

Estudo do ciclo evolutivo do “*Schizotrypanum Cruzi*” em cultura de tecidos de embrião de galinha *

por

C. Romaña e H. Meyer

(Com 6 estampas)

Notícia: O presente trabalho é o resultado da estreita colaboração entre o Laboratório de Biofísica da Faculdade Nacional de Medicina e o Serviço de Estudo das Grandes Endemias do Instituto Oswaldo Cruz. Em 1939, quando procurava criar as secções que hoje constituem o Laboratório de Biofísica, foi, graças ao alto espírito de colaboração e à orientação de Evandro Chagas, que pude organizar a atual secção de cultura de tecidos do meu laboratório. Procurava Evandro Chagas auxiliar-me, certo de que no estudo das condições físico-químicas do desenvolvimento das culturas de tecidos poder-se-iam achar as bases para determinação dos elementos fundamentais que caracterizam a estrutura vital. Ao lado disso seria estudado o desenvolvimento em cultura dos agentes etiológicos das principais protozooses encontradas no nosso país.

Cumpra-se assim, com a publicação dêste trabalho, uma parte do programa que Evandro Chagas inspirou e orientou.

Nenhuma homenagem à sua memória será melhor do que esta.

Carlos Chagas.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de *S. cruzi* em cultura de tecidos foi conseguido por Kofoid, Wood and McNeil (1) que empregaram coração de embriões de ratos e camundongos. Os autores citados observaram que o *S. cruzi* evolue nas culturas até à forma adulta como acontece naturalmente nos vertebrados.

* Recebido para publicação a 4 de março e dado à publicidade em abril de 1942.

Trabalho do Serviço de Estudos das Grandes Endemias do Instituto Oswaldo Cruz e do Laboratório de Biofísica da Faculdade Nacional de Medicina (Serviços do Prof. Carlos Chagas).

Puderam ver, 24 horas depois de contaminar as culturas de tecidos com *S. cruzi*, proveniente de culturas em tubos, numerosas formas flageladas aderidas pela extremidade posterior ou pelo flagelo livre à superfície de fibras musculares, fibroblastos e macrófagos, mas não observaram a penetração ativa de critídias ou T. metacíclicos nos elementos celulares. No entanto, viram de um a vários flagelados em movimento ativo no interior de muitos macrófagos.

Não foram observados parasitos nos fibroblastos, nem nas preparações a fresco, nem nas coradas. Os primeiros *S. cruzi* adultos apareceram ao quinto dia depois da inoculação.

Em cortes de culturas observaram formas de leishmanias e critídias em fibras musculares cardíacas quatro dias depois da contaminação, assim como um pequeno grupo de formas finas de *S. cruzi*.

Retomamos estes estudos com o fim de seguir o mais cuidadosamente possível o ciclo evolutivo intracelular do *S. cruzi*, já conhecido em suas linhas gerais desde o tempo de Viana (1911), e de constatar a relação existente entre as células e o *Schizotrypanum*.

TÉCNICA

As culturas de tecido foram obtidas seguindo a técnica comum de Carrel, isto é, um fragmento de embrião de galinha foi colocado em partes iguais de plasma desta ave (dil. 1/5) e de suco de embrião da mesma origem centrifugado três vezes. Depois de mais ou menos 24 horas de incubação, foi colocada uma pequena gota de cultura de *Schizotrypanum* em tubo, sobre a superfície do coágulo ao nível da cultura de tecido. As culturas assim contaminadas foram incubadas à temperatura de 38°-39° C. Estas não foram repicadas tão frequentemente quanto exige a clássica técnica de Carrel (3 vezes por semana); só foram repicadas de 5 em 5 dias ou, em certos casos, com menos tempo, de acordo com o tecido e o aspecto das culturas. Foram lavadas regularmente 3 vezes por semana com uma gota de líquido de Tyrode e uma gota de suco embrionário depositadas sobre a superfície do coágulo.

Com esta técnica o transplante que geralmente fica pouco transparente no centro e difícil de observar histologicamente, estende-se sobre a superfície e depois de um certo tempo torna-se claro, de modo que se pode com mais facilidade observar *in vivo* o que ocorre no interior das células, assim como nas preparações fixadas e coradas.

Nos casos em que a cultura estava prejudicada pelo excessivo desenvolvimento dos tripanosomas e morte das células, a cultura infectada era repicada com um fragmento de tecido novo ao lado e os parasitos colonizavam o novo

tecido. Nossa cultura mais antiga de *Schizotrypanum* em tecido vem sendo mantida, desta maneira, durante mais de 7 meses.

O *Schizotrypanum* é facilmente cultivado em tecidos de galinha, desenvolvendo-se no miocárdio, baço fígado, epitélio da íris e células do gânglio espinhal. Em todos estes tecidos ele parasita qualquer tipo de célula; fibrocitos, histiocitos, macrófagos, células musculares, epitélio pigmentado da íris, células do fígado, células nervosas e monocitos do sangue de galinha.

Para as contaminações do tecido usamos culturas em agar-sangue de *Schizotrypanum* de diversas procedências. Assim empregamos amostras isoladas de tatu, gambá, homem e morcego, que foram igualmente ativas na sua capacidade infectante, não se tendo observado diferenças no ciclo evolutivo.

Apresentando-se a oportunidade, foi usado sangue de cobaia contaminada com *S. cruzi* para infectar culturas de tecido, com resultado igualmente positivo.

As culturas, examinadas a fresco durante horas consecutivas foram geralmente fixadas em líquido de Bouin, de Patay, etc., e coradas com Giemsa, hematoxilina-eosina, hematoxilina-férrica, etc.

O CICLO EVOLUTIVO DO *SCHIZOTRYPANUM* NAS CULTURAS DE TECIDO

A observação de numerosas preparações a fresco e coradas nos leva a crer que tanto as formas crídiadas como os T. metacíclicos tem capacidade infectante para as células de culturas de tecido. O mecanismo de entrada e evolução intracelular de ambas as formas é semelhante.

A penetração dos flagelados nas células pode ser ativa ou obedecer a um ato de fagocitose por parte de células macrófagas. Em geral a penetração ativa é mais visível nos T. metacíclicos que nas crídiadas, pois aqueles com sua grande motilidade atravessam facilmente as superfícies celulares. Temos observado a fresco os flagelados penetrando no protoplasma de fibroblastos e miocitos. O mais comum é vê-los sair de novo das células, pois parece necessário, para que o parasitismo se estabeleça, que os flagelados percam parte de seus movimentos ativos. Foi-nos possível seguir a evolução de alguns destes flagelados intracelulares. Neles os movimentos ficam reduzidos à membrana ondulante e ao flagelo, o resto do corpo permanecendo praticamente imóvel. Vinte horas depois de penetrado vemos o desaparecimento da membrana ondulante e um grande encurtamento do flagelo livre. Ao mesmo tempo, o corpo também se encurta, tornando-se mais globuloso e adquirindo uma forma semelhante à crídiada, no caso de penetração de tripanosomas. Algumas horas mais tarde já se apresentam sob a forma de leishmania.

Em preparações coradas é possível observar que esta transformação é acompanhada nos tripanosomas de uma migração do blefaroplasto para a extremidade anterior do parasito, assim como da transformação daquele corpúsculo, de arredondado que era, em um pequeno bastonete. A partir deste momento, é difícil seguir a evolução dos flagelados a fresco, pois ocultam-se no protoplasma celular que apresenta uma refração semelhante à do protozoário. Aliás, os parasitos buscam especialmente as células do centro da cultura para penetrar nelas, sendo, por conseguinte, muito mais difícil sua observação a este nível.

Nas culturas a fresco é possível, já aos 3 dias de infectadas, ver numerosas formas novas agrupadas no protoplasma das células parasitadas, que nas preparações coradas se apresentam como leishmanias, entre as quais acha-se bom número em diferentes estádios de divisão binária. (Figs. 1 e 2).

Observa-se em preparações coradas que as leishmanias e critídias intracelulares estão rodeadas por uma zona protoplasmática clara. Isto nos levou a pensar que houvesse uma retração dos protozoários durante a fixação; mas também observamos o mesmo fenômeno a fresco. É, pois, possível que exista uma lise protoplasmática ao redor dos parasitos. Este fenômeno pode ser bem apreciado nas células com protoplasma delgado e laminar.

