

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo 39

Dezembro, 1943

Fascículo 3

Contribuição ao conhecimento da patogenia da Tripanosomose Americana

(Período inicial da infecção) (*)

Dr. C. Romaña

"Do que observamos parece podermos afirmar que o tripanosomida penetra na célula, multiplica-se por divisão binária, rompe a membrana e sai, motivando nessa ocasião reação grande, na qual, não raro, perecem células nervosas".

(GASPAR VIANNA)

(Com 18 figuras no texto)

O sintético e admirável parágrafo de Gaspar Vianna, acima transcrito, refere-se a lesões por êle encontradas no sistema nervoso central de enfermos que sucumbiram de tripanosomose americana aguda (1). Quando, no mesmo trabalho, descreve as lesões que encontrou no miocárdio e nos músculos estriados, manifesta idênticas idéias, se bem que em forma menos definida.

As experiências relatadas no presente trabalho levaram-nos à convicção de que os conceitos enunciados por Gaspar Vianna constituem fundada base explicativa para as principais lesões anatômicas, assim como para os mais importantes fenômenos patogênicos encontrados na moléstia de Chagas.

A primeira etapa da infecção pelo *Schizotrypanum cruzi* num organismo novo, constituída pela multiplicação do parasito no ponto de entrada, é um fato básico demonstrado por EMMANUEL DIAS e bem conhecido desde seus primeiros trabalhos experimentais (2, 3, e 4).

(*) Trabalho do Instituto de Medicina Regional da Universidade Nacional de Tucumán, Argentina e da Divisão de Estudos de Endemias do Instituto Oswaldo Cruz.

* Recebido para publicação a 7 de outubro e dado à publicidade em dezembro de 1943.

Considerando que é durante o período inicial da tripanosomose, ou melhor, da esquizotripanose, que se pode acompanhar da melhor maneira os fenômenos reacionários desencadeados pela invasão do organismo pelo *S. cruzi*, realizamos numerosas experiências em animais de laboratório que nos levaram a precisar a relação direta entre o parasito e a maior parte dos fenômenos inflamatórios observáveis na infecção,

As referidas experiências permitiram-nos observar como os fatos se desenrolam cronologicamente, bem como confirmar, por outros meios, conclusões anteriores baseadas no estudo de culturas de tecido, relativas à maturação e rutura dos ninhos intracelulares de *S. cruzi* (5).

Experiências efetuadas

No ano de 1941, durante nossa permanência no então Serviço de Estudo das Grandes Endemias, que devemos a honroso convite do saudoso Dr. Evandro Chagas, tivemos oportunidade de praticar inoculações de séries de camundongos brancos, aproximadamente do mesmo peso e idade, com culturas de *Schizotrypanum cruzi* ricas em formas metacíclicas.

Para produzir a contaminação procedíamos à raspagem da pele ao nível da parte interna de uma das coxas, onde depositávamos gotas de cultura. Os animais eram fixados por meio de tiras de esparadrapo em uma tábua e cobertos com um pano até completa dessecação do material infectante. Um camundongo do mesmo lote e raspado do mesmo modo não era exposto à contaminação e servia como testemunha.

