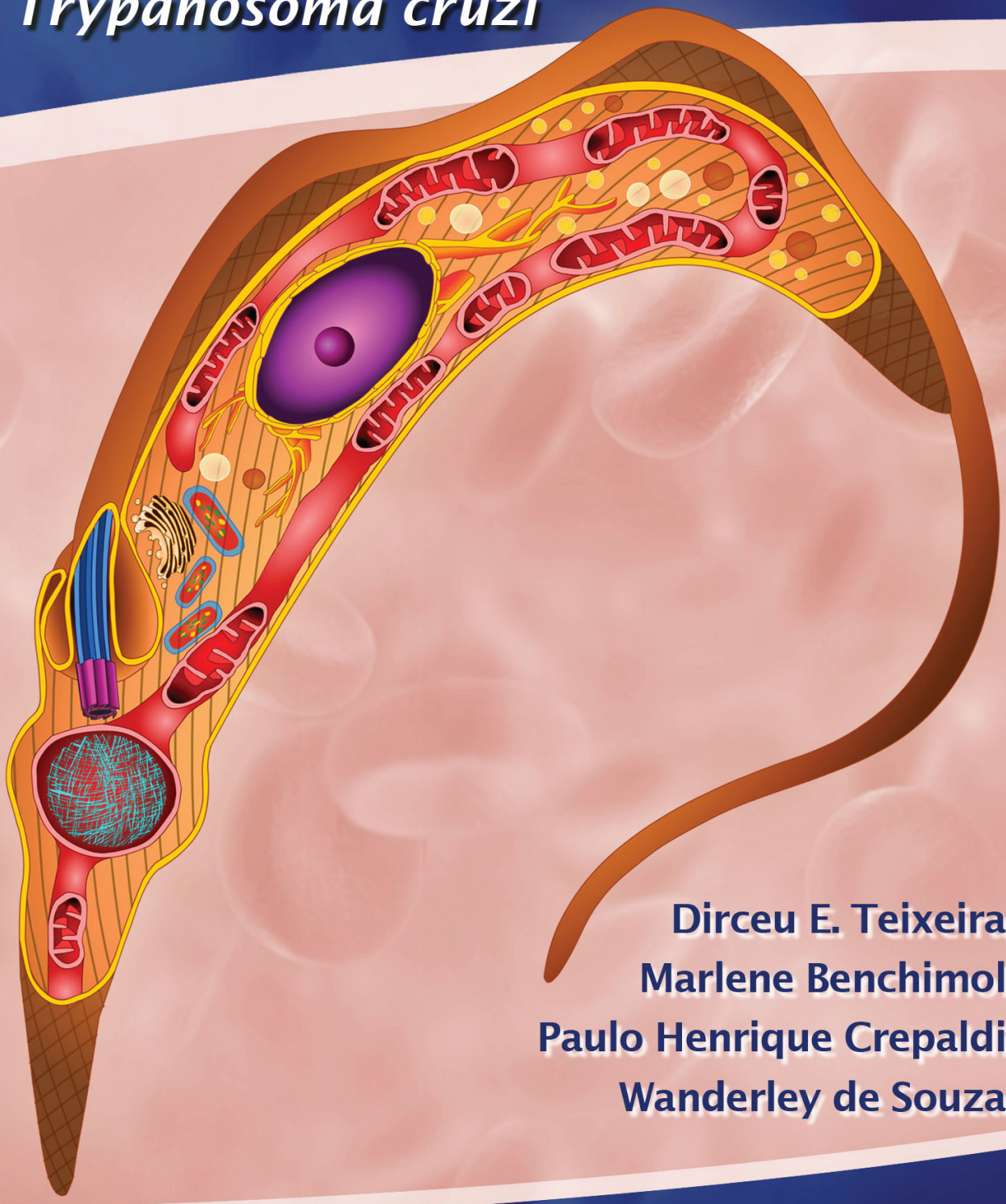
Atlas didático

Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*



Dirceu E. Teixeira
Marlene Benchimol
Paulo Henrique Crepaldi
Wanderley de Souza

Atlas didático

Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

1ª Edição

Dirceu E. Teixeira
Marlene Benchimol
Paulo Henrique Crepaldi
Wanderley de Souza

Fundação CECIERJ
Consórcio cederj

Rio de Janeiro
2011

Nota biográfica dos autores

Dirceu Esdras Teixeira, graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Santa Úrsula, três anos de experiência como professor assistente de Biologia nessa universidade e seis anos como designer instrucional em EaD na Fundação CECIERJ/Consórcio CEDERJ, trabalhando na roteirização de *storyboards* para as aulas do curso de Ciências Biológicas, no setor WEB-Biologia. Possui mestrado em Ciências do Mar, atualmente cursa doutorado em Educação, Difusão e Gestão em Biociências no Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro e trabalha como acadêmico no setor de pesquisa do CEDERJ.

Paulo Henrique Crepaldi, graduado em Computer Arts pela Blinn College (Texas, USA). Atualmente é designer gráfico e animador 3D da Fundação CECIERJ/Consórcio CEDERJ.

Marlene Benchimol, pesquisadora 1 A pelo CNPq e Cientista do Nosso Estado da FAPERJ. Possui graduação, mestrado e doutorado pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Fez pós-doutorado no exterior na Universidade de Illinois e diversos estágios em centros de pesquisa internacionais. Atualmente é professora aposentada pela UFRJ e titular da Universidade Santa Úrsula, chefiando o Laboratório de Ultraestrutura Celular.

Wanderley de Souza, possui graduação em Medicina pela Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, mestrado em Ciências Biológicas (Biofísica) e

doutorado em Ciências Biológicas (Biofísica), ambos pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Pesquisador 1 A do CNPq e Cientista do Nosso Estado da FAPERJ. Atualmente é professor titular da UFRJ e Diretor de Programas do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial-RJ. Membro Titular da Academia de Ciências, da Academia Nacional de Medicina e da Academia de Ciências do Mundo em Desenvolvimento.

Capa

Esquema do *Trypanosoma cruzi*. Ilustração: Ricardo Amaral / Diagramação: Paulo Crepaldi.

Teixeira, Dirceu E.

Atlas didático: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* / Dirceu Esdras Teixeira ... [et al.]. – Rio de Janeiro : Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, 2011.

50p. : il. color.

Inclui bibliografia.

ISBN 978-85-7648-767-8

1. Educação de Biologia e Parasitologia. 2. Protozoa. I. Título.

CDD-616.936.3

Prefácio

O ensino da Parasitologia no Brasil é ministrado com base em material disponível nos livros clássicos, constituído por fotografias e esquemas que, em geral, não mostram os avanços obtidos nos últimos anos. Aspectos como o ciclo biológico dos vários protozoários, a compreensão da sua organização estrutural e os ciclos bioquímicos que ocorrem em várias organelas são pontos de fundamental importância, uma vez que o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e de novas terapias baseia-se nos conhecimentos adquiridos nos últimos anos. Neste sentido, produzimos o material sobre o ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* em versão gráfica e em DVD, a serem disponibilizados gratuitamente, com os seguintes conteúdos: (a) esquemas bidimensionais e tridimensionais coloridos que mostrem o ciclo biológico no hospedeiro vertebrado e invertebrado; (b) animações e esquemas tridimensionais que mostrem a organização ultraestrutural das várias formas de desenvolvimento; (c) vídeos e imagens que mostrem aspectos importantes do comportamento biológico do *Trypanosoma cruzi*. Exemplos incluem: motilidade, invasão da célula hospedeira, processo de divisão celular, atividade endocítica da forma epimastigota e o destino do material. No conjunto, esperamos que este material didático contribua para melhorar o conhecimento científico e as aulas dos professores, sobretudo nos ensinos fundamental e médio, que poderão utilizar todo o material aqui gerado.

Agradecimentos especiais

Aos pesquisadores do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho / Universidade Federal do Rio de Janeiro, que colaboraram com discussões, sugestões valiosas, cedendo ilustrações, além da participação em conjunto de artigos científicos. Em especial agradecemos a Celso Barbosa de Sant´Anna Filho e Narcisa Leal Cunha e Silva (processos de endocitose), Gustavo Rocha Miranda (estrutura paraflagelar), Wendell Girard-Dias e Kildare Rocha de Miranda (complexo do vacúolo contrátil), Danielle Cavalcanti e Maria Cristina Machado Motta (divisão celular). Um agradecimento especial a Tecia Maria Ulisses de Carvalho, Thaïs Souto-Padron, Rossiane e Emile Barrias pela revisão do texto. Também nossos agradecimentos a Cleuza Santos Faustino pela revisão gramatical e aos designers gráficos, Marcelo Xavier, Rodrigo Leite e Ricardo Amaral.

Agradecemos ainda às várias instituições que apoiaram esta iniciativa, como a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), a Fundação Centro de Ciências do Estado do Rio de Janeiro (CECIERJ), o Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF) e o Instituto de Bioquímica Médica (IBqM) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), o Instituto Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagens (INBEB), o Centro Nacional de Bioimagens (CENABIO) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO).

