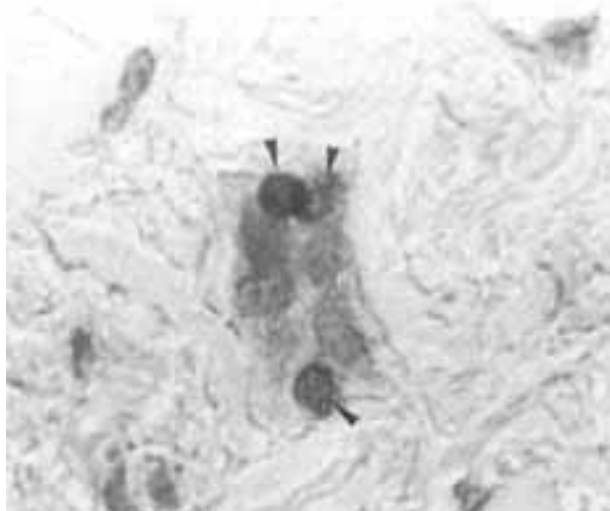


Fig. 7 - Leiomiócito da veia supra-renálica apresentando uma amastigota em uma de suas extremidades e duas na outra (setas). O citoplasma é abundante e preenchido por material finamente granuloso e basófilo. PAP + Hematoxilina X 2000.

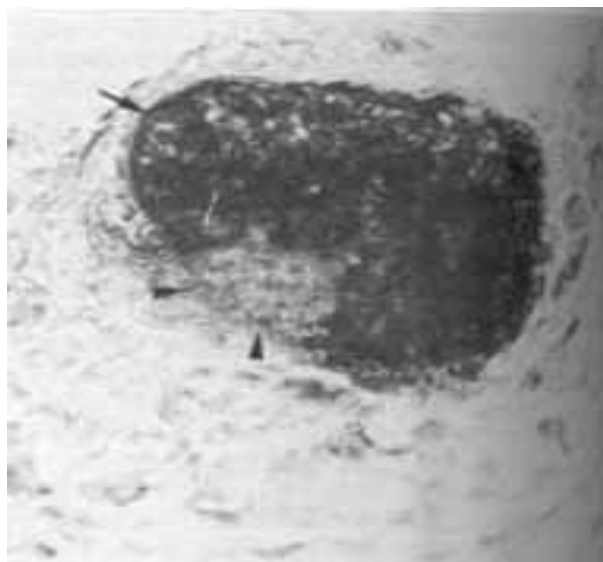


Fig. 8 - Leiomiócito contendo numerosos parasitas intensamente PAP positivos e pequena porção de citoplasma (setas) contendo grânulos que também se coram pelo PAP como antígeno tripanossômico. O leiomiócito apresenta uma membrana PAP positiva que o contorna parcialmente (flecha) PAP X 1250.

Possivelmente relacionadas com essas modificações nucleares estão as drásticas transformações observadas no citoplasma de alguns leiomiócitos, que não foram observadas nos miocardiócitos. De fato, o leiomiócito, numa fase precoce de parasitismo, modifica sua forma, que passa a oval ou globosa, perde o aparelho miofibrilar que é substituído por finos grânulos basófilos que são PAP negativos, provavelmente representando um aumento de RNA citoplasmático, particularmente ribossômico, o que está de acordo com a hipertrofia nuclear e a formação de nucléolos grandes e quase sempre numerosos, já observadas em estudos anteriores^{9,13}. Em outros leiomiócitos, com número um pouco maior de parasitas, passam a predominar espaços sem afinidade tintorial e material granuloso, geralmente acidófilo e corando-se pelo PAP. Tais aspectos pode sugerir: 1º) que a maquinaria da célula hospedeira tenha sido utilizada para sintetizar proteína que apresenta reação cruzada com o antígeno do *T. cruzi*; 2º) que o material PAP positivo presente no citoplasma da célula hospedeira, seja constituída por antígenos liberados das amastigotas. Outra diferença marcante entre o leiomiócito supra-renálico e o miocardiócito, quando parasitado nos chagásicos crônicos, é a formação de “membrana” constituída por material PAP positivo presente apenas no leiomiócito.