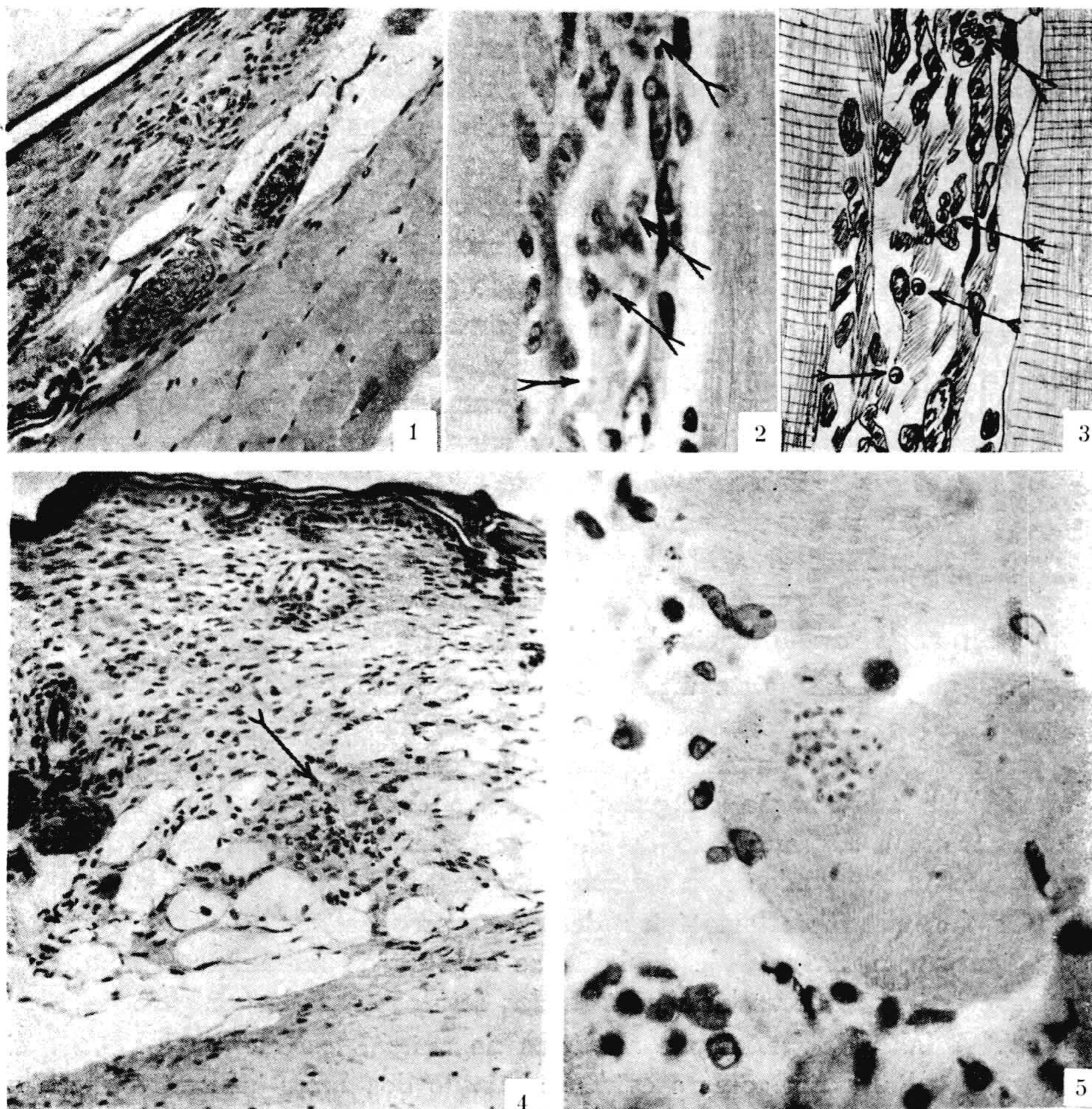
Das séries de camundongos utilizadas, uma foi particularmente valiosa para nossos estudos, pois os cortes histológicos obtidos evidenciaram com clareza os processos desenvolvidos. Os animais eram sacrificados a prazos variáveis depois da exposição ao contágio e retiravam-se pedaços de pele e tecidos subcutâneo do ponto de contaminação, para estudo anátomo-patológico. Usualmente empregamos a fixação pelo formol e a dupla coloração pela hematoxilina-eosina.

Os animais da série em questão levam os ns. 1.238, 1.237, 1.235 e 1.236 do fichário do laboratório do Dr. EMMANUEL DIAS, e foram sacrificados respectivamente 3, 5, 7 e 11 dias depois de contaminados com cultura. O camundongo testemunha, sem número, foi sacrificado no 6.º dia.

No camundongo 1.238, morto no 3.º dia, não pudemos verificar nos cortes nem a presença de formas de multiplicação do *S. cruzi* nem fenômenos inflamatórios (fig. 1).

O camundongo 1.237, sacrificado no 5.º dia, mostrava leishmanias e tripanosomas intracelulares no cório, tecido celular subcutâneo e músculos subjacentes, não havendo infiltração celular em torno das células parasitadas

íntegras. Discreta infiltração era observada em relação direta com os ninhos parasitários rotos, constituída por polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos (êstes em menor número do que aquêles), monocitos, alguns linfocitos e ligeira proliferação histiocitária (fig. 2 e 3).



- N. 1 — Camondongo 1238, três dias. Pele do local contaminado, livre de reação celular e de parasitos.
- N. 2 — Camondongo 1237, cinco dias. Foco de fagocitose no músculo da região contaminada, com parasitos.
- N. 3 — Desenho esquemático da fig. 2 mostrando a localização dos parasitos.
- N. 4 — Camondongo 1236, onze dias. Pandermite e foco de fagocitose no tecido celular subcutâneo.
- N. 5 — Camondongo 1236. Fibra muscular íntegra, subcutânea, parasitada, livre de reação celular.