Conteúdo

1. Introdução 1

O *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas 1

2. Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* 3

3. Organização estrutural 6

Núcleo 7

Retículo endoplasmático 7

Complexo de Golgi 7

Citóstoma 8

Reservossomo 8

Mitocôndria e cinetoplasto 9

Corpúsculo basal 10

Bolsa Flagelar 10

Flagelo 10

Estrutura paraflagelar 11

Microtúbulos subpeliculares 11

Complexo do vacúolo contrátil 12

Acidocalcissomo 13

Glicossomo 13

Inclusões lipídicas 13

4. Formas de desenvolvimento 15

Tripomastigota 15

Amastigota 18

Epimastigota 21

Transição epimastigota-tripomastigota 24

5. Detalhes 27

Divisão das formas multiplicativas 27

Via endocítica 30

Complexo do vacúolo contrátil 32

Motilidade, flagelo e a estrutura paraflagelar 34

6. Interação do *Trypanosoma cruzi* com a célula hospedeira 36

Interação da forma tripomastigota com o macrófago 37

Interação da forma epimastigota com o macrófago 40

Interação da forma amastigota com o macrófago 42

Interação da forma tripomastigota com células cardíacas 44

7. Interação do *Trypanosoma cruzi* com o hospedeiro invertebrado 46

8. Referências básicas 50

1. Introdução

O *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

O parasito *T. cruzi* é um protozoário flagelado, agente causador da doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, que acomete cerca de 8 milhões de pessoas na América Latina, com número de mortes de cerca de quatorze mil por ano. Segundo dados do Ministério da Saúde, no período de 2000 a 2010, foram registrados no Brasil 945 casos de doença de Chagas aguda (Fig. 1). Estima-se que existam no Brasil em torno de dois milhões de indivíduos infectados (SVS/MS, 2010).

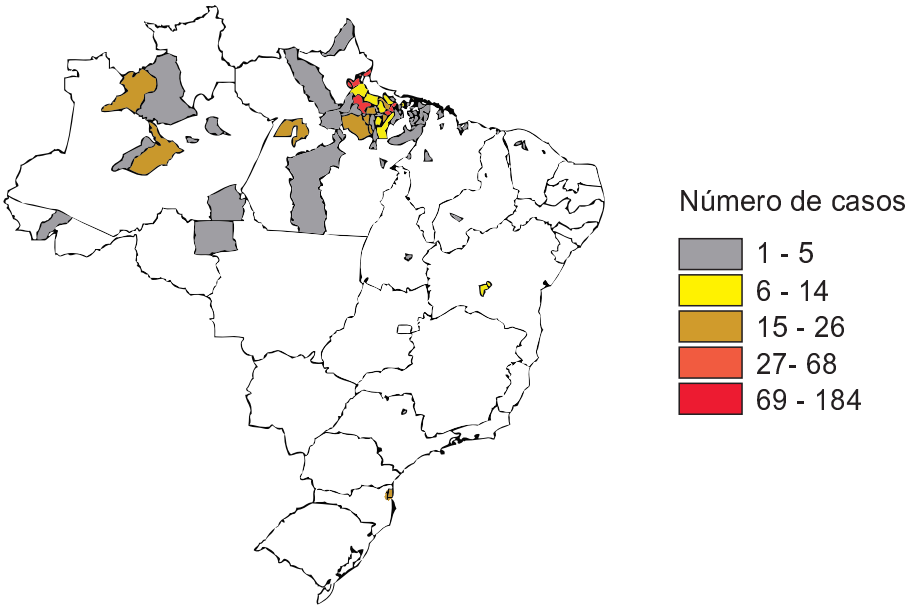


Fig. 1. Municípios com casos registrados de doença de Chagas aguda por município no período de 2000 a 2010 (Fonte: SVS/MS).

Esta doença foi descrita pela primeira vez em 1909, pelo médico sanitarista Carlos Chagas. O pesquisador foi enviado à frente de construção da ala mineira da estrada de ferro Central do Brasil, na cidade de Lassance (MG), onde havia um surto de malária que incapacitava os trabalhadores. Além de estudar a malária, descobriu a doença que hoje leva o seu nome. De maneira notável, ele descreveu o parasito protozoário causador da doença (*Trypanosoma cruzi*), os vetores (insetos hematófagos comumente conhecidos como "barbeiros"), o ciclo de vida deste parasito e vários aspectos epidemiológicos, clínicos e sociais da doença.

O *T. cruzi* , assim como os demais tripanossomatídeos, apresenta um ciclo de vida relativamente complexo com algumas formas de desenvolvimento em hospedeiros vertebrados e invertebrados. Apresenta um ciclo de vida heteroxênico, ou seja, com hospedeiros vertebrados mamíferos (que pode ser o homem) e insetos hemípteros (barbeiro). A figura 2 mostra as principais etapas do ciclo biológico do *T. cruzi* em ambos os hospedeiros.

2. Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*

A contaminação do barbeiro (1), que é um inseto hematófago, ocorre quando este pica um mamífero infectado e ingere formas tripomastigotas sanguíneas (2) que são conduzidas à porção anterior do estômago. Neste novo ambiente, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas e algumas formas esferomastigotas (3). Ainda no estômago, formas de transição, esferomastigotas e epimastigotas são digeridas. As formas epimastigotas sobreviventes, quando alcançam o intestino, começam a se multiplicar sucessivamente por divisão binária (4) e aderem-se às membranas perimicrovilares que são secretadas pelas células intestinais. Esta adesão ocorre predominantemente pela região do flagelo. Posteriormente, os epimastigotas se soltam e movem-se para o intestino posterior, onde iniciam o processo de diferenciação em tripomastigotas metacíclicos (5) que aderem à cutícula que reveste o epitélio do reto e do saco retal do inseto. Ao se soltarem do epitélio, podem ser eliminados na urina ou fezes do inseto em seu próximo repasto sanguíneo. A contaminação de um hospedeiro vertebrado ocorre quando o barbeiro infectado pica o mamífero. Neste processo, o inseto geralmente defeca e urina (6), depositando, assim, sobre a pele ou mucosa do mamífero a forma tripomastigota metacíclica, que é a forma infectiva (7), porém não replicativa. A invasão do parasito ocorre quando o hospedeiro se coça, o que gera lesões da pele por onde o parasita pode penetrar ou quando ele entra em contato com a mucosa. Os tripomastigotas metacíclicos acessam a circulação sanguínea, aderindo e invadindo uma gama de células nucleadas como, por exemplo, macrófagos (8), células musculares

e epiteliais. Inicialmente, a forma tripomastigota é fagocitada pelo macrófago, seguindo-se a formação do vacúolo parasitóforo (9). No interior do vacúolo parasitóforo, a forma tripomastigota se diferencia para a forma amastigota e ocorre a lise da membrana do vacúolo parasitóforo (10). No citoplasma, esta forma se multiplica por fissões binárias sucessivas, podendo tomar todo o citoplasma (11). Após as sucessivas divisões, os amastigotas iniciam sua diferenciação passando por uma forma de transição (12) e se diferenciando na forma tripomastigota antes da célula hospedeira ser rompida pelo excesso de parasitos (13). A lise da célula hospedeira pode ocorrer antes da total diferenciação de amastigotas para tripomastigotas, o que gera o aparecimento de diferentes formas no meio externo (14). No meio extracelular, os tripomastigotas (15a) e amastigotas (15b) podem infectar novas células que ali estejam presentes.

Existem algumas formas de desenvolvimento que são características nos diferentes hospedeiros.

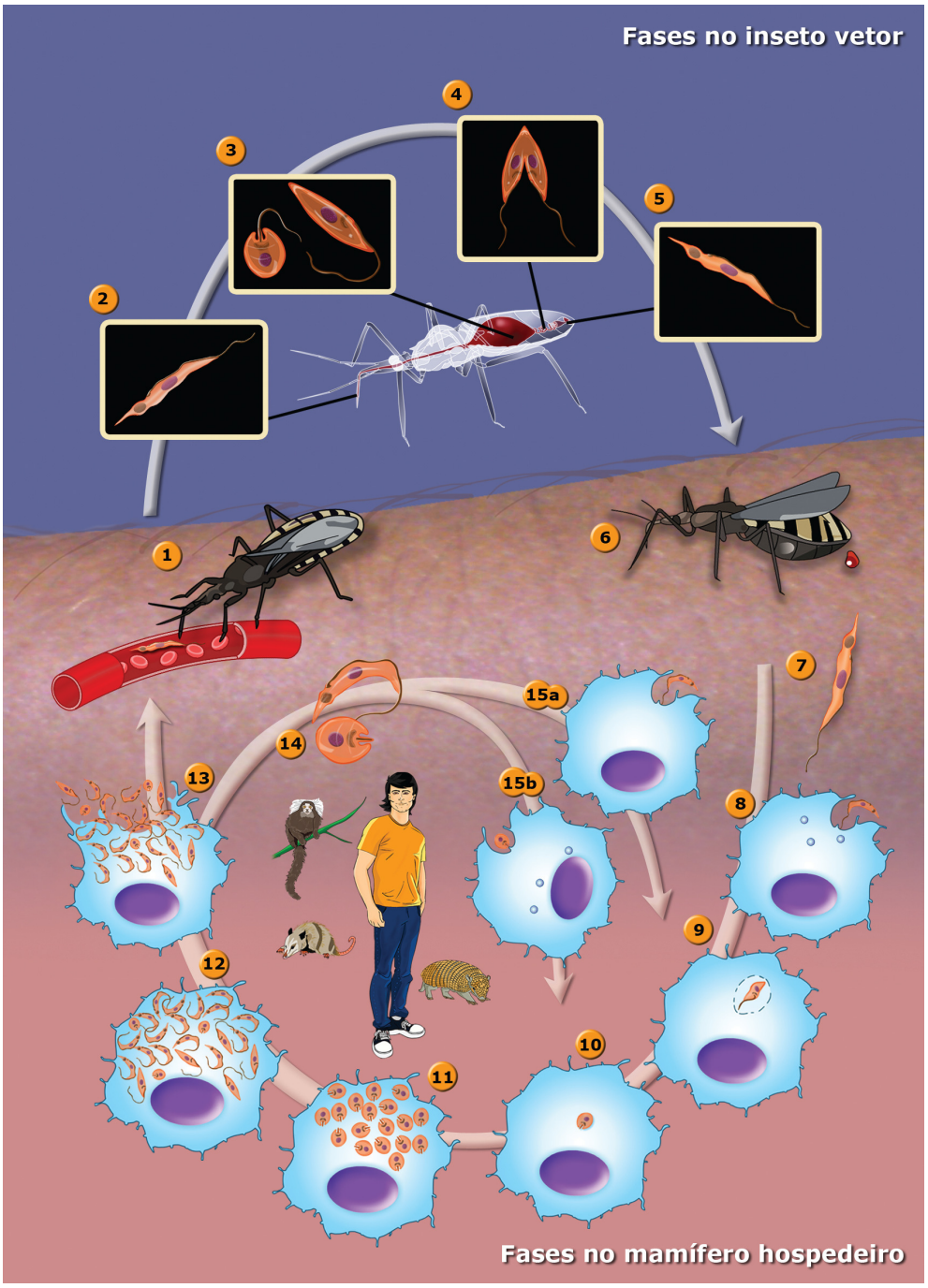


Fig. 2. Ciclo biológico do *T. cruzi* no interior do inseto vetor e do mamífero hospedeiro **(Vídeo suplementar 1 e 2)**.