A multiplicação torna-se mais pronunciada nos dias subsequentes ao terceiro, e a atenção é chamada para os ninhos parasitários pelo fato de começar a aparecer movimento em alguns dos protozoários, pois enquanto permanecem imóveis é difícil diferenciá-los do protoplasma celular. Entre o 3.º e 4.º dias veem-se numerosos parasitos com formas de critídias com flagelo já bem desenvolvido. A divisão binária também pode ser observada em formas já flageladas (critídias). Nunca foram observadas formas que fizessem suspeitar uma divisão múltipla, nem tripanosomas em divisão.

Os movimentos dos flagelados intracelulares são cada vez mais ativos até à célula completamente cheia de parasitos só mostrar tripanosomas em movimento. Nas lâminas coradas observa-se a transformação das formas critídias em tripanosomas com migração do blefaroplasto à parte posterior do corpo e o desenvolvimento da membrana ondulante. (Fig. 3).

Ao 4.º dia já podem aparecer alguns tripanosomas livres, mas em geral é no 5.º dia que se observam os primeiros. Passam ao meio externo graças à ruptura brusca da célula que os contem. Neste momento pode-se observar, junto a formas que chegaram ao desenvolvimento completo de tripanosomas, outras que ainda estão em forma de critídias, ou mesmo de leishmanias. Ao se romperem as células parasitadas são lançados no meio externo junto com os tripanosomas restos celulares de núcleo e protoplasma. Entre as critídias

incompletamente desenvolvidas quando as células maduras se rompem, há algumas que estão no período de divisão e outras em transformação para tripanosomas. Estas formas, quando chegam ao meio intracelular, podem completar sua evolução até tripanosomas. Não parece se dar o mesmo com as formas leishmanias libertadas, que, em observações de 48 horas, não conseguimos ver transformar-se em critídias, e que nas lâminas coradas mostram sintomas de degeneração.

Na parte central das culturas são observados dentro dos miocitos e fibroblastos verdadeiros ninhos de protozoários que, chegados à madureza, arrebatam; rompem-se às vezes mesmo antes de maduros, quando os parasitos ainda estão sob a forma de leishmania. Na zona de crescimento das culturas veem-se fibrocitos ou células epiteliais parasitadas extendidas em superfície plana (Fig. 4), mas é frequente observarem-se células esféricas, livres, cheias de flagelados, (Fig. 5). Estes elementos livres formam-se como resultado de uma espécie de broto nas células fixas que libertam um segmento de protoplasma contendo flagelados. Em outros casos, estas formações resultam da retração de fibroblastos parasitados que bruscamente adquirem a forma esférica. Estes elementos celulares livres rompem-se mais tarde, pondo em liberdade os tripanosomas que continham.

Os tripanosomas adultos que saem das células são de dois tipos, semelhantes aos que se encontram na corrente sanguínea dos vertebrados; alguns são finos e compridos enquanto que outros são largos (Fot. 6, 7 e 8). Desde o princípio observam-se ambas as formas nas culturas, e ainda intracelulares. Os tripanosomas finos mostram um tipo de movimento de progressão ondulatória em linha reta semelhante ao dos *T. metacíclicos*, enquanto que as formas largas teem o movimento sobre si mesmo.

E' interessante recordar que C. Chagas deu a este dimorfismo um caracter sexual; a união dos gametos teria lugar no hospedador intermediário. Atualmente não existem observações que confirmem este ponto de vista. A maior parte dos autores opina que as formas finas se transformam em formas grossas, baseando-se no fato de encontrarem no sangue tripanosomas com morfologia intermediária entre ambas. Ainda mais, sabe-se que as formas finas são mais frequentes no começo das infecções. De nossas observações em culturas de tecidos, pensamos que é necessário aprofundar o estudo da origem de ambas as formas, para esclarecer definitivamente se as formas largas derivam das finas.

O relato que acabamos de fazer da evolução do *S. cruzi* nas culturas de tecido está em acordo com a descrição clássica dada por Gaspar Viana em seus primeiros trabalhos de histopatologia da tripanomíase (2), confirmados por

E. Dias (3). Entretanto, temos observado também, com grande constância, certos aspectos da evolução do *S. cruzi* cujo significado ainda não vemos claramente e que continuamos a observar, mas que cremos de interesse relatar.

Em numerosas culturas de tecido infectadas com *S. cruzi* procedentes de culturas em agar-sangue ou de outra cultura de tecido, vimos que critídias ou tripanosomas depois de penetrar nas células ou no meio externo, se enrolam sobre si mesmos adquirindo, nas preparações coradas, o aspecto de leishmanias. Em certos casos este fenômeno ocorre já 15 minutos depois da contaminação. Temos observado também o mesmo fato com tripanosomas originários da mesma cultura, os quais também se enrolam dentro ou fora das células. (Fig. 9). Pareceria que as formas intracelulares sofrem involução para leishmanias nesta posição enrolada, seguindo mais tarde o ciclo evolutivo já descrito. As formas extracelulares parecem degenerar e morrer.

Também ao fim da evolução dos tripanosomas em certas células especialmente nas aglomerações formadas na parte central do tecido, observam-se formas arredondadas de leishmanias que rapidamente se transformam em tripanosomas adultos aparentemente por um desenvolvimento do flagelo sem migração do blefaroplasto, seguido do desenrolamento do protozoário sem que se possa observar a fase intermediária clássica de critídia.

Mayer e Rocha Lima (4) já observaram e descreveram em cortes histológicos esta fase final na evolução do *S. cruzi* em animais.

Conseguimos a infecção de um camundongo inoculando-o por via subcutânea com cultura de tecido rica em formas adultas de *S. cruzi*. A infecção revelou-se 14 dias depois da inoculação. A amostra empregada era de origem humana.

Uma cobaia, inoculada com *Schizotrypanum* originário de gambá e mantido permanentemente durante seis meses em cultura de tecido, mostrou-se infectada depois de 30 dias de inoculada. Este fato demonstra que pode manter-se nas culturas a virulência do *Schizotrypanum* durante longo período de tempo.

RELAÇÃO ENTRE AS CÉLULAS E O *S. CRUZI*

Alem da penetração ativa dos flagelados no protoplasma celular pode-se também observar fenômenos de fagocitose exercidos sobre critídias por parte de células macrófagas. Em culturas recentemente contaminadas observa-se que numerosas critídias ficam aderidas pela extremidade posterior à superfície dos macrófagos, como já foi notado por Kofoid e seus colaboradores. Conside-

ramos este fenômeno de adesão puramente acidental, pois há também critídias presas a outros elementos celulares ou inanimados. Naturalmente o fenômeno de adesão aos macrófagos deve ser favorecido pelas condições físicas destas células e especialmente da membrana ondulante que apresentam. Uma vez aderidas as critídias, produz-se englobamento progressivo pela membrana ondulante, até a fagocitose total do protozoário. Observamos também o começo da fagocitose sobre um *T. metacíclico* com adesão e englobamento parcial, mas o tripanosoma se libertou posteriormente graças a seus movimentos ativos.

Certos macrófagos podem fagocitar uma grande quantidade de critídias, formando verdadeiras aglomerações de parasitos. Estas células entram em degeneração e morrem junto com os flagelados nelas contidos. Outros macrófagos que se veem especialmente em culturas de baço e que fagocitam poucas critídias, terminam por destruí-las, o que se observa pela fragmentação do núcleo e do blefaroplasto, sem que a célula apresente fenômenos degenerativos (Fig. 10). Ainda em outros macrófagos deste mesmo tipo as critídias permanecem vivas, se transformam em leishmanias e começam a se multiplicar (Fig. 11).

Em geral os miccitos e fibroblastos parasitados no começo da infecção não apresentam fenômenos degenerativos. Os primeiros, ainda contendo grandes ninhos de multiplicação, continuam a se contrair. Somente se observa um ritmo mais acelerado que o normal, como se estivessem excitados pela presença de flagelados. Mas depois da ruptura da fibra, como acontece com as outras células, degeneram e morrem. Quanto aos fibrocitos, estes podem emigrar normalmente da parte central até à periferia da cultura, levando no seu protoplasma leishmanias em multiplicação.