Leishmanias podiam ser observadas no protoplasma de fagocitos cuja verdadeira natureza era difícil precisar.

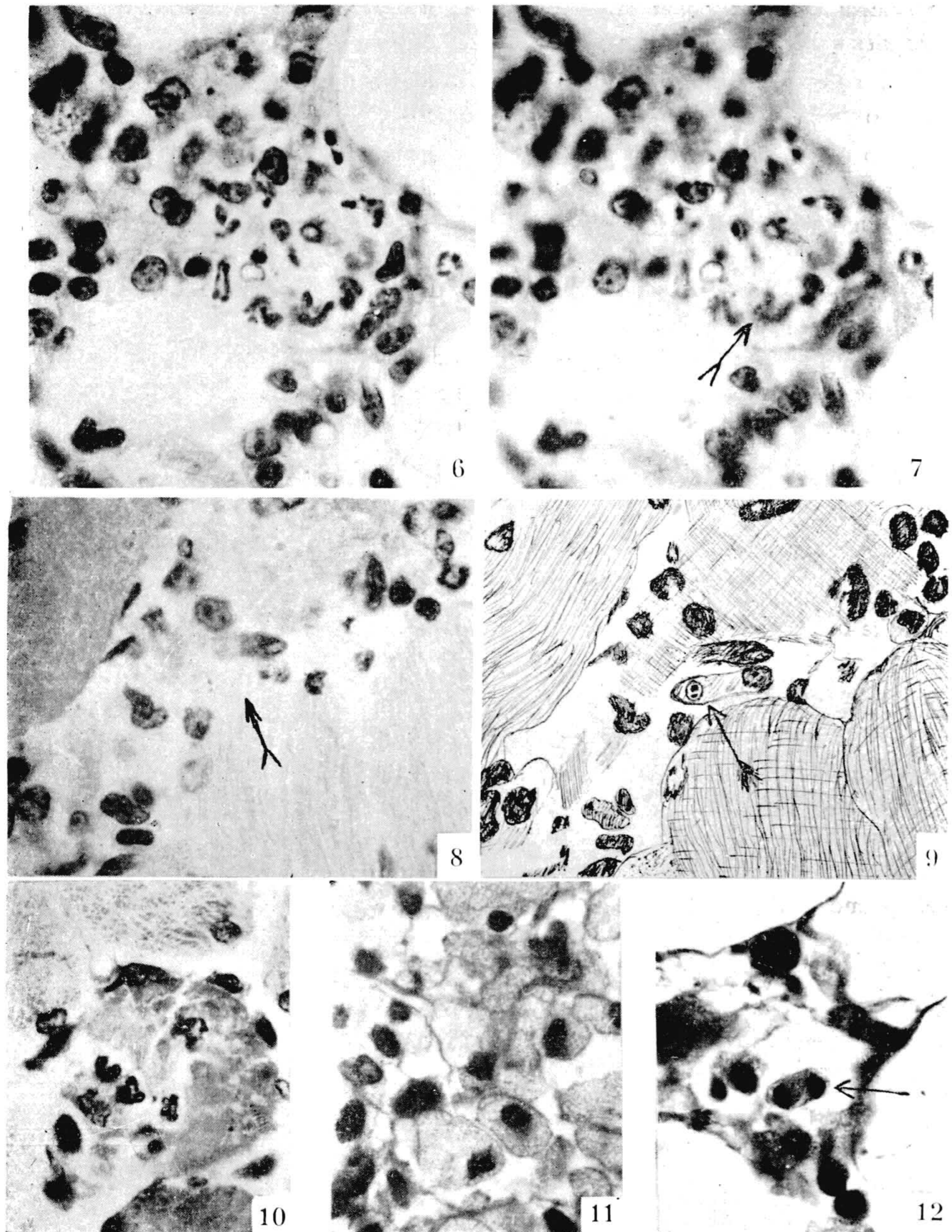
O camundongo testemunha, sacrificado no 6.^o dia, não apresentava fenômenos inflamatórios nos cortes histológicos.

No camundongo sacrificado no 7.^o dia, as células parasitadas eram mais numerosas do que nos demais infectados, anteriormente referidos. Em torno dos elementos íntegros não havia fenômenos reacionais. Também os focos infiltrativos eram mais abundantes; neles, além de células migradoras observava-se a presença de numerosas células de tipo histiocitário, algumas encerrando o *S. cruzi*.