O parasita pode ainda penetrar no corpo humano por outras vias: por transfusão sanguínea e transplante de órgãos (atualmente quase eliminados no Brasil), durante a gravidez e até mesmo pela ingestão do inseto acidentalmente triturado junto a alimentos (contaminação por via oral) como o caldo de cana de açúcar, sucos de açaí e goiaba (revisto por Yoshida, 2008).

3. Organização estrutural

O protozoário *T. cruzi* é um eucarioto e, por isso, apresenta organelas comuns a todos os eucariotos além de possuir organelas peculiares da família.

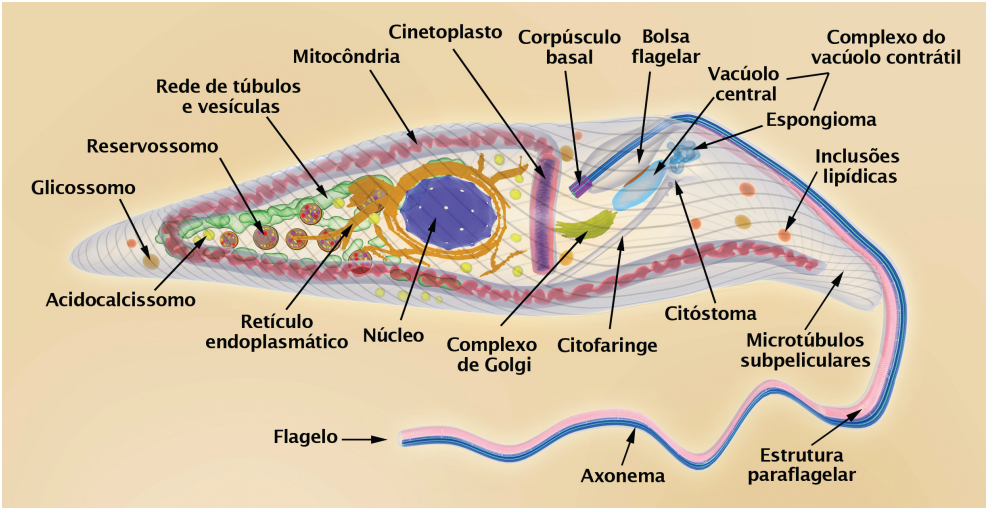


Fig. 3. Esquema tridimensional destacando o corpo celular da forma epimastigota do *T. cruzi* mostrando as principais estruturas celulares.

Núcleo

O núcleo do *T. cruzi* apresenta uma organização estrutural semelhante a de células eucarióticas, medindo cerca de 2,5 µm de diâmetro e possuindo um **nucléolo** centralizado. Nas formas epimastigotas e amastigotas o núcleo é arredondado, enquanto que nas formas tripomastigotas apresenta formato alongado. O núcleo possui uma membrana externa típica, com poros nucleares medindo cerca de 80 nm, que apresenta continuidade com a membrana do retículo endoplasmático (revisto por De Souza, 2002).

Retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático liso e rugoso são organelas envolvidas na síntese de proteínas e lipídeos. Perfis do retículo endoplasmático liso e rugoso podem ser encontrados por todo o corpo de todas as formas de desenvolvimento do *T. cruzi*. Muitas vezes há maior concentração de retículo na região periférica, próximo aos microtúbulos subpeliculares.

Complexo de Golgi

O complexo de Golgi está sempre próximo à bolsa flagelar. De modo geral, é formado por um sistema de 3 a 10 cisternas e vesículas na porção *trans*. Nas formas que apresentam um **citóstoma**, como em epimastigotas e amastigotas, localiza-se próximo a esta estrutura. Como em outras células eucarióticas, o complexo de

Golgi está envolvido no processo de modificação de proteínas, como glicosilação e sulfatação, e atua como ponto central de distribuição de membranas para várias regiões da célula, sempre através do tráfego de vesículas.

Citóstoma

As formas epimastigota e amastigota apresentam uma profunda invaginação da membrana plasmática em forma de funil, estendendo-se até a região próxima ao núcleo e formando uma estrutura denominada **complexo citóstoma-citofaringe**. Este complexo desempenha papel importante no processo de endocitose, visando à captação de macromoléculas do meio. Ao penetrarem na abertura do citóstoma, as macromoléculas seguem pela citofaringe, onde são internalizadas em vesículas endocíticas que irão fundir com uma **rede de túbulos e vesículas** e, posteriormente, irão se fundir com os **reservossomos** (De Souza, *et al.*, 2009).

Reservossomo

Os reservossomos são organelas da via endocítica encontradas na forma epimastigota de *T. cruzi*. São comumente esféricas com diâmetro médio de 700 nm, delimitada por uma unidade de membrana e possuindo conteúdo elétron-denso e inclusões elétron-lucentes. Os reservossomos são o ponto final de todas as macromoléculas capturadas no meio extracelular, ingeridas pelo processo endocítico

do parasita. São responsáveis pelo armazenamento de proteínas, lipídios e proteases importantes como a cruzipaína. Esta organela possivelmente tem função de armazenamento, reciclagem e funções típicas de lisossomos, como a degradação de macromoléculas. As formas amastigota e tripomastigota, apesar de não apresentarem um reservossomo típico, também apresentam organelas relacionadas à lisossomos, aqui denominadas *reservossomo-like*. Esta organela também contém a cruzipaína (Sant'Anna *et al.*, 2008; revisto por De Souza *et al.*, 2009).

Mitocôndria e cinetoplasto

O *T. cruzi*, bem como todos os membros da família Tripanosomatidae, apresenta uma única mitocôndria que se ramifica por todo o corpo do protozoário. Assim como em todas as células eucarióticas, a mitocôndria dos tripanossomatídeos apresenta um DNA mitocondrial. Enquanto que em outras células o DNA mitocondrial representa menos de 1% do DNA total, nos tripanossomatídeos pode chegar a 30%. Nesses protozoários, o DNA mitocondrial se organiza na forma de minicírculos e maxicírculos que se associam de forma concatenada e que se concentram em uma determinada região da mitocôndria, localizada logo abaixo do **corpúsculo basal**, dando origem a uma estrutura denominada cinetoplasto.

A forma e a estrutura da organização do cinetoplasto variam de acordo com o estágio de desenvolvimento do protozoário,

apresentando a forma de bastão levemente curvado nas formas amastigota e epimastigota, e arredondada na forma tripomastigota. O cinetoplasto está sempre situado próximo ao corpúsculo basal e, consequentemente, ao flagelo.

Corpúsculo basal

O corpúsculo basal caracteriza-se por apresentar nove tripletes de microtúbulos, intimamente associados ao **flagelo**, servindo como sítio de crescimento dos microtúbulos. Esta estrutura também se encontra firmemente associada à membrana mitocondrial externa e ao cinetoplasto, através de filamentos unilaterais (revisto por Liu *et al.*, 2005).

Bolsa Flagelar

Em todos os tripanossomatídeos, a bolsa flagelar é formada por uma invaginação da membrana plasmática, de onde emerge o **flagelo**. Esta região é um importante sítio de endocitose e exocitose em tripanossomatídeos. No entanto, na forma epimastigota de *T. cruzi*, foi demonstrado que o citóstoma é o principal sítio de atividade endocítica (De Souza *et al.*, 2009).

Flagelo

O *T. cruzi*, assim como todos os tripanossomatídeos, apresenta um flagelo típico, formado por um **axonema,** com nove pares

de microtúbulos periféricos e um par central, envoltos por uma membrana flagelar. É a estrutura responsável pela motilidade do parasita. Mesmo a forma amastigota apresenta um pequeno flagelo. Conforme já comentado, o flagelo emerge de uma invaginação da membrana plasmática conhecida como bolsa flagelar. O flagelo encontra-se intimamente associado a um corpúsculo basal, à membrana mitocondrial externa e ao cinetoplasto. Nas formas epimastigota e tripomastigota, o flagelo segue aderido ao corpo do parasita, numa região denominada zona de adesão flagelar, e torna-se livre na região anterior. Temos ainda outra estrutura associada ao flagelo das formas epimastigota e tripomastigota, que é chamada de **estrutura paraflagelar**.

Estrutura paraflagelar

A estrutura paraflagelar (do inglês, *paraflagellar rod*) é formada por um complexo arranjo de filamentos proteicos, de diferentes espessuras (25 e 70 nm) que se encontram associados ao axonema das formas epimastigota e tripomastigota. Possui função ainda bastante discutida, podendo atuar na motilidade e na adesão ao epitélio intestinal de insetos.