É difícil, no estudo atual, avaliar a razão dessa diferença e sua importância patogênica. Poder-se-ia admitir que essa “membrana antigênica” se forma apenas no leiomiócito porque somente esse seria capaz de fabricá-la, o que é sugerido pelas modificações citoplasmáticas. Dessa forma, a membrana antigênica seria formada pela condensação periférica do material

sintetizado no citoplasma. Por outro lado, esse material antigênico poderia ter origem nas amastigotas, sendo secretado por elas ou resultado de sua eventual morte e desintegração intracelular. Nesse caso, tal fenômeno poderia ocorrer também no miocardiócito, entretanto, a ausência neste da condensação periférica de material antigênico, poderia depender de incapacidade de sua membrana plasmática e/ou lâmina basal em reter o antígeno, permitindo total difusão para fora da célula, o que não ocorreria no leiomiócito. Entretanto, além de o miocardiócito parasitado poder liberar alguns antígenos para o ambiente extracelular, a grande quantidade de antígeno tripanosoma-símile livre no citoplasma ou concentrado na periferia do leiomiócito, é compatível com a liberação deste material para o meio extracelular de onde pode cair na circulação. A possibilidade de liberação celular de antígenos *T. cruzi*-símile produzidos pelas células parasitadas ou liberados dos parasitas e sua passagem para a circulação sanguínea poderia ter alguma participação na evolução da doença de Chagas. Uma investigação sobre a presença de antígenos *Trypanosoma*-símile no sangue de chagásicos poderia auxiliar no esclarecimento desta questão.

Por outro lado, o fato de, às vezes, encontrarem-se leiomiócitos muito volumosos, com grandes espaços vazios entre os parasitas, além de poder representar uma degeneração ou artefato, sugere a possibilidade de que parasitas, em determinados momentos, saiam da célula hospedeira individualmente ou em pequenos grupos, sem que o leiomiócito seja destruído, podendo inclusive ser repovoado por proliferação das amastigotas que permanecem no seu interior. Além disso, ao contrário do que freqüentemente se observa no coração, os ninhos na parede da veia supra-renal, mesmo quando envoltos por células inflamatórias, não são invadidos por estas e não são freqüentes os sinais de morte ou desintegração das amastigotas. Parece que na supra-renal do chagásico crônico a resposta imunitária antitripanosoma é pouco eficiente, permitindo que o *T. cruzi* se reproduza e caia na circulação sanguínea, podendo ganhar outras células, como o miocardiócito. Entretanto, no miocárdio dos chagásicos crônicos, as presentes observações sugerem que a célula parasitada e os parasitas geralmente são atacados pelas defesas do hospedeiro antes de se tornarem muito volumosas ou se romperem, havendo pouca ou nenhuma possibilidade de os parasitas sobreviverem a tal agressão. Dessa forma, é provável que nos indivíduos com boa capacidade de defesa, as veias das supra-renais sejam o habitat que permite ao *T. cruzi* permanecer no organismo humano por dezenas de anos, podendo fornecer antígenos e/ou parasitas que, uma vez na circulação sanguínea, e, eventualmente se fixando em tecidos como o miocárdio, poderiam contribuir para lesá-los progressivamente, seja por reação contra constituintes do tripanosoma, seja por auto-agressão imunitária. A auto-agressão poderia ser ativada pela destruição do miocardiócito pelos

parasitas ou pela resposta inflamatória antitripanosoma. Além disso, caso a antigenicidade cruzada seja importante na gênese da miocardite do chagásico crônico, possivelmente seu papel patogênico depende da perpetuação do parasitismo para realimentar a auto-imunidade com o fornecimento de estimulação antigênica e/ou gerando, direta ou indiretamente, fatores que interferiram nos mecanismos que regulam a resposta imunitária.