Por último, no camundongo sacrificado no 11.^o dia (1.236) os fenômenos anteriormente descritos eram mais acentuados, em particular os infiltrados celulares que invadiam o cório, o tecido gorduroso subcutâneo e os músculos vizinhos (fig. 4). A inflamação era especialmente intensa no tecido gorduroso, onde eram numerosas as células adiposas parasitadas. Nos focos de infiltração abundavam os polimorfonucleares neutrófilos, monocitos e histiocitos mobilizados contendo no protoplasma leishmanias semi-destruídas ou íntegras (figs. 6-7). No músculo ocorriam fenômenos semelhantes, com fibras parasitadas íntegras sem reação em torno (fig. 5), enquanto que as destruídas ou rotas estavam invadidas por células migratórias que fagocitavam leishmanias e restos nucleares (figs. 8-9). Observavam-se também fibras em degeneração cética com ausência de leishmanias (fig. 10).

Nos preparados deste último camundongo era ainda possível observar edema intersticial do cório e do tecido celular subcutâneo, bem como proliferação do tecido histiocitário denunciada por freqüentes figuras de mitose (fig. 12), e mobilização de grande número de histiocitos. O protoplasma destes mostrava-se carregado de finas gotículas aparentemente de gordura, possivelmente originadas nas células adiposas destruídas (fig 11).

Os fenômenos inflamatórios descritos, progressivamente mais intensos à medida que a antiguidade da lesão se acentuava, podiam ser atribuídos a uma contaminação secundária partida das feridas causadas na pele pela raspagem. A falta de fenômenos análogos no animal testemunha e no sacrificado no 3.^o dia, assim como a evidente relação dos focos infiltrativos com as células destruídas pelos parasitos, não eram argumentos suficientes para efastar a possibilidade indicada. Assim, renunciemos por algum tempo a dar a conhecer estas experiências, até que outras fôssem realizadas de modo a que nos puzessemos a coberto da causa de erro constituída pelas infecções bacterianas intercurrentes originadas ao nível da região traumatizada. Com este intuito, tentamos em diversas ocasiões a contaminação de camundongos adultos através a pele intacta, usando umas vêzes culturas, outras vêzes dejeções de



N. 6 — Camodongo 1236. Foco de fagocitose subcutâneo e infiltração celular, com leishmanias do *S. cruzi*.

N. 7 — Mesmo campo da fig. 6, em outro plano.

N. 8 — Camodongo 1236. Foco de fagocitose em fibra muscular em desintegração, com homogeneização do protoplasma e invasão por células migradoras. A seta indica um macrófago com parasito.

N. 9 — Esquema da fig. 8.

N. 10 — Camodongo 1236. Fibra muscular com degeneração cêrea e invasão por leucocitos neutrófilos em função fagocitária. Não se vêem parasitos.

N. 11 — Camodongo 1236. Histiocitos com protoplasma carregado de gotículas possivelmente de gordura.

N. 12 — Camodongo 1236. Histiocito em divisão no tecido subcutâneo.

barbeiros infectados com *S. cruzi*. Entretanto, os resultados foram negativos, pois nos animais ensaiados não encontramos leishmanias no ponto contaminado (retirado por biopsia) nem tripanosomas ao exame a fresco do sangue (o que, aliás, não exclue a possibilidade de infecções inaparentes).

Resolvemos, então, tentar a infecção percutânea em camundongos recém-nascidos, pensando que a pele dos camundongos adultos representava uma barreira difícil de vencer para os tripanosomas metacíclicos.

Dois lotes de camundongos de um dia foram contaminados. O primeiro constava de quatro animais que foram envolvidos ao nível da região tóraco-abdominal por um pedaço de gaze impregnado de dejeções de barbeiro ricas em *S. cruzi* e assim mantidas juntas durante uma hora até completa dessecação do líquido.