Microtúbulos subpeliculares

Os microtúbulos subpeliculares possuem este nome por estarem situados logo abaixo da membrana plasmática. É o principal componente do citoesqueleto dos tripanossomatídeos e estão

distribuídos por todo o corpo celular (exceto na região da bolsa flagelar), interligados entre si, com a membrana plasmática e em alguns casos, com perfis do retículo endoplasmático, o que confere maior rigidez à célula.

Complexo do vacúolo contrátil

Além do transporte de aminoácidos pela membrana plasmática, o *T. cruzi* possui uma organela importante para o mecanismo de regulação osmótica. Trata-se do **complexo do vacúolo contrátil (CVC)**, que é formado por um conjunto de túbulos e vesículas, denominado **espongioma**, que se conecta a um **vacúolo central** localizado próximo à bolsa flagelar. Durante o ciclo de vida, o parasita está sujeito a diferentes ambientes, onde são encontradas variações extremas na concentração de íons e osmolaridade do meio extracelular. Para lidar com essas variações ambientais, o parasita desenvolveu um mecanismo de adaptação, permitindo a captação de água pelo CVC e posterior expulsão do excesso de água, juntamente com íons e possivelmente, outros componentes como íons e polifosfato, para a bolsa flagelar. Tem sido postulado que este processo envolva a cooperação de outra organela denominada **acidocalcissomo** (revisto por Rohloff e Docampo, 2008).

Acidocalcissomo

Os acidocalcissomos possuem este nome por serem organelas com característica ácida, rica em cálcio, polifosfato e outros íons e que possuem uma coleção de canais, bombas e trocadores iônicos. Apresentam uma estrutura esférica com diâmetro médio de 200 nm e estão distribuídos por toda a célula, embora sejam mais encontrados na periferia celular. Os acidocalcissomos atuam no armazenamento de cátions e fósforo, manutenção da homeostasia intracelular, pH e osmorregulação (revisto por Docampo *et al.*, 2005; Moreno e Docampo, 2009).

Glicossomo

Os glicossomos possuem formato esférico com diâmetro médio em torno de 3µm, apresentam uma matriz homogênea densa e encontram-se distribuídos por todo o corpo celular. Essas organelas são um tipo especial de peroxissomo, designado como glicossomo por concentrarem no seu interior diversas enzimas da via glicolítica, que geralmente são encontradas no citoplasma nas outras células eucarióticas (revisto por De Souza, 2002; Parsons, 2004).

Inclusões lipídicas

Estruturas esféricas com diâmetro variável são observadas no citoplasma de *T. cruzi*. Não são envoltas por uma unidade de membrana típica, mas por uma monocamada de fosfolipídios. Algumas são

elétron-lucentes, enquanto outras apresentam densidade média (Soares e Souza, 1987). Muito pouco se sabe sobre estas estruturas.

O parasito pode apresentar mudanças em sua estrutura, ao longo do seu ciclo de vida, que varia entre o hospedeiro vertebrado e o invertebrado. Assim, este protozoário apresenta características morfológicas (amastigota, epimastigota e tripomastigota), que se diferenciam pela posição relativa do cinetoplasto e do núcleo na célula, como veremos a seguir.

4. Formas de desenvolvimento

Tripomastigota

A forma tripomastigota é alongada e levemente achatada. Apresenta cinetoplasto arredondado, localizado na extremidade posterior do corpo do parasito. O flagelo emerge de uma bolsa flagelar e se adere ao longo da extensão do corpo celular do parasito, tornando-se livre na região anterior. As formas tripomastigotas são altamente infectantes, podendo ser encontradas no mamífero (sangue e espaço intercelular) e no inseto (região posterior do tubo digestório).

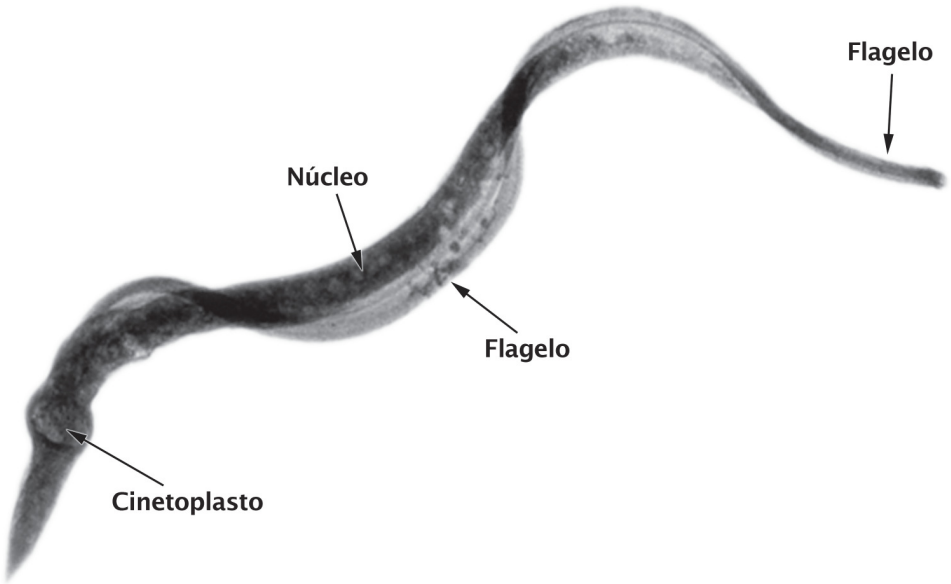


Fig. 4. Micrografia de uma forma tripomastigota de *T. cruzi* observada em um microscópio eletrônico de alta voltagem (Imagem de Wanderley de Souza).

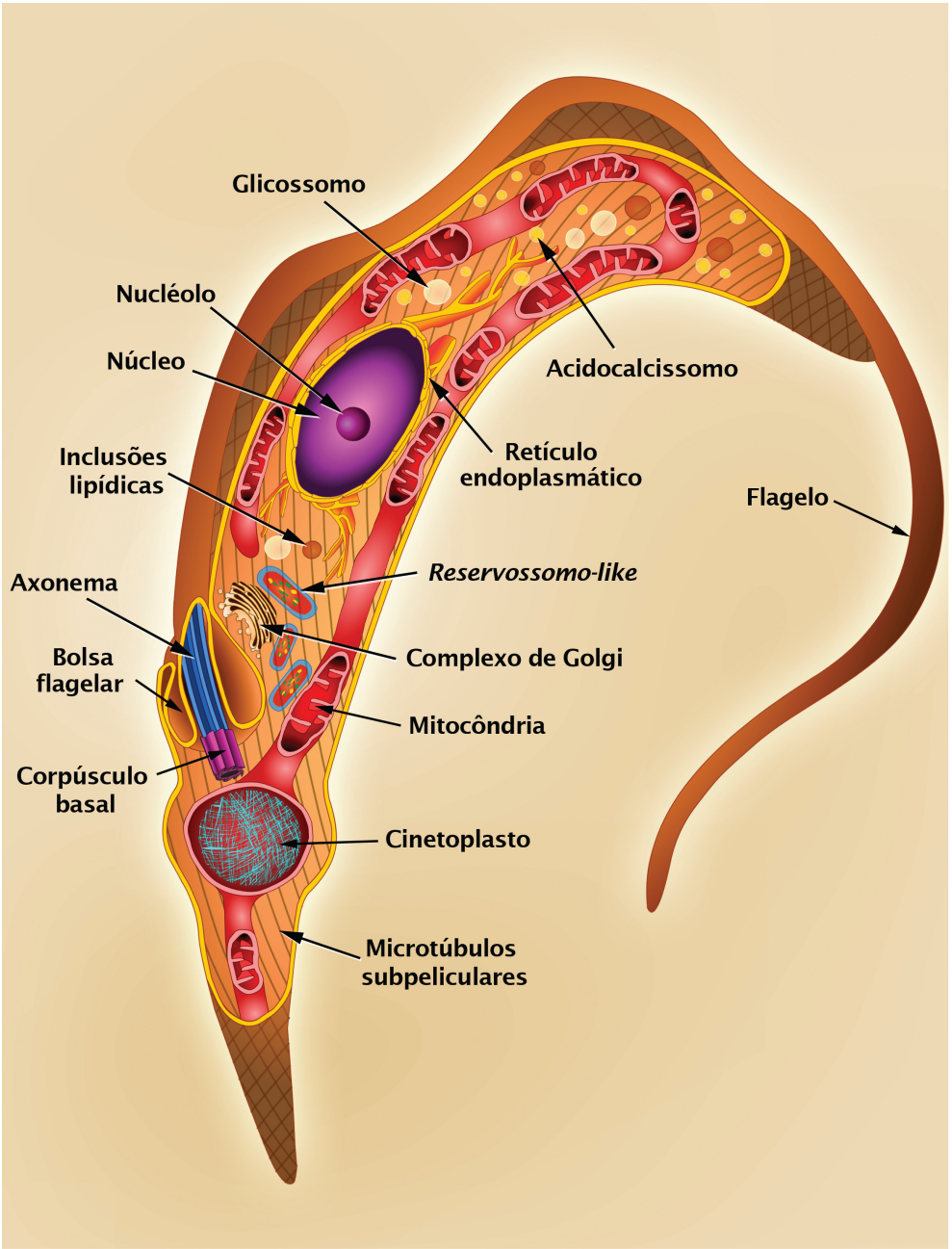


Fig. 5. Ilustração da forma tripomastigota do *T. cruzi* em corte longitudinal mostrando as principais estruturas celulares.