Por outro lado, esta tolerância das células pelos flagelados nelas contidos já havia sido observada pelos anatomo-patologistas, especialmente ao nível das fibras miocárdias, nas quais não se encontram fenômenos degenerativos, enquanto os ninhos parasitários estão íntegros. A tolerância também é manifestada quando se observam nas culturas células com fenômenos de cariocinese, contendo parasitos no protoplasma.

Foi-nos possível observar que quando as culturas entram em degeneração os parasitos intracelulares também morrem (Fig. 12); este fato, unido à incapacidade das formas leishmanias de evoluir até à forma de tripanosoma quando são extracelulares, pareceria demonstrar a necessidade da vida celular para que se realize certa parte do ciclo evolutivo do *Schizotrypanum* durante a fase de parasitismo nos tecidos dos vertebrados.

RESUMO

Culturas de tecido de embrião de galinha foram contaminadas com *Schizotrypanum* de diversas procedências. Serviram como material de contaminação, culturas em tubos de agar-sangue e em um caso sangue parasitado de cobaia.

Os transplantes de tecidos foram mantidos em cultura de acordo com a técnica de Carrel, ligeiramente modificada.

Os tecidos usados foram baço, miocárdio, fígado, epitélio da iris, gânglio espinhal e monocitos do sangue de galinha adulta.

Em todos estes tecidos o *Schizotrypanum* foi facilmente cultivado, parasitando os diferentes tipos de células existentes: fibroblastos, histiocitos, macrófagos, células epiteliais, células nervosas, etc.

Os autores puderam seguir o ciclo completo do parasito, confirmando os conhecimentos clássicos da sua evolução no tecido: transformação em leishmânia, multiplicação por divisão binária, transformação em critídia e finalmente em tripanosoma adulto.

Tambem observaram formas parasitárias que aparentemente evoluíram diretamente da forma de leishmânia à de tripanosoma, sem passar por critídia.

Conseguiu-se a infecção de um camundongo inoculado com *S. cruzi* de origem humana passado por cultura de tecidos.

Os autores tambem estudam diferentes fenômenos observados nas relações entre as células e os parasitos.

SUMMARY

Chick embryo tissue cultures were smeared with *Schizotrypanum* from different sources. The cultures were inoculated with flagelates from blood-agar cultures and in one instance from blood of an infected guinea-pig.

Carrel's technique of tissue culture, with slight modifications, was employed.

The tissue used were spleen, myocardium, liver, epithelium of the iris, spinal ganglion and monocytes from chicken blood.

In all these tissues the flagellate developed easily, parasitizing different types of cells: fibroblasts, histiocytes, macrophages, epithelial cells, cells of the nervous system, etc.

The authors were able to follow the complete cycle of the parasite, observing its classic evolution: transformation into leishmania, multiplication by binary division, transformation into crithidia and finally into trypanosome.

They also observed forms of the parasite which possibly developed directly from leishmania to trypanosome without apparently going through the crithidia stage.

They succeeded in infecting a white mouse with a human strain of *S. cruzi* after passage through tissue culture.

The authors also pointed out different phenomena observed in the relations between the cells and the parasites.

REFERÊNCIAS

KOFOID C. A., WOOD F. C. and Mc. NEIL E.

1935. The cycle of *trypanosoma cruzi* in tissue culture of embryonic heart muscle — University of California Publications in Zoology. Vol. 41, N.º 3, p. p. 23-24.

VIANNA, Gaspar.

1911. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da "Moléstia de Carlos Chagas" — Mem. Inst. "Oswaldo Cruz", t. III, N.º 2, p. 276.

DIAS, Emmanuel.

1934. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi* — Mem. Inst. "Oswaldo Cruz", t. XXVIII, N.º 1, p. 1.

MAYER, Martin, DA ROCHA LIMA, H.

1914. Zum Verhalten von *Schizotrypanum cruzi* in Warmblütem und Arthropoden. Arch. f. Schiffs. u. Tropenhyg., 18, Beth, 257.

ESTAMPA 1

Fig. 1 — *Cult. 149.* — Baço — Infecção de 3 dias — Fixador Bouin — Coloração Hematoxilina férrica — Critídias — Seta : leishmania em divisão binária.

Fig. 2 — *Cult. 149.* — Baço — Infecção de 3 dias — Fixador Bouin — Coloração Hematoxilina férrica — Formas leishmanias e critídias no protoplasma de um macrófago — Seta : leishmanias em divisão binária.