SUMMARY

The morphologic patterns of the smooth muscle and myocardial fibers of patients who died with chronic Chagas disease were studied. The smooth muscle fibers were obtained from the central vein of the adrenal gland, for it is known to have relatively large quantities of parasites. Fragments from the myocardial muscle (eight cases) and from the adrenal glands (five cases) were fixed in paraffin wax and sections were stained with both the hematoxylin-eosin and the immunocytochemical method of peroxidase anti-peroxidase (PAP) for demonstration of *Trypanosoma cruzi* amastigotes.

The comparison between the adrenal leiomyocytes (APL) and the myocardial fibers (MPF) shows conspicuous differences, as follows: a) marked, often cystic enlargement of the APL (not proportional to parasite number) while the MPF only present slight enlargement (proportional to number of parasites); b) giant and lobulated nuclei, with nucleoli, are frequent in APL and rare in MPF, c) the cytoplasm of MPF not filled with amastigotes remain structurally preserved while in the APL, the cytoplasm was basophilic (with PAP-negative granules) or acidophilic (with PAP-positive granules); d) the cystic cavity in APL, with variable number of parasites, is lined by a PAP-positive membrane-like structure, which is never observed in APL; e) in spite of the presence of inflammatory cells surrounding the APL and MPF, only the later eventually showed signs of zonal coagulation of the cytoplasm with the invasion of inflammatory cells.

The present observations show noticeable differences in the interrelationship between the parasite and the two types of muscle cells studied. It is possible that these differences also correspond to distinct mechanisms of action in the genesis of the lesions and of the perpetuation of *T. cruzi* in the organism of chronic Chagas patients.

REFERÊNCIAS

1. Lopes, E. R.; Chapadeiro, E.; Almeida, H. O.; Rocha, A. - Contribuição ao estudo da anatomia patológica dos corações de chagásicos falecidos subitamente. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 9: 269, 1975.
2. Lopes, E. R.; Chapadeiro, E.; Andrade, Z. A.; Almeida, H. O.; Rocha, A. - Anatomia patológica de corações de chagásicos assintomáticos falecidos de modo. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 76: 189, 1981.

3. Mignone, C. - Alguns aspectos da anatomia patológica da cardite chagásica crônica. São Paulo, s. d. (Tese à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).
4. Köberle, F. - Cardiopatia chagásica. Hospital. 53: 311, 1959.
5. Andrade, Z.; Ramalho, L. P. M. - Miocardite chagásica. Estudo morfológico de 38 casos comprovados pelo encontro de parasitas nas secções histológicas. Gaz. Med. Bahia, 66: 65, 1966.
6. 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. Arq. Bras. Cardiol. 42: 183, 1984.
7. Almeida, H. O.; Teixeira, V. P. A.; Oliveira, A. C. F. - Flebite com parasitismo em supra-renais de chagásicos crônicos. Arq. Bras. Cardiol. 36: 341, 1981.
8. Teixeira, V. P. A. - Parasitismo da veia central da supra-renal em diferentes formas anátomo-clínicas da doença de Chagas. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, 1985. (Monografia de Mestrado).
9. Almeida, H. O.; Martins, E.; Francisco, J. U.; Teixeira, V. P. A.; Barbosa, A. J. A.; Gobbi, H.; Reis, M. A. - Aspectos das células parasitadas pelo *Trypanosoma cruzi* na veia central das supra-renais de chagásicos crônicos. Aceito para publicação na Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1986.
10. Barbosa, A. J. A. - Método imunocitoquímico para identificação de amastigotas do *Trypanosoma cruzi* em cortes histológicos de rotina. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 27: 293, 1985.
11. Almeida, H. O. - Inflamação granulomatosa na cardite chagásica crônica. Aceito para publicação na Rev. Goiana de Medicina.
12. Teixeira, V. P. A.; Fernandes, P. A.; Brandão, M. C.; Gobbi, H.; Reis, M. A.; Almeida, H. O. - Parasitismo incomum na veia central da supra-renal em chagásicos crônicos. Enviado para publicação nos Arq. Bras. Cardiol. 1986.
13. Almeida, H. O.; Teixeira, V. P. A.; Reis, M. A.; Francisco, J. U.; Martins, E. - Modificações nucleares em células de chagásicos crônicos parasitadas pelo *Trypanosoma cruzi*. Enviado para publicação na Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1986.