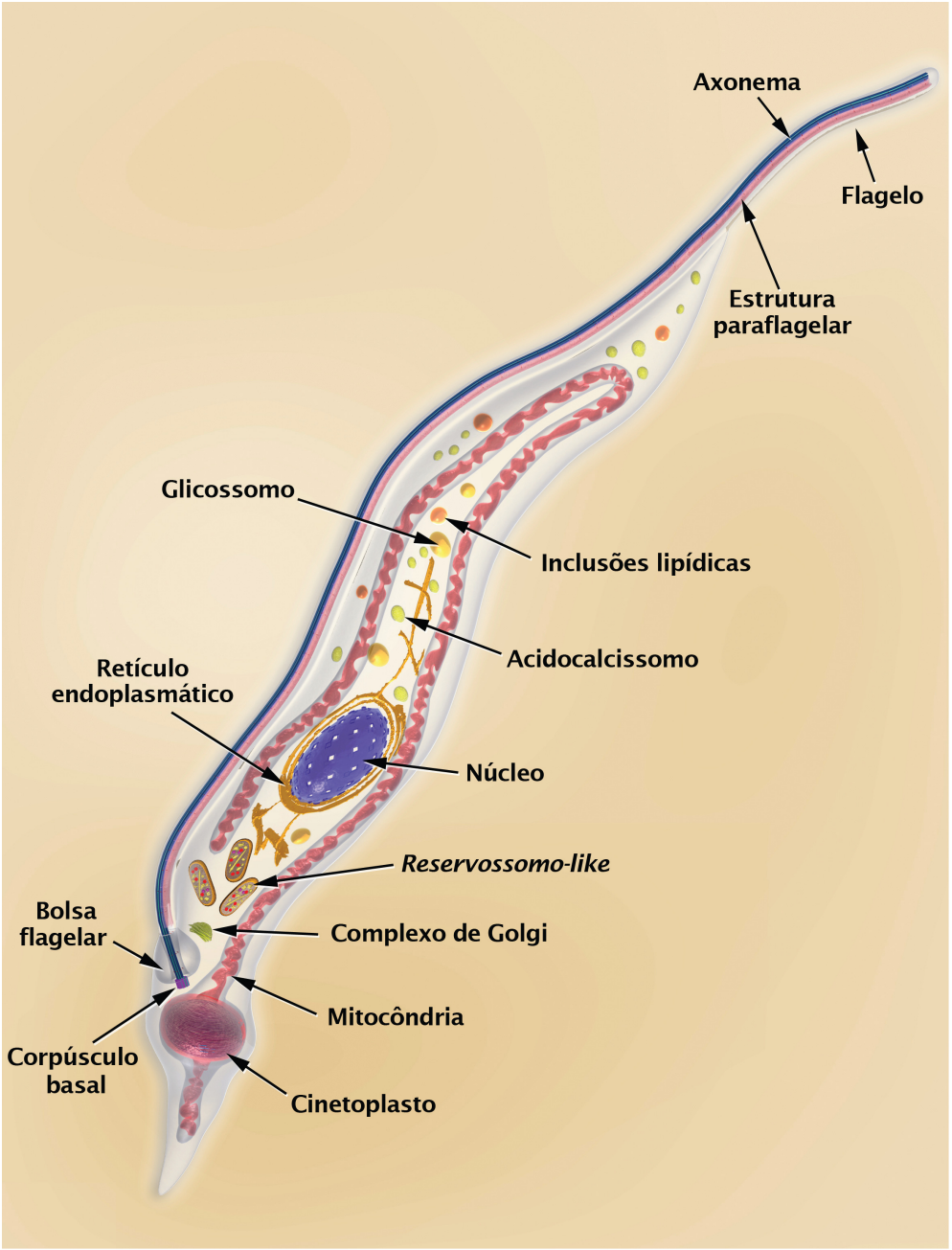


Fig. 6. Esquema tridimensional da forma tripomastigota do *T. cruzi* mostrando as principais estruturas celulares **(Vídeo suplementar 3)**.

Amastigota

A forma **amastigota** é arredondada, apresentando um flagelo bem reduzido, núcleo relativamente grande, redondo e excêntrico e cinetoplasto em forma de bastão, situado entre o núcleo e o flagelo. Esta forma infectiva é encontrada no interior das células de hospedeiros mamíferos infectados, incluindo o homem, onde se multiplicam.

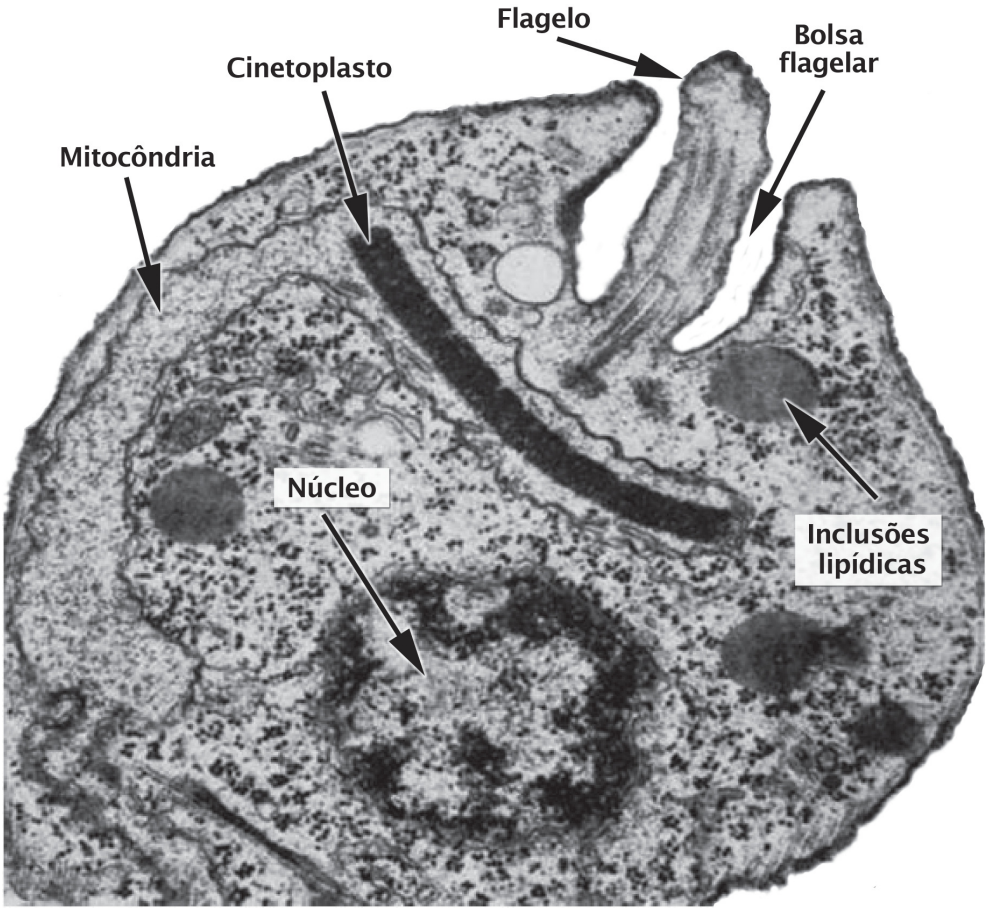


Fig. 7. Micrografia de uma forma amastigota do *T. cruzi* observada em um microscópio eletrônico de transmissão (Imagem de Wanderley de Souza).

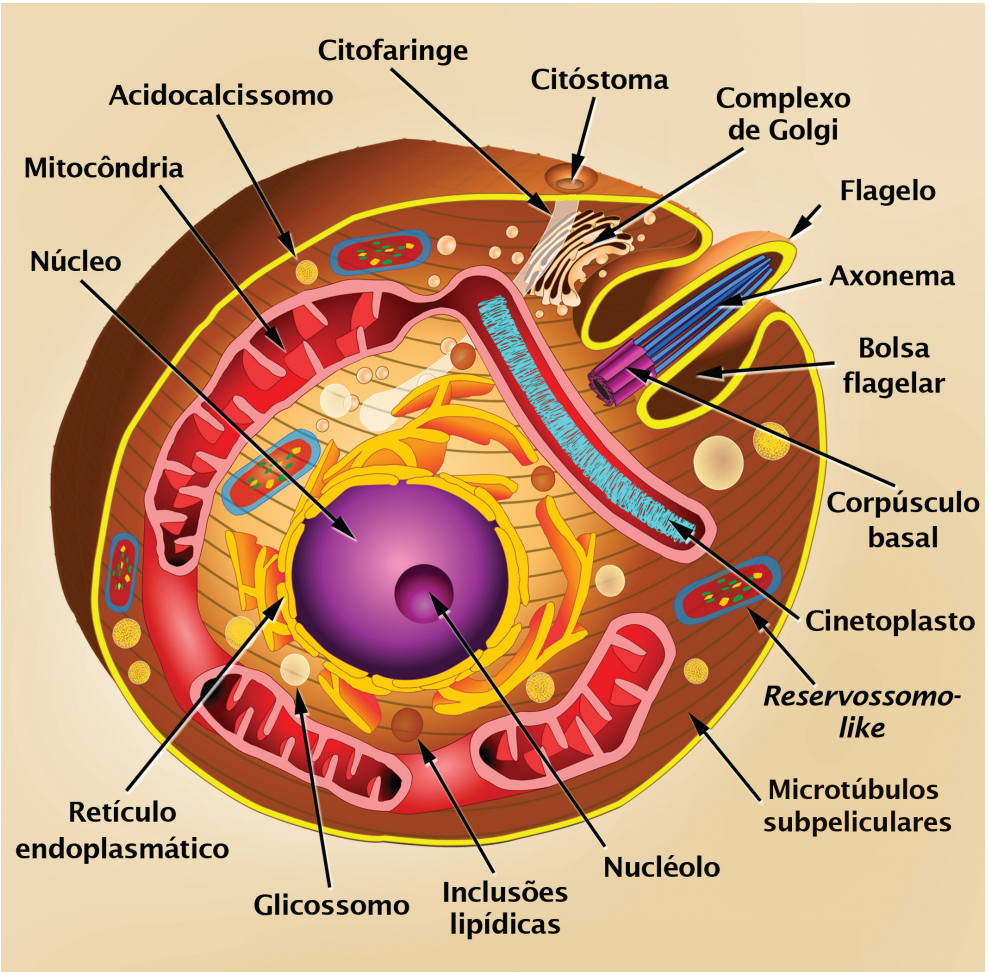


Fig. 8. Ilustração da forma amastigota do *T. cruzi* em corte longitudinal mostrando as principais estruturas celulares.