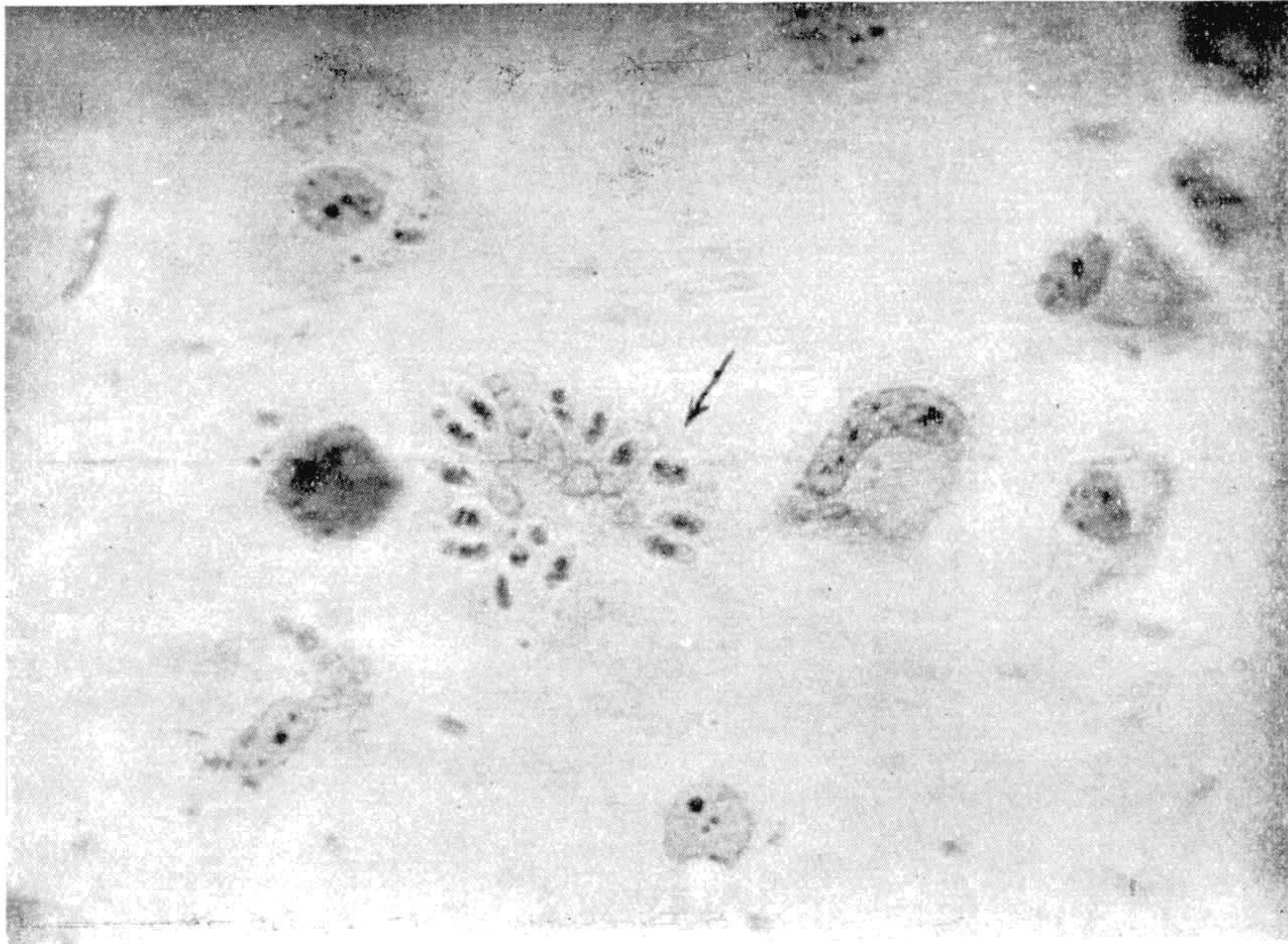


Figura 1

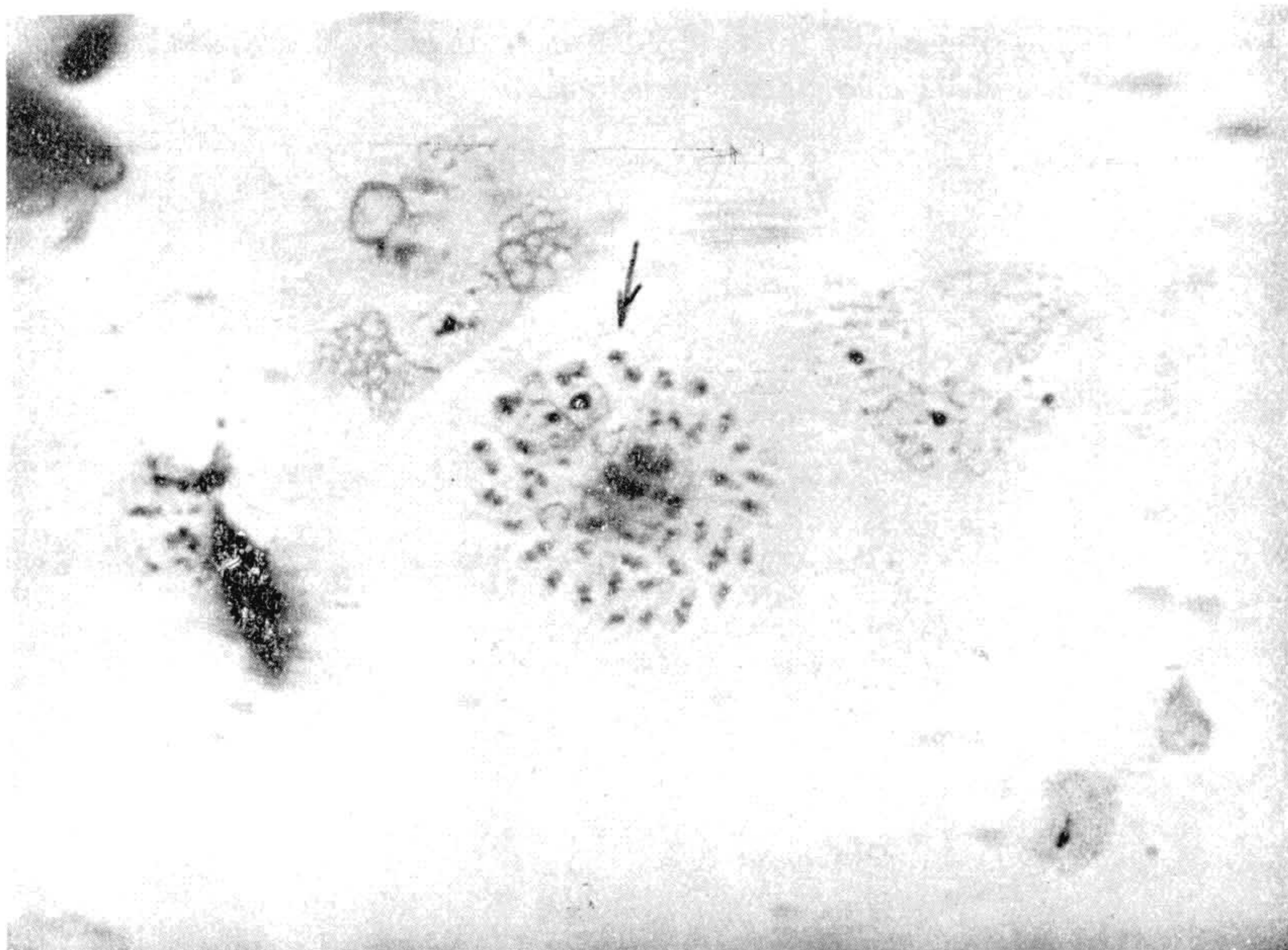


Figura 2

Romaña e Meyer: Cultura de *S. cruzi*

ESTAMPA 2

Fig. 3 — *Cult. 140.* — Baço — Infecção de 18 dias — Fixador Bouin — Coloração Giemsa
— Fibroblasto contendo numerosas formas leishmania e crídiã de *Schizotrypanum*.

Fig. 4 — *Cult. 319.* — Fígado — Infecção 20 dias — Fixador Bouin — Coloração Giemsa
— Células epiteliais do fígado parasitadas.