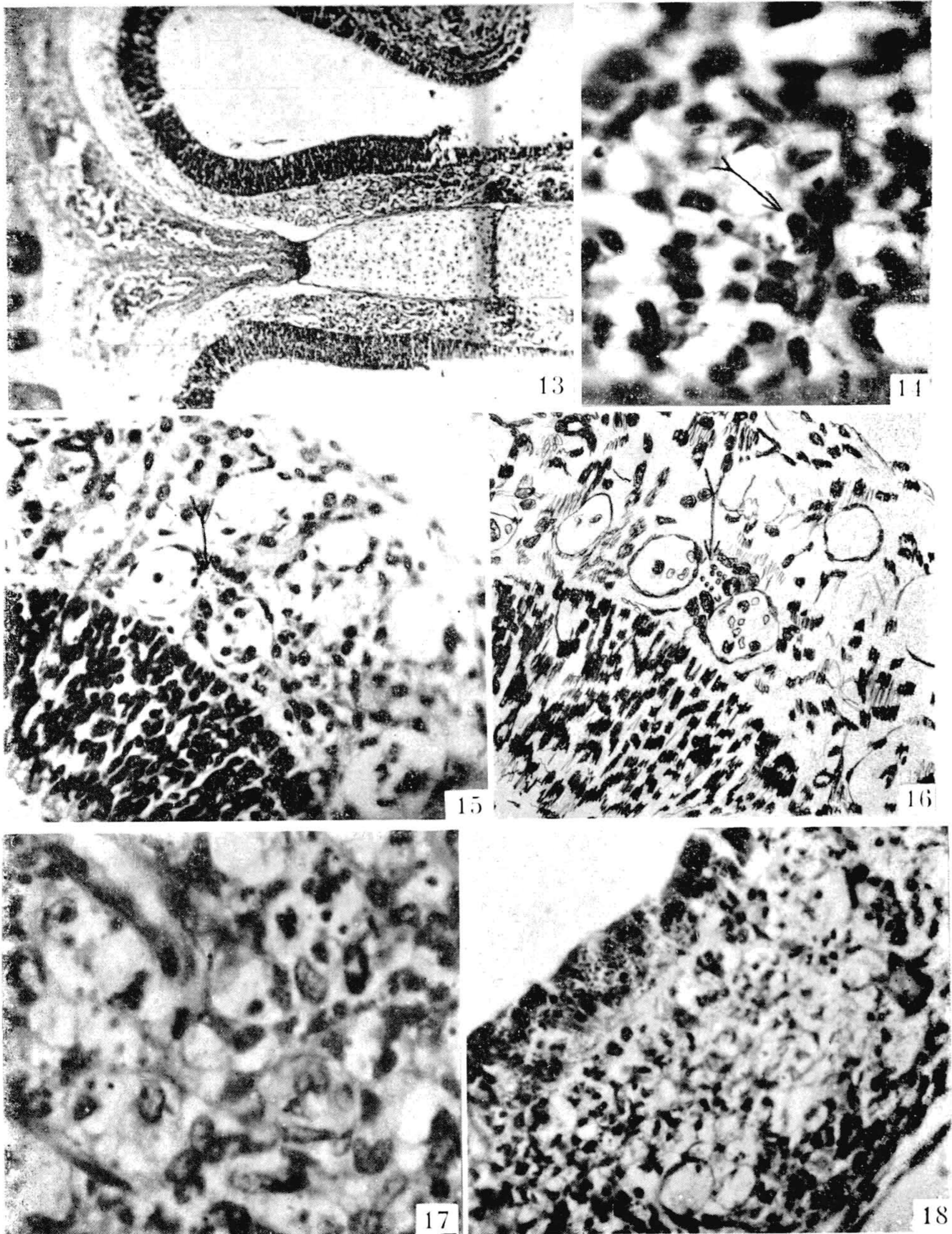
O camundongo n. 25 (fichário de nosso laboratório no Instituto de Medicina Regional de Tucumán) foi sacrificado no quarto dia após a contaminação; os outros três (26, 27 e 28) apresentaram tripanosomas no sangue no sexto dia, sendo sacrificados respectivamente no sexto, oitavo e 13.º dias. Em numerosos cortes histológicos, que compreendiam secções completas de torax e abdome destes animais, não puderam ser encontrados ninhos de multiplicação do *Schizotrypanum cruzi* ao nível da pele.

Diante deste fato inesperado efetuamos a infecção de uma nova série de camundongos de um dia de idade (ns. 81, 82, 83, 84 e 85), colocando-as dentro de um tubo de Borrel contendo dejeções de triatoma ricas em formas metacíclicas. O líquido infectante era suficiente para molhar a superfície do corpo dos animais, sem entretanto submergí-los. Os camundongos foram sacrificados ao cabo de 5, 7, 9, 12 e 15 dias; desde o sexto dia seu sangue estava positivo. Também nesta série o exame histológico da pele foi negativo.

Em vista disto, decidimos efetuar cortes atingindo a bôca e o nariz dos animais dos dois últimos lotes. Tanto num como noutro lote, foi ao nível da zona olfativa das fossas nasais que se encontrou a porta de entrada da infecção. Aí se pode seguir nitidamente o processo de aninhamento do flagelado e o desenvolvimento da inflamação focal subsequente, que em nada differia do anteriormente descrito nos camundongos infectados pela pele.