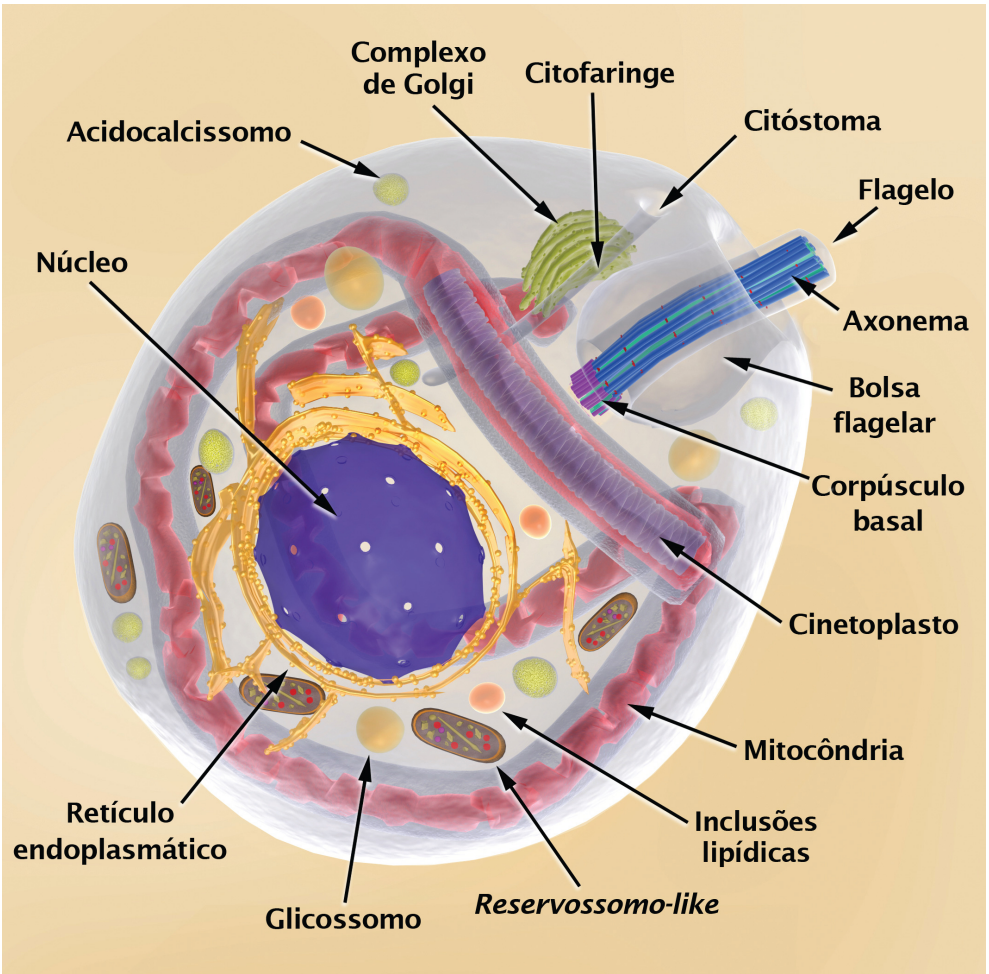


Fig. 9. Esquema tridimensional da forma amastigota do *T. cruzi* mostrando as principais estruturas celulares **(Vídeo suplementar 4)**.

Epimastigota

A forma **epimastigota** é fusiforme e possui o cinetoplasto em forma de bastão, localizado próximo à bolsa flagelar, de onde emerge o flagelo que adere ao longo da extensão do corpo celular do parasito, tornando-se livre na região anterior. Esta forma não infectiva é mais comumente encontrada no intestino do barbeiro, onde se multiplicam, bem como em cultivos axênicos.

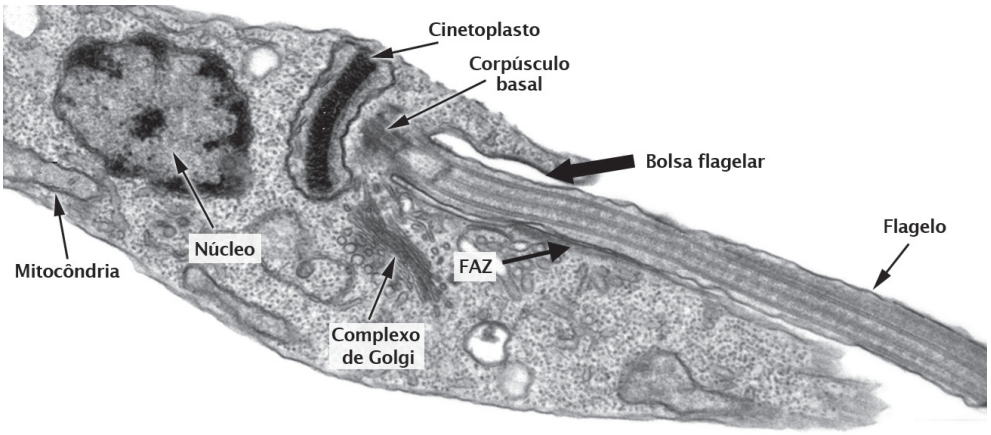


Fig. 10. Micrografia de uma forma epimastigota observada em um microscópio eletrônico de transmissão. FAZ= zona de adesão flagelar (*Flagellar Attachment Zone*) (Imagem de Gustavo Rocha).

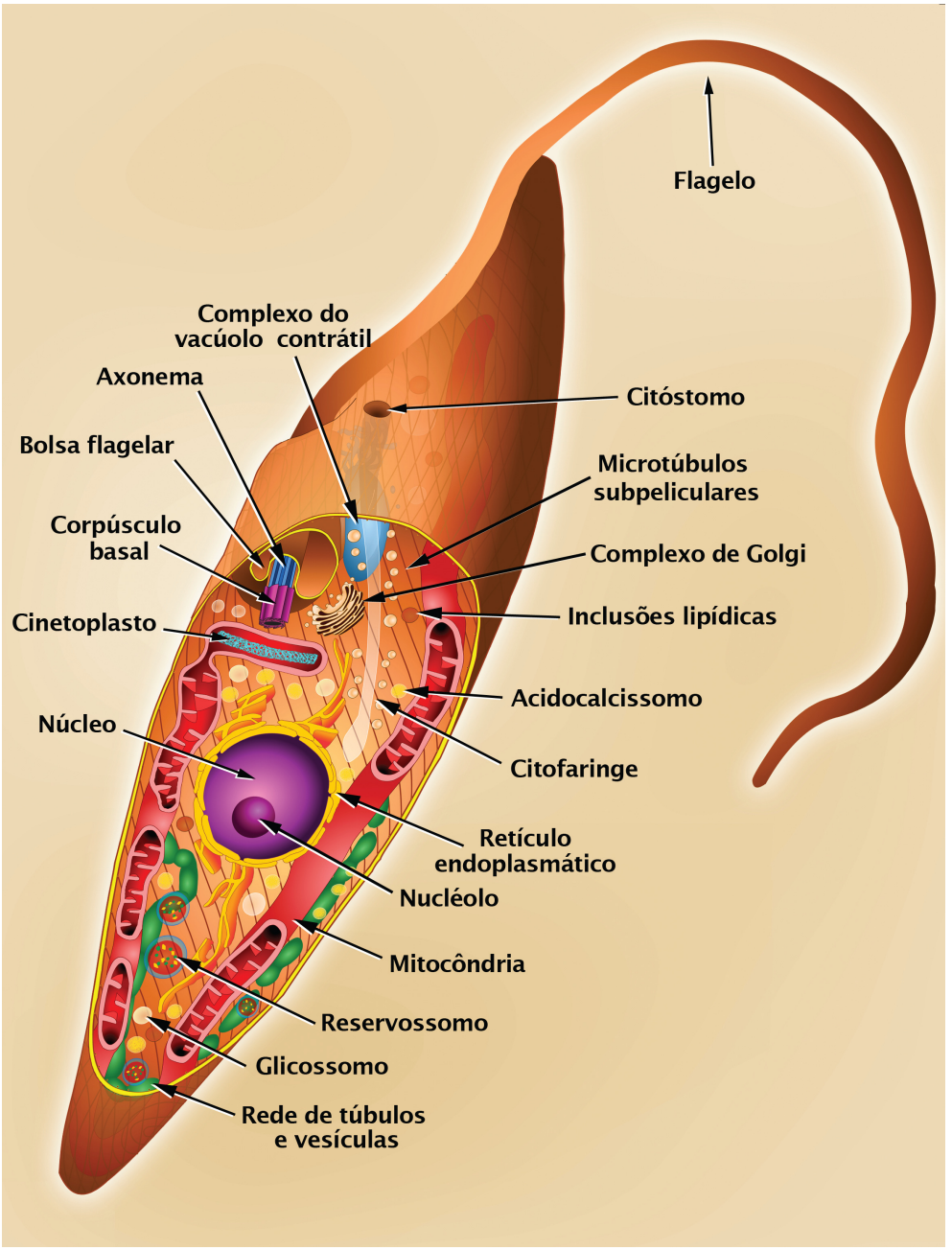


Fig. 11. Ilustração da forma epimastigota do *T. cruzi* em corte longitudinal mostrando as principais estruturas celulares.