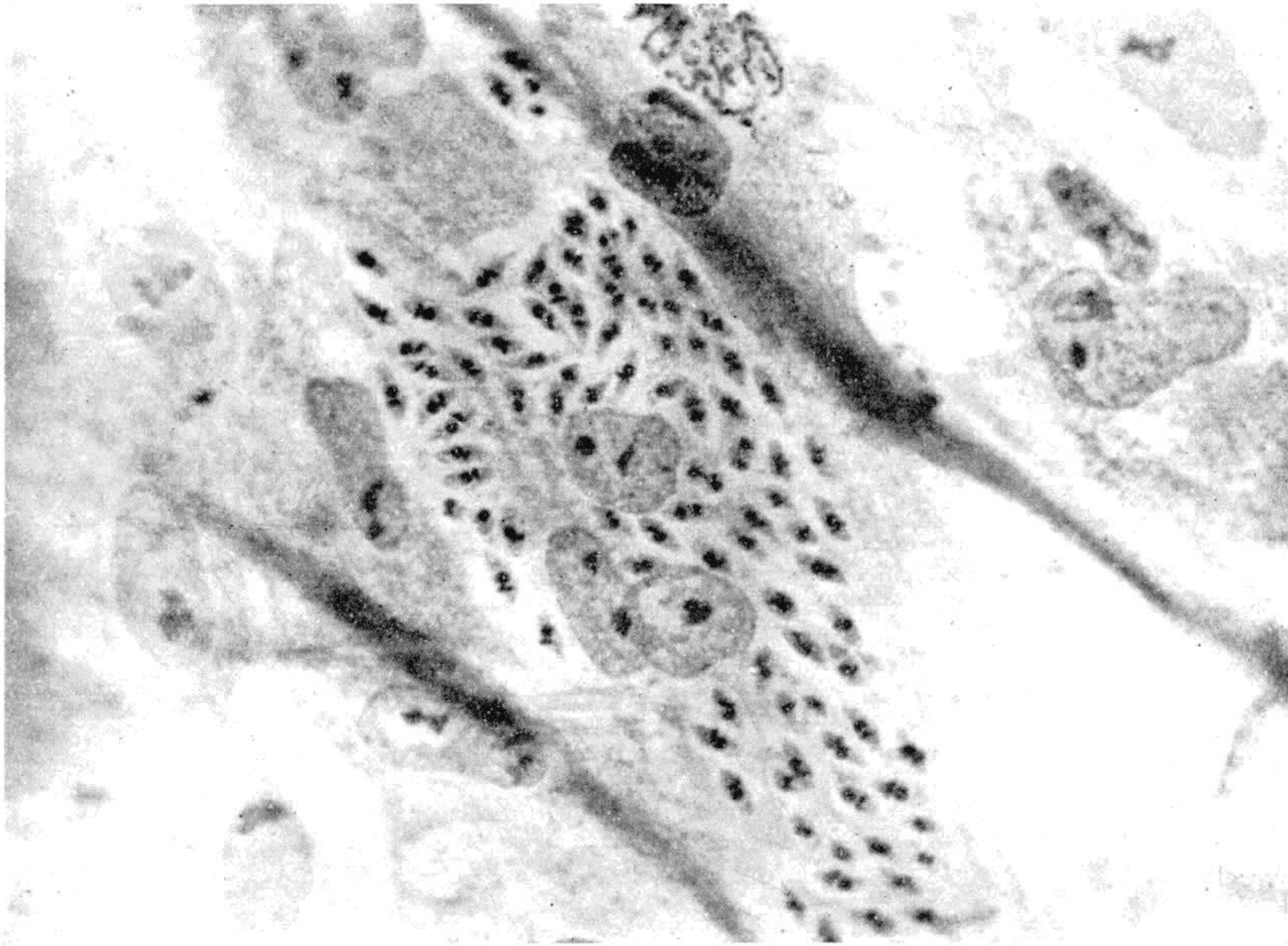


Figura 3

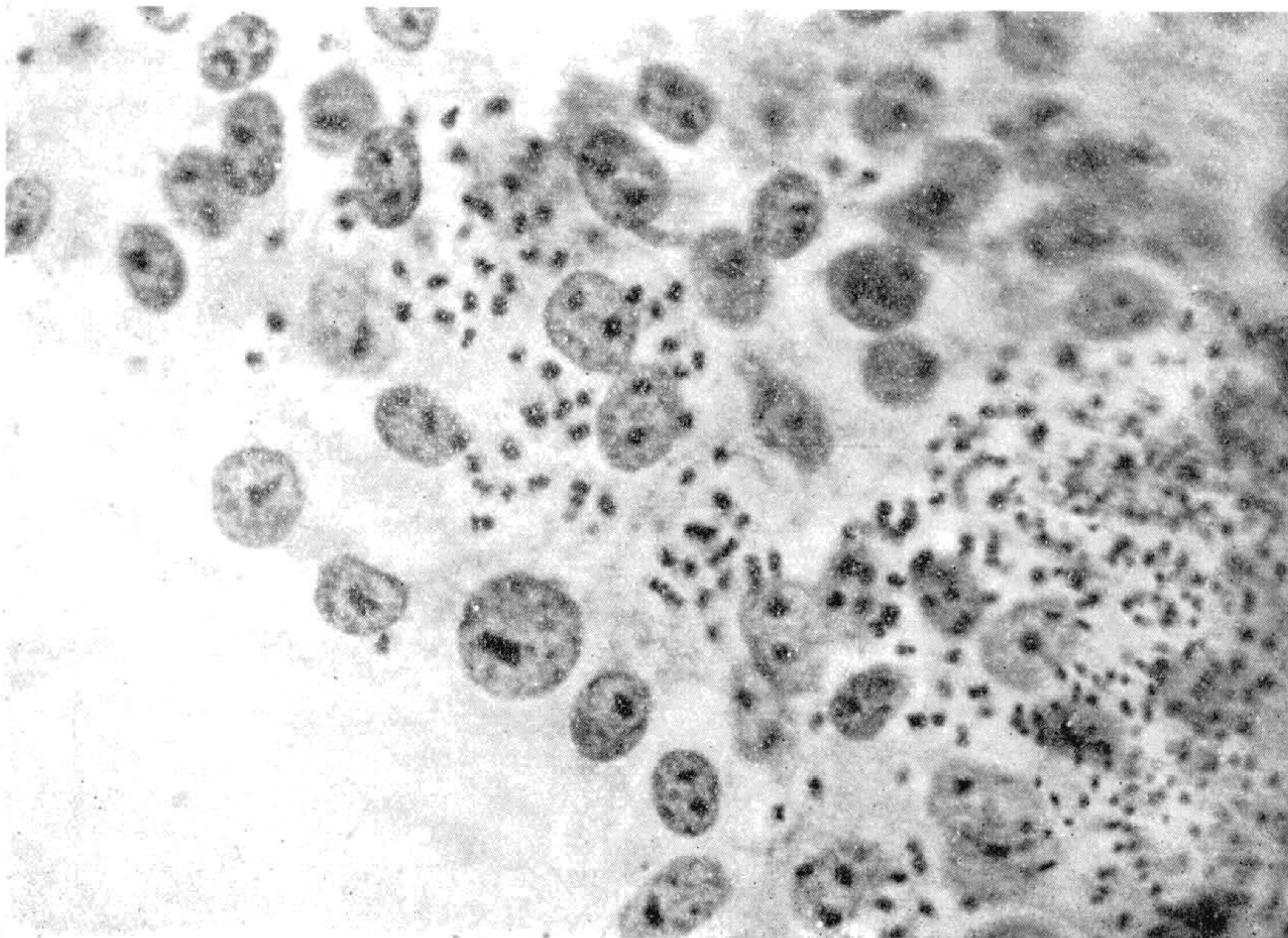


Figura 4

Romaña e Meyer: Cultura de *S. cruzi*

ESTAMPA 3

- Fig. 5 — *Cult. 122.* — Baço — Infecção de 5 dias — Fixador Bouin — Coloração Hemat. férrica — Célula esférica parasitada resultante da retração de um fibrocito — Formas enroladas livres de *Schizotrypanum*.
- Fig. 6 — *Cult. 319.* — Fígado — Infecção 20 dias — Fixador Bouin — Coloração Giemsa — Forma lina, livre de *Schizotrypanum*.