No camundongo sacrificado no quarto dia (n. 25) já se pode observar leishmanias nas células da camada epitelial e no cório da mucosa olfativa (fig. 13). Os ninhos parasitários estavam íntegros e não havia fenômenos inflamatórios. A parte anterior das fossas nasais, de tipo epitelial plano, não mostrou a presença de flagelados.

No camundongo morto no quinto dia (n. 81) já havia elementos arrebatados com fagocitose de leishmanias por células migradoras (fig. 14), e



- N. 13 — Mucosa nasal de camondongo recém-nascido, principal via de penetração dos parasitos nas experiências relatadas.
- N. 14 — Camondongo 81, cinco dias. Célula parasitada arreventada, vendo-se leishmanias englobadas por um polimorfonuclear.
- N. 15 — Camondongo 82, sete dias. Dilatação de capilares da mucosa nasal. Elemento parasitado arreventado, indicando a seta leishmanias livres com células migradoras de permeio.
- N. 16 — Reprodução esquemática da fig. 15.
- N. 17 — Grande proliferação parasitária, com destruição de leishmanias. Infiltração por polimorfonucleares e proliferação histiocitaria.
- N. 18 — Intensa proliferação de leishmanias acompanhada de infiltração celular por histiocitos e polimorfonucleares.

ninhos de parasitos sob a forma de tripanosoma. Diversos focos inflamatórios compostos por polimorfonucleares, macrófagos e histiocitos apareciam no cório da mucosa. Fenômenos análogos foram observados no camundongo n. 26 (sexto dia).

O animal n. 82 (sétimo dia) mostrava ninhos de *S. cruzi* na mucosa do sépto, cornetos e zona olfativa. As células parasitadas eram muito mais facilmente localizáveis e abundantes do que nos precedentes, assim como os focos inflamatórios nos quais era fácil ver leishmanias e tripanosomas livres. Os capilares e precapilares da mucosa mostravam-se dilatados e congestos, podendo notar-se polimorfonucleares no interior (fig. 15-16). Parasitos foram localizados no pulmão (parenquima, brônquios e paredes de vasos), o que faz supor que neste animal o líquido infectante penetrou até o pulmão por aspiração. Nos demais órgãos não foram achados parasitos.

O camundongo n. 83 (9.º dia) mostrava na mucosa nasal grande quantidade de ninhos de *S. cruzi* e pronunciada infiltração por histiocitos e polimorfonucleares. Havia grande quantidade de leishmanias em vias de degeneração. No pulmão e no coração, escassas localizações parasitárias, possivelmente estabelecidas por via endógena no primeiro e certamente no segundo órgão.

Nos camundongos sacrificados no 12.º, 13.º e 15.º dias os fenômenos descritos se acentuaram progressivamente.

Nas fossas nasais os ninhos de *S. cruzi* invadiam todos os tecidos superficiais e profundos em relação à mucosa (músculos, glândulas, tecido celular subcutâneo, etc.) chegando até às vizinhanças da pele e da mucosa bucal. Os fenômenos inflamatórios se intensificaram consideravelmente, provocando a morte de grande número de células e de enorme quantidade de parasitos (figs. 17-18), desprendendo-se em certos lugares fragmentos de epitélio e de cório carregados de elementos degenerados. Além disto, em quase todos os órgãos dos camundongos havia parasitos, neles localizados pela generalização da infecção.



A contaminação através a pela raspada de macacos, cobaias e cãesinhos, com biopsias sucessivas do ponto de contaminação, já nos havia mostrado processos inflamatórios e de multiplicação do *S. cruzi* análogos ao que acabamos de descrever; porém, como as experiências foram feitas em condições análogas às do primeiro lote de camundongos deste trabalho, sua descrição seria repetição inútil. Além disto, êsses ensaios mereciam as mesmas restrições feitas a respeito dos primeiros camundongos, isto é, poderia ser aventada a

ocorrência de possíveis infecções secundárias ao nível do tegumento lesado, obstando a correta interpretação das reações locais à invasão pelo *S. cruzi*.

Não obstante, o encontro dos fenômenos descritos em outros animais de laboratório além dos referidos camundongos, reforça o valor das experiências efetuadas nestes últimos animais, já relatadas.