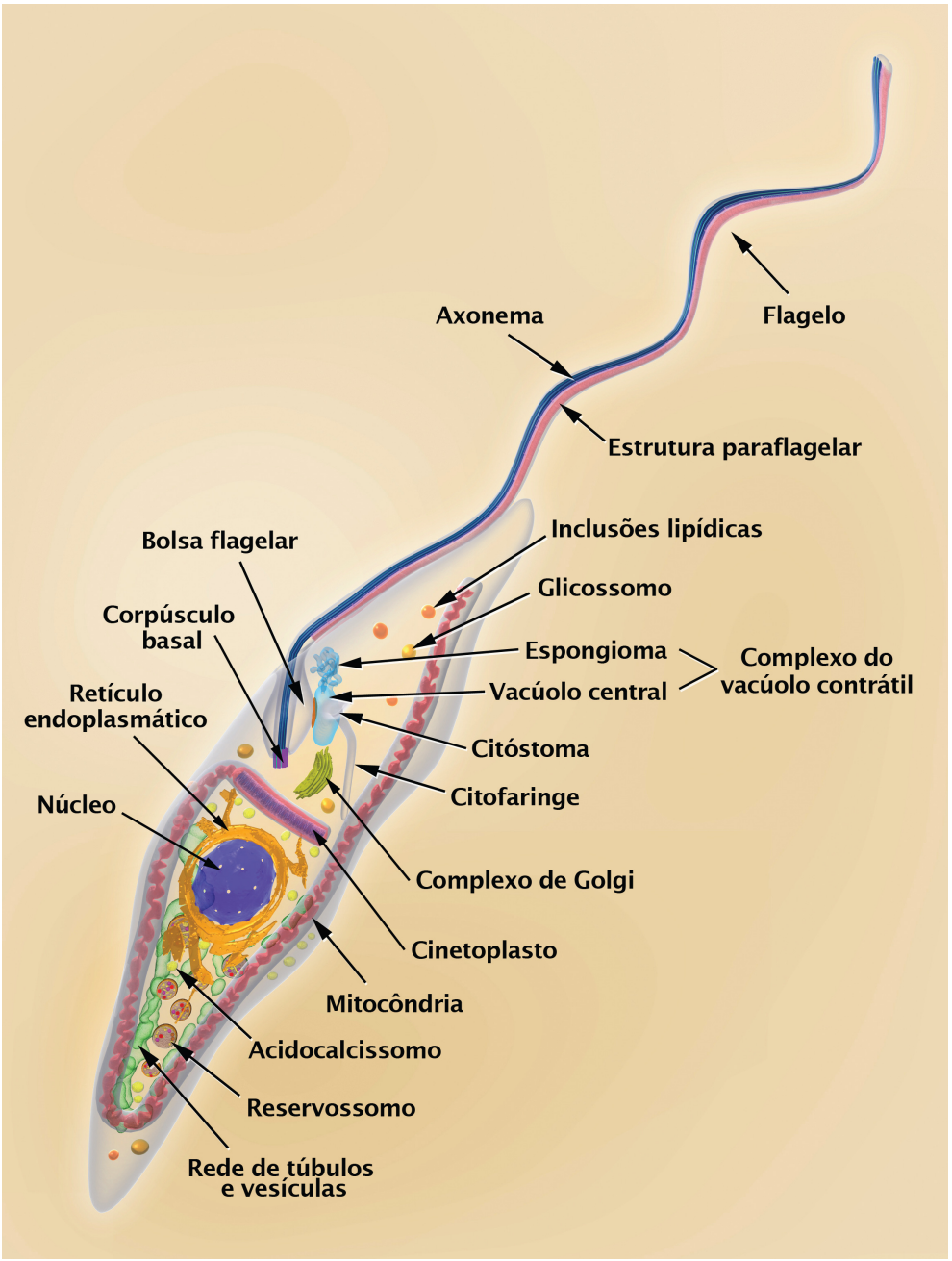


Fig. 12. Esquema tridimensional da forma epimastigota do *T. cruzi* mostrando as principais estruturas celulares **(Vídeo suplementar 5)**.

Transição epimastigota-tripomastigota

A forma de transição epimastigota-tripomastigota é alongada, onde o cinetoplasto apresenta simultaneamente características das formas tanto epimastigota como tripomastigota, com um alargamento da parte mais próxima ao núcleo. O flagelo adere ao longo da extensão do corpo celular do parasito, tornando-se livre na região anterior.

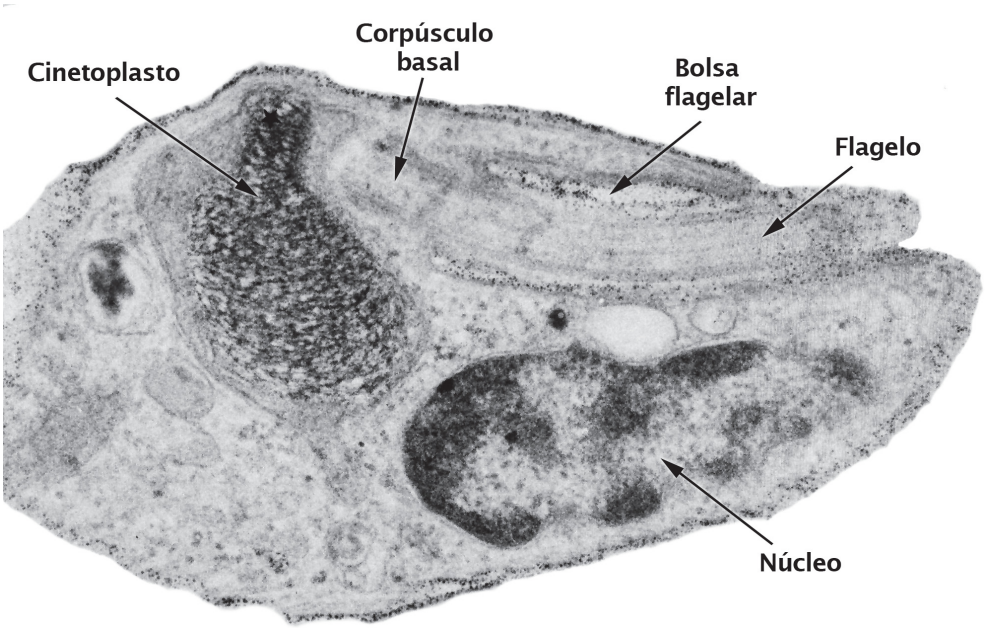


Fig. 13. Micrografia da forma de transição epimastigota-tripomastigota observada em um microscópio eletrônico de transmissão (Imagem de Wanderley de Souza).

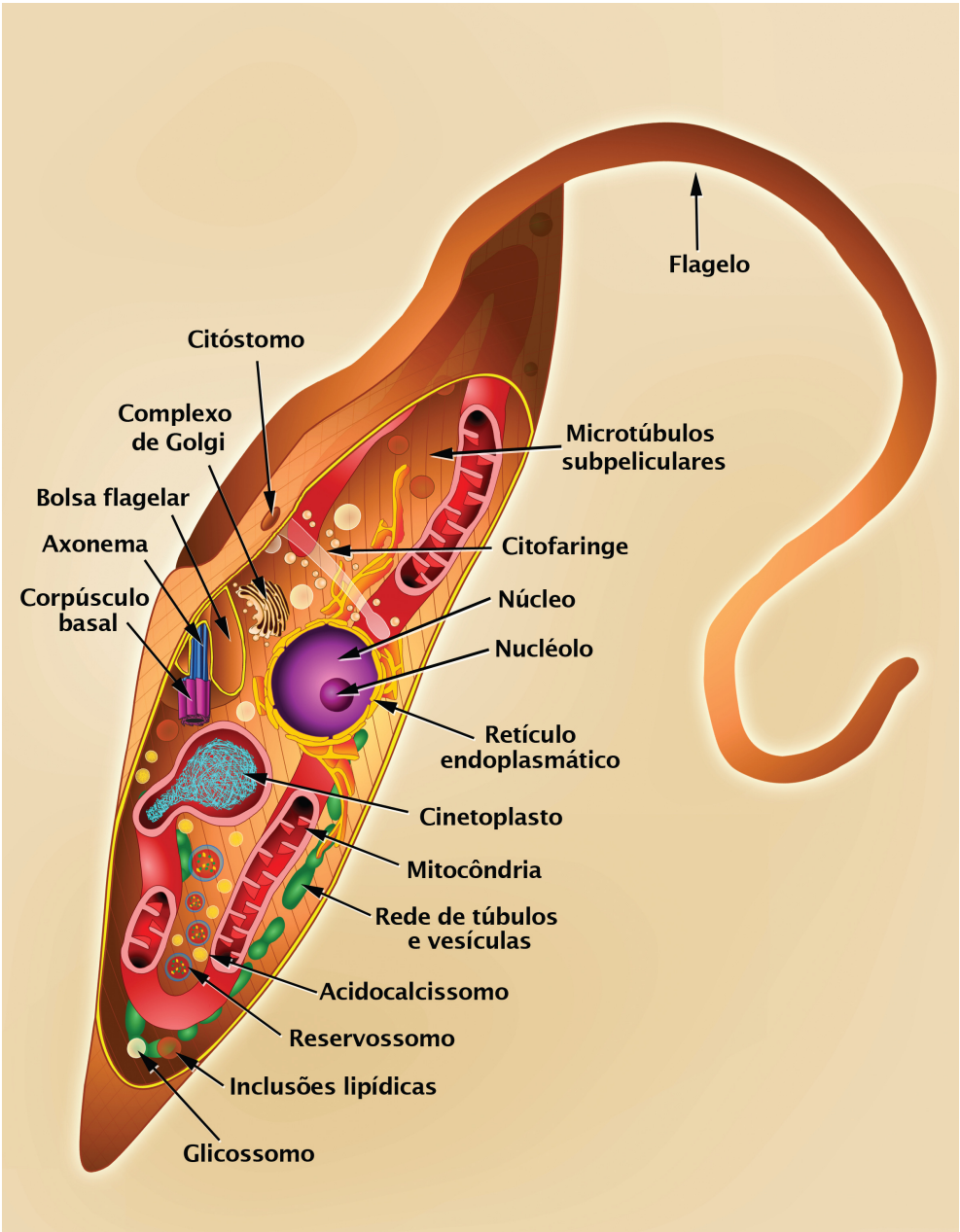


Fig. 14. Ilustração da forma de transição epimastigota-tripomastigota do *T. cruzi* em corte longitudinal mostrando as principais estruturas celulares.