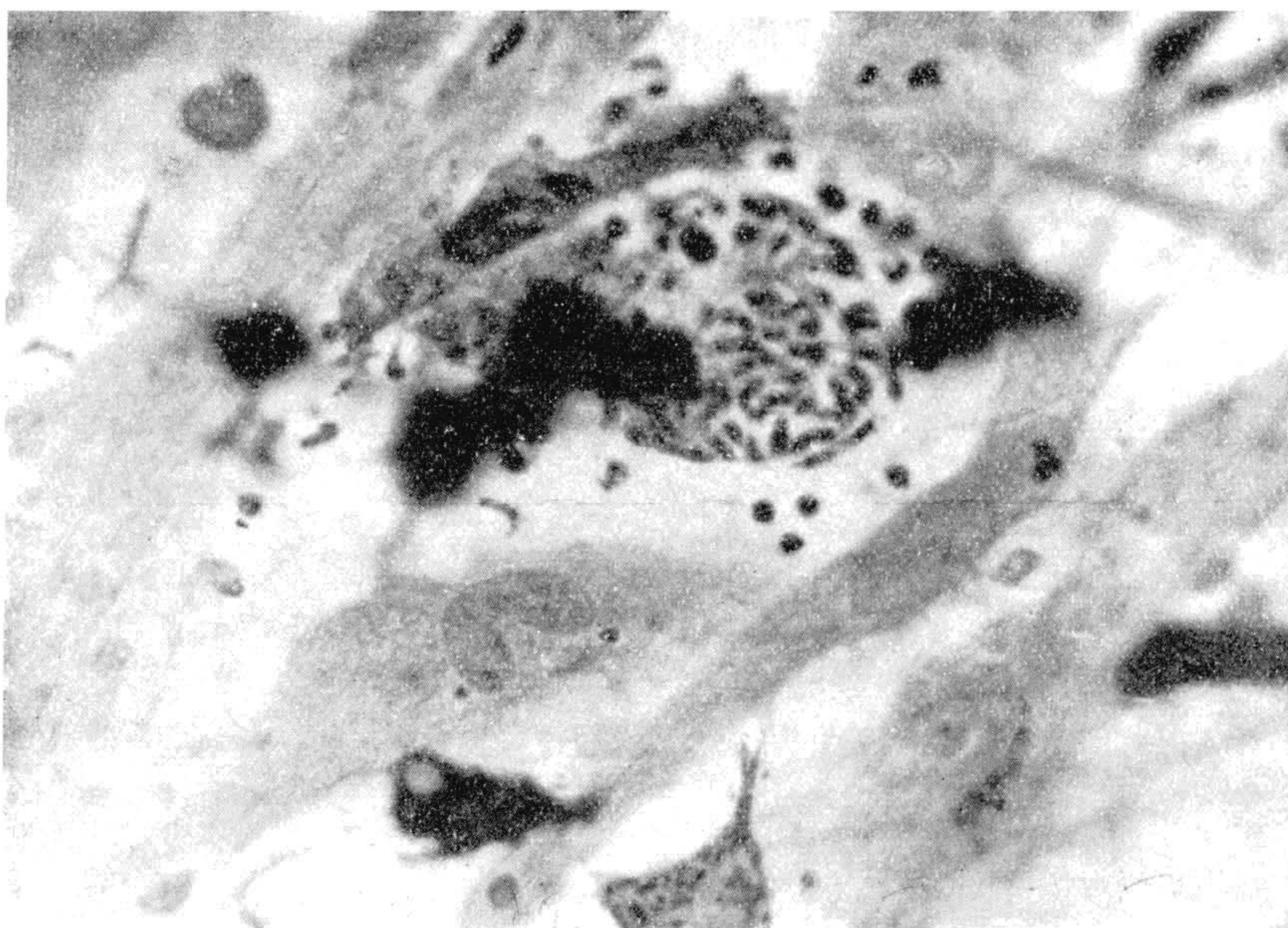


Figura 5

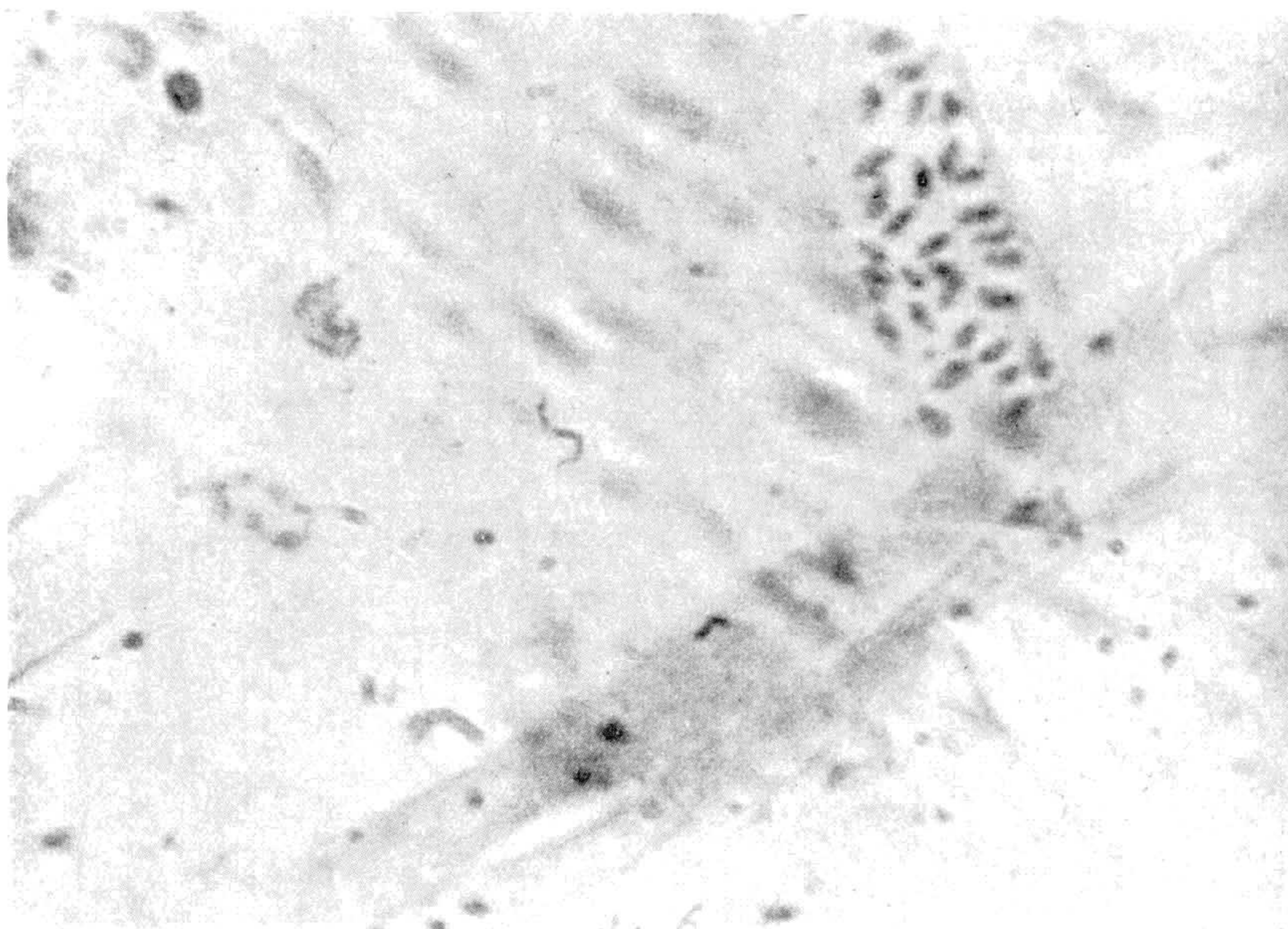


Figura 6

Romaña e Meyer : Cultura de S. cruzi

ESTAMPA 4

Fig. 7 — *Cult. 319.* — Fígado — Infecção de 20 dias — Fixador Bouin — Coloração Giemsa — Formas largas de *Schizotrypanum*.

Fig. 8 — *Cult. 327.* — Fígado — Infecção 12 dias — Fixador Bouin — Coloração Hematoxilina eosina — Célula com numerosas formas de tripanosoma.

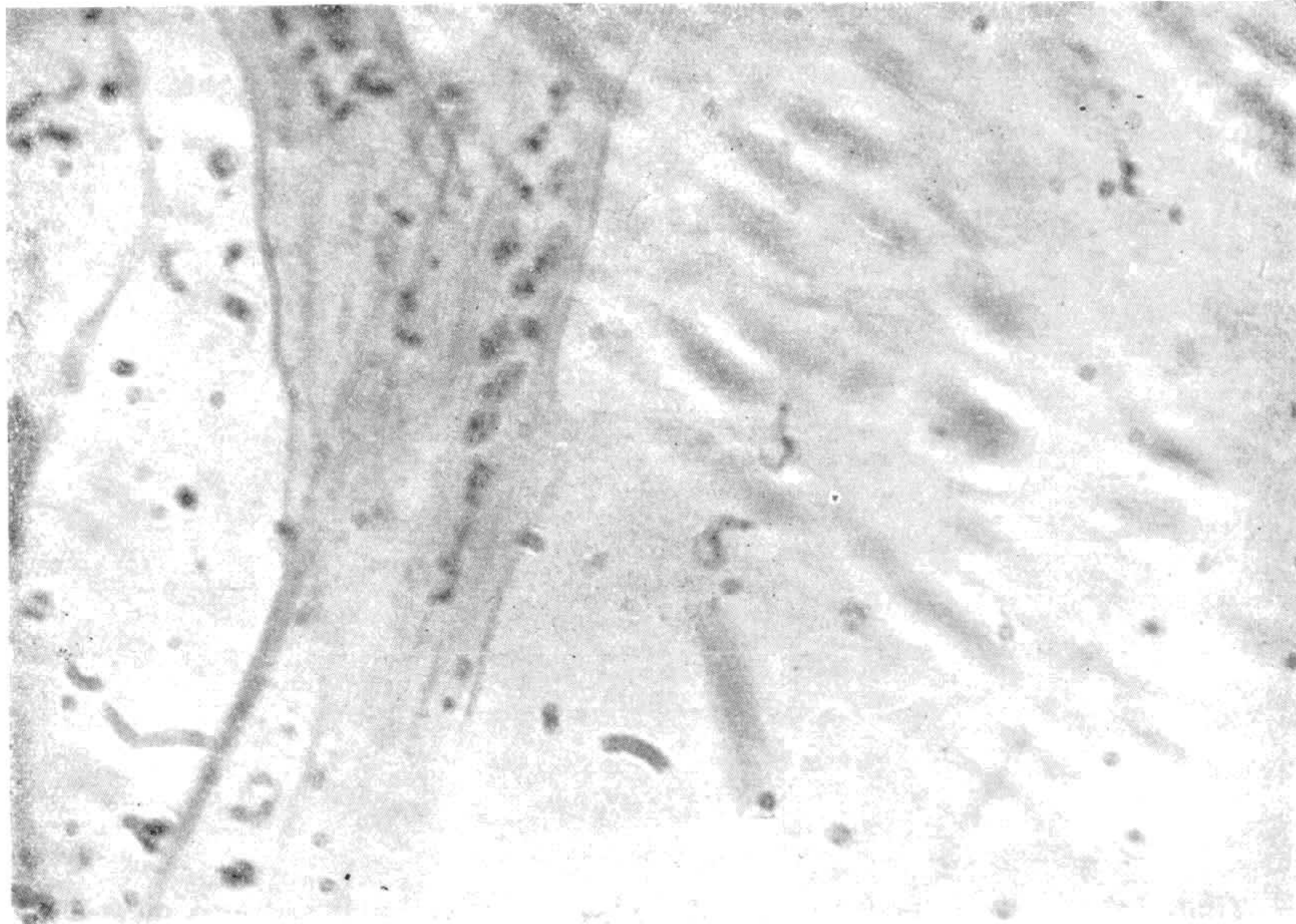


Figura 7



Figura 8

Romaña e Meyer: Cultura de S. cruzi

ESTAMPA 5

Fig. 9 — *Cult. 137.* — Baço — Infecção de 24 horas — Fixador Bouin — Coloração Giemsa — Tripanosomas intracelulares e extracelulares enrolados, depois de 24 horas de contacto entre tecidos novo e antigo — (Célula nova).