Discussão e conclusões

As experiências que vimos de relatar, realizadas com o fim de investigar os processos patogênicos iniciais da esquizotripanose, sugerem algumas considerações e permitem algumas conclusões interessantes sobre diversas questões, como por exemplo o mecanismo de contaminação, o período de incubação, a formação dos fenômenos inflamatórios e as relações entre o parasito e as alterações patológicas determinadas por êle no ponto de penetração no organismo.

Em primeiro lugar, ressaltaremos a dificuldade da obtenção da infecção experimental em camundongos por contaminação da pele intacta com formas metacíclicas do *S. cruzi*, que se torna muito fácil havendo soluções de continuidade na barreira córnea tegumentar. Experiências anteriores já haviam deixado bem evidente êste fato: CARDOSO (7), depositando dejeções de triatomas infectados em 20 camundongos, obteve infecção aparente em 10 cuja pele foi ligeiramente escarificada, ao passo que nos outros 10, cuja pele não foi tocada, não mostraram infecção aparente. Também BRUMPT (8), trabalhando com 11 camundongos, jovens mantidos em atmosfera úmida durante três horas, conseguiu verificar a infecção em apenas um animal. Entretanto, se ao decorrer das presentes investigações não conseguimos a transmissão através a pele não escarificada, nas condições referidas, em ensaios inéditos com quatro camundongos obtivemos resultados positivos em três, renovando durante duas horas as dejeções contaminadas postas em contacto com a pele íntegra da parte posterior do pescoço.

Cabe ainda recordar que DIAS (4) também relata em sua tese resultados positivos de infecção percutânea em cobaias (4 em 6) e em camundongos brancos (5 em 6).

Quanto ao que pudemos verificar com relação às mucosas, parece que a mucosa bucal dos camundongos jovens não é via de penetração tão favorável quanto a mucosa nasal, que é permeável sobretudo ao nível da zona olfativa. Demonstra-o o fato de que nove animais se infectaram por esta via, a julgar pela localização ao seu nível de abundantes formas parasitárias, permanecendo livre de células parasitadas a mucosa bucal. A contaminação ex-

perimental destes camundongos pela mucosa nasal é sugestiva de que o mesmo fato deva poder ocorrer nas infecções humanas, conforme já se tem suspeitado; deve pensar-se nesta possibilidade nos casos agudos recentes sem porta de entrada aparente, com o fim de procurar verificá-la.

Nas experiências relatadas pudemos observar como, durante o primeiro período de multiplicação intracelular do *Schizotrypanum cruzi*, não ocorrem fenômenos infiltrativos celulares, que só aparecem quatro ou cinco dias depois da contaminação, em seguida às primeiras rupturas de elementos celulares parasitados. Esta ruptura pode dar-se não só quando os parasitos atingem a forma de tripanosoma, como também quando eles se acham sob a forma imatura de leishmania, conforme também o observamos em culturas de tecidos (5).

Observando em conjunto os resultados fornecidos por estas experiências, podemos dizer que os tripanosomas metacíclicos infectantes penetram nas células do ponto de contaminação (histiocitos do cório, células adiposas do tecido celular subcutâneo, fibras musculares vizinhas), onde se multiplicam rapidamente. Confirmamos assim, mais uma vez, um fato fundamental para a patogenia da esquizotripanose, o de que a principal sede da multiplicação parasitaria inicial constitue-se ao nível dos tecidos do ponto de penetração do flagelado (EMMANUEL DIAS) (4). Quando se rompem as células parasitadas, os protozoários caem no meio intercelular, ganhando daí a circulação linfática ou sanguínea.

E' no momento da ruptura celular que se observam os primeiros fenômenos inflamatórios, constantes da afluência ao local de numerosas células migratórias, leucocitos polimorfonucleares, monocitos, linfocitos e da mobilização e proliferação do tecido histiocitário regional. Observa-se o englobamento, por alguns destes elementos, de parasitos e de restos celulares, constituindo-se os pequenos nódulos infiltrativos a que se pode chamar focos de fagocitose.

Pôde-se apreciar que muitos dos parasitos englobados são destruídos no protoplasma dos fagocitos, que encerram restos de núcleos e de blefaroplastos; em outros casos a fagocitose é ineficaz, constituindo-se então novos ninhos de multiplicação intracelular, especialmente a expensas dos histiocitos. Formam-se assim focos de infiltração mais extensos, nos quais se observa uma mistura de células infiltrativas, de histiocitos proliferados e de novos ninhos parasitários.