Fig. 10 — *Cult. 147.* — Baço — Infecção de 72 horas — Fixador Bouin — Coloração Hematoxilina férrica — Macrófagos com numerosos flagelados em degeneração.

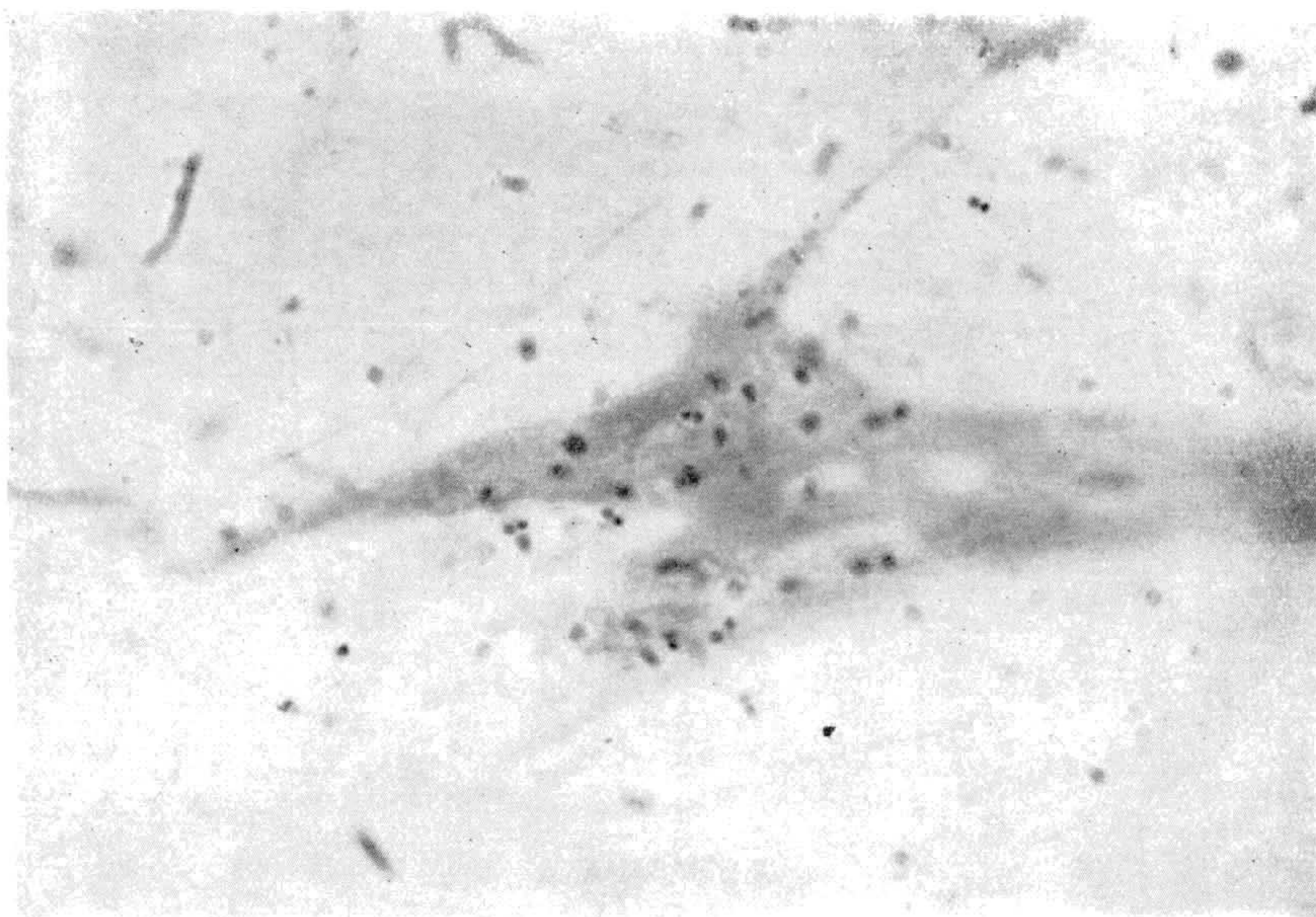


Figura 9

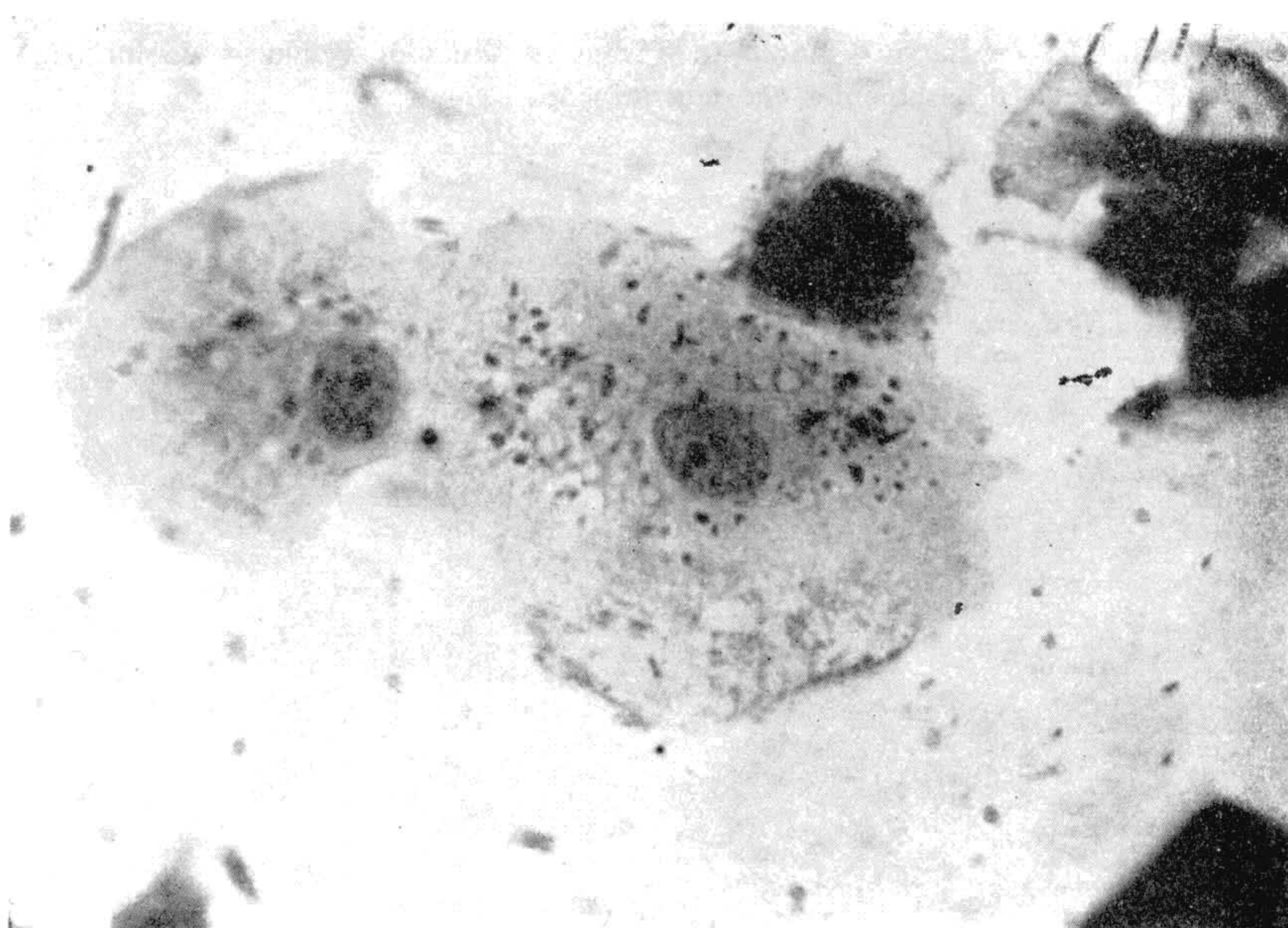


Figura 10

Romaña e Meyer : Cultura de S. cruzi

ESTAMPA 6

- Fig. 11 — *Cult. 147.* — Baço — Infecção de 72 horas — Fixador Bouin — Coloração Hematoxilina férrica — Macrófago com critídias involuindo para leishmanias — Macrófago com critídias destruídas. z
- Fig. 12 — *Cult. 77.* — Baço — Infecção 5 dias — Fixador Bouin — Coloração Giemsa — Células e leishmanias em degeneração.

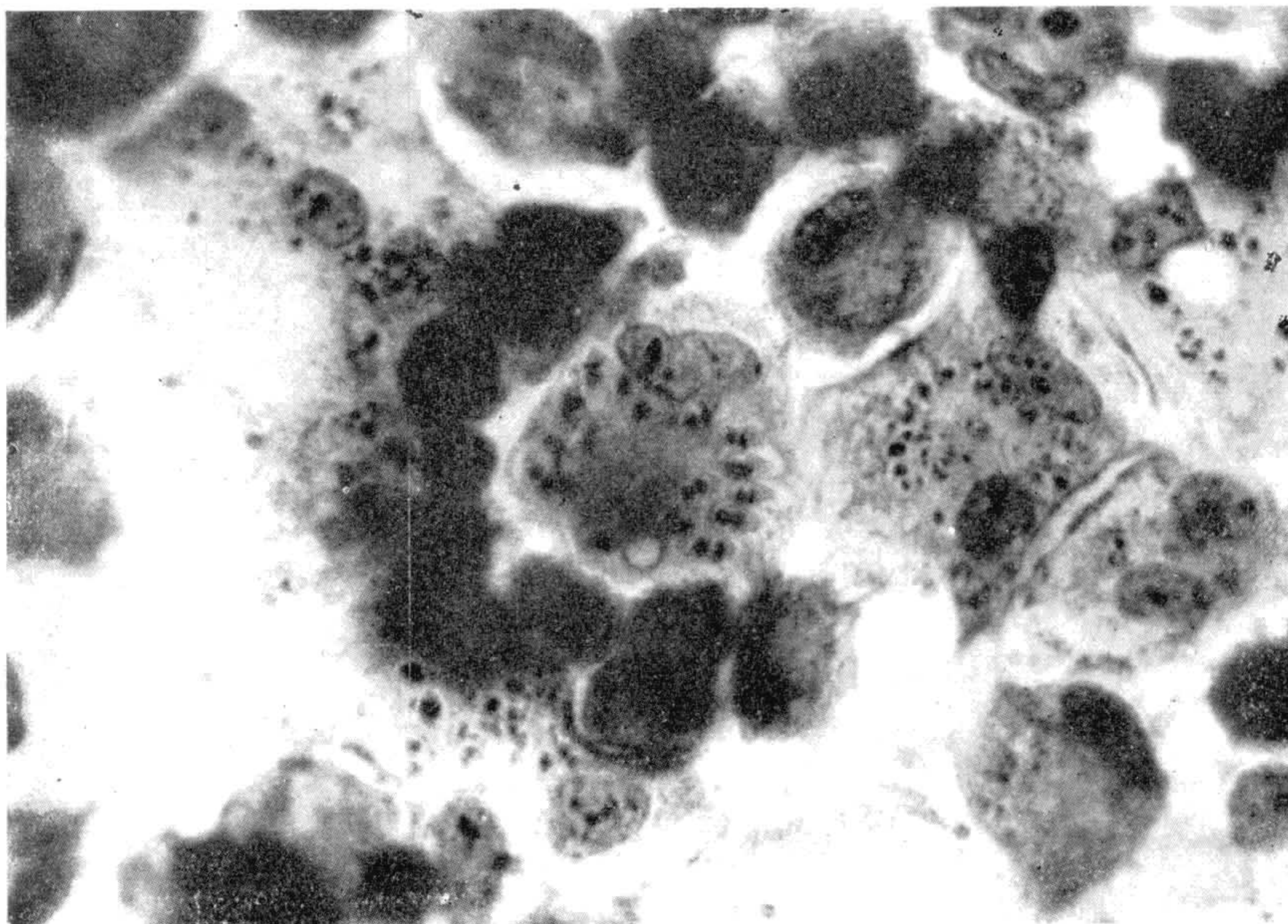


Figura 11

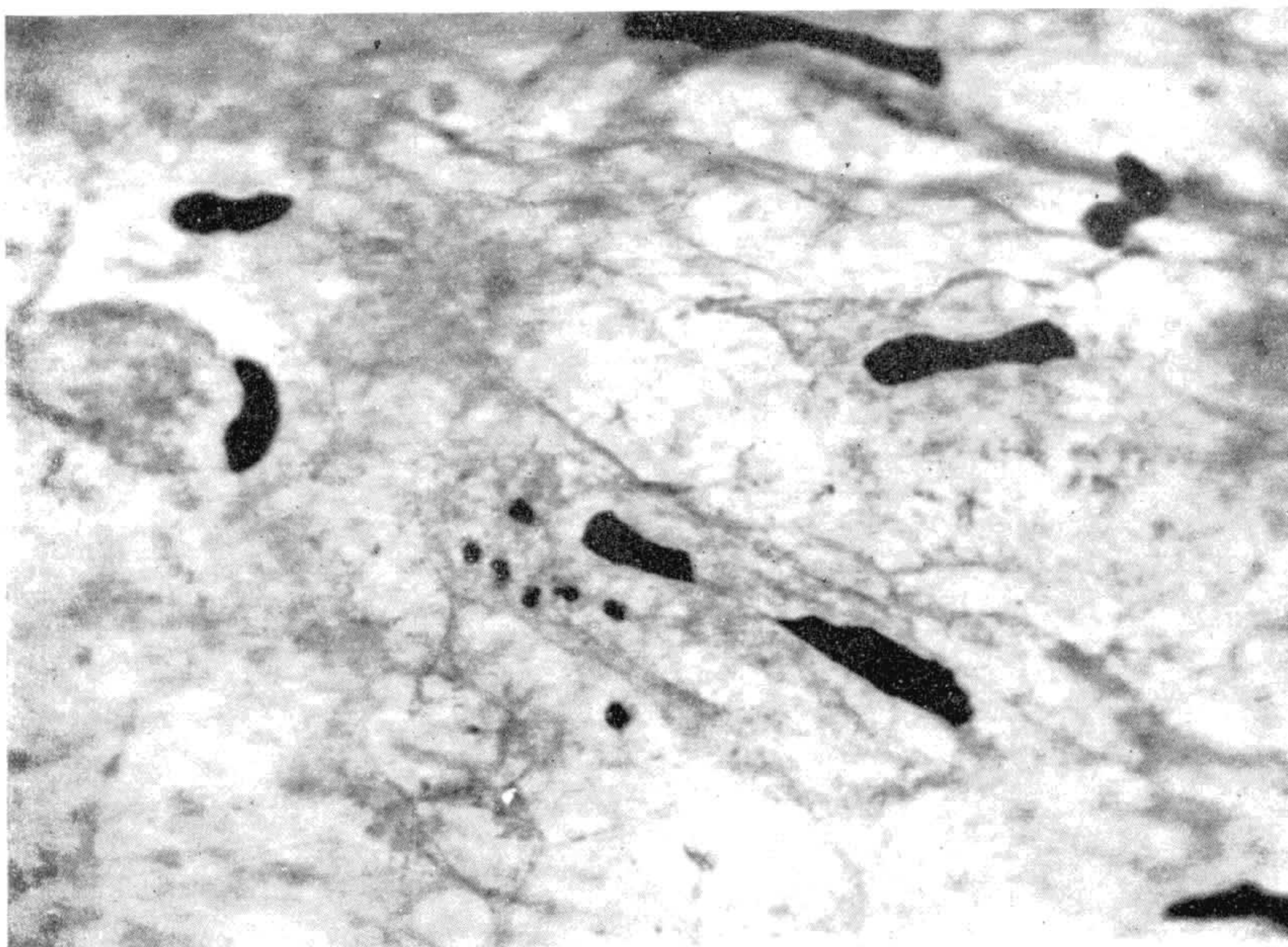


Figura 12

Romaña e Meyer: Cultura de *S. cruzi*