Êstes fenômenos são mais visíveis depois do 5.º dia de contaminação. Como nem todos os parasitos intracelulares chegam à maturidade em quatro ou cinco dias, juntamente com os primeiros ninhos amadurecidos, é possível

observar-se nos dias subsequentes, junto aos focos de fagocitose descritos, células parasitadas íntegras livres de qualquer reação em tórno.

À medida que aumentam em número as células destruídas pela multiplicação parasitária, aumenta a infiltração celular, adquirindo a reação um caráter mais difuso, onde é sempre possível identificar focos de fagocitose recentes. Esta infiltração se faz acompanhar de edema do cório, do tecido celular subjacente e de diapedese leucocitária através das paredes dos vasos que aparecem dilatados.

No tecido adiposo a inflamação adquire particular intensidade, vendo-se numerosas células gordurosas destruídas e invadidas por células migradoras no exercício de ativa fagocitose de leishmanias e de restos celulares.

Nos músculos vizinhos desenvolve-se uma miosite focal provocada também pela destruição das fibras musculares ou de outros elementos parasitados, seguida de migração celular. Algumas fibras mostram degeneração cêrea e invasão por macrófagos, sem a presença de parasitos no seu interior; é possível que uma "noxina" libertada pela rutura e morte dos parasitos possa ser a causa determinante dos fenômenos degenerativos observados nestes casos (MAYER & ROCHA LIMA, 6). Outras mostram, além de degeneração, restos de leishmanias e fagocitos em atividade.

Poude observar-se, em geral, que nos cortes de pele retirados mais tardiamente o parasitismo celular e os *fenômenos inflamatórios focais recentes* eram mais acusados no tecido celular subcutâneo e nos músculos vizinhos do que nas regiões mais superficiais, nas quais eram mais notáveis fenômenos residuais infiltro-proliferativos.

E' interessante fazer notar a fugacidade das reações de tipo francamente agudo, acompanhadas de exsudação polimorfonuclear, que deve ser surpreendida imediatamente depois da rutura dos ninhos de *Schizotrypanum cruzi*.

Chama também a atenção a precocidade da reação histiocitária, que desde o primeiro momento adquire marcado caráter proliferativo que se acentua à medida que o processo se faz mais antigo.

Para concluir do exposto, consideramos perfeitamente exato o ponto de vista clássico de GASPAR VIANNA a propósito da sucessão dos fenômenos de parasitismo e a reação provocada pelo *S. cruzi* nos vertebrados sensíveis, ao menos no que diz respeito à porta de entrada da infecção experimental.

Agradecimentos. — O autor expressa seu agradecimento ao Dr. EMMANUEL DIAS pelas facilidades de trabalho que lhe proporcionou no seu laboratório e pela tradução do presente artigo para o Português. Sinceramente agradece, também, ao Dr. HENRIQUE ARAGÃO, pela honrosa oportunidade, que lhe concedeu, de publicá-lo nas Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

REFERÊNCIAS

VIANNA, GASPAR

- (1) 1911 — Contribuição para o estudo da anatomia patológica da moléstia de Carlos Chagas. Esquizotripanose humana ou tireoidite parasitária. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 3 (2) : 276-294.

DIAS, EMMANUEL

- (2) 1932 — Le *Trypanosoma cruzi* pendant les premières phases de l'infection expérimentale.
C. R. Soc. Biol., Paris, 110 : 203-205.
- (3) 1932 — Le *Trypanosoma cruzi* et ses rapports avec le système réticulo-endothélial.
C. R. Soc. Biol., Paris, 110 : 206-210.
- (4) 1934 — Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*.
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 28 (1) : 1-111.

ROMAÑA, C. & MEYER, H.

- (5) 1942 — Estudo do ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* em culturas de tecidos de embrião de galinha.
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 37 (1) : 19-27.

MEYER, M. & ROCHA LIMA, H. DA

- (6) 1912 — Zur Entwicklung von *Schizotrypanum cruzi* in Säugetieren. Arch.f. Schiffs.-u. Tropenhyg. 16 (4) : 90-93.

CARDOSO, F. A.

- (7) 1938 — Sur le mécanisme de la transmission de la maladie de Chagas. Annales Parasit. Hum. & Comp. 16 (4) : 341-349.

BRUMPT, E.

- (8) 1913 — Immunité partielle dans les infections à *Trypanosoma cruzi*. Transmission de ce trypanosome par *Cimex rotundatus*. Rôle régulateur des hôtes intermédiaires. Passage à travers la peau.
Bull. Soc. Path. Exotique, 6 : 173-177.