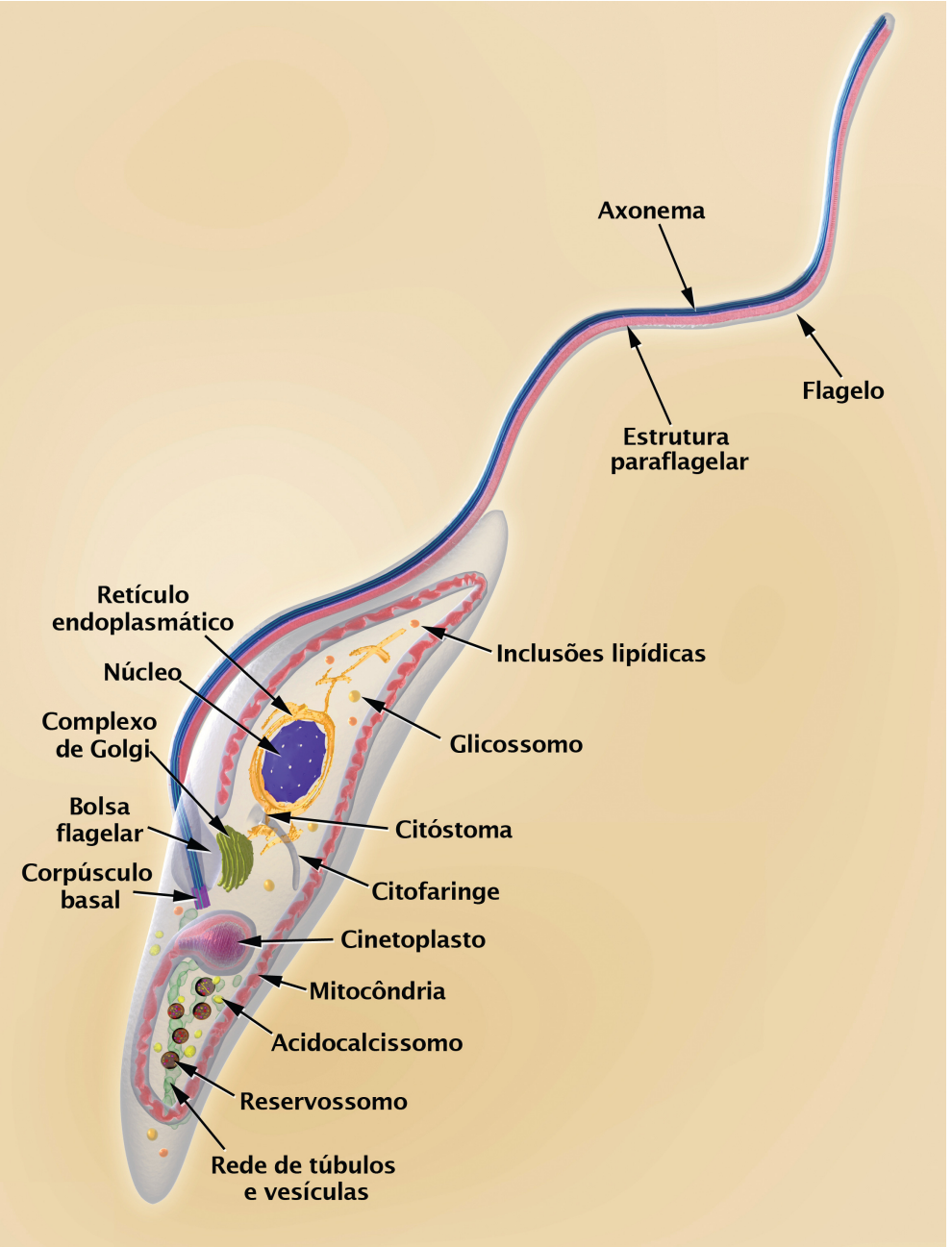


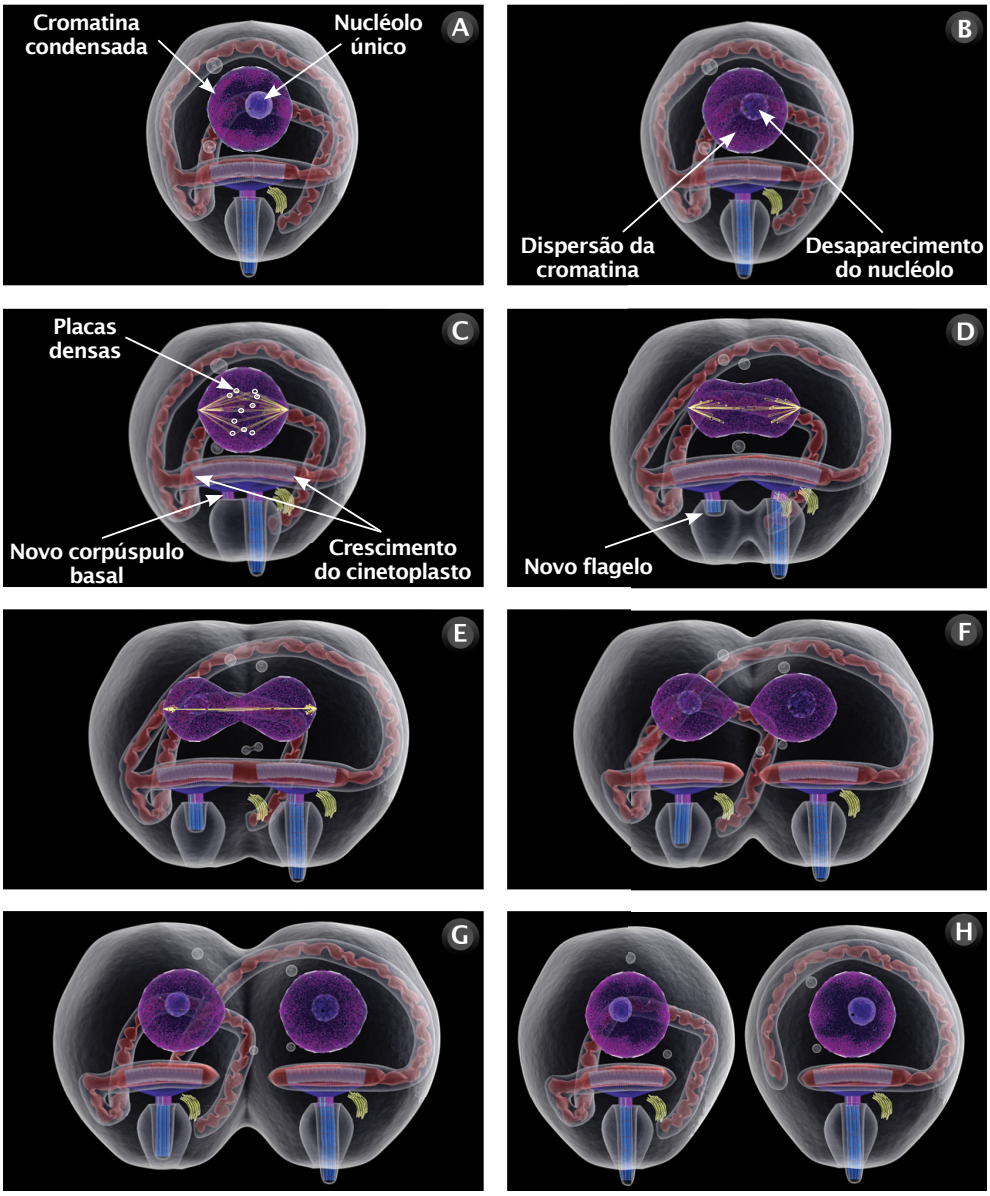
Fig. 15. Esquema tridimensional da forma de transição epimastigota-tripomastigota do *T. cruzi* mostrando as principais estruturas celulares **(Vídeo suplementar 6)**.

5. Detalhes

Divisão das formas multiplicativas

As formas multiplicativas do *T. cruzi* são: amastigota (no interior das células do hospedeiro vertebrado) e epimastigota (no invertebrado). Durante o processo de mitose nos tripanossomatídeos, a membrana nuclear permanece intacta, ocorre o aparecimento de microtúbulos intranucleares e de placas densas, além da dispersão da cromatina (Solari, 1995). Ainda assim, não há evidências de que estas placas correspondam aos cromossomos, estruturas que têm sido detectadas através de uma abordagem bioquímica. A morfologia do núcleo muda significativamente durante o ciclo celular. Embora tenha uma forma esférica, em células em interfase, durante a divisão celular se alonga e se contrai na região central, apresentando a forma de ampulheta. Este processo de divisão pode ser dividido em várias etapas esquematizadas na figura 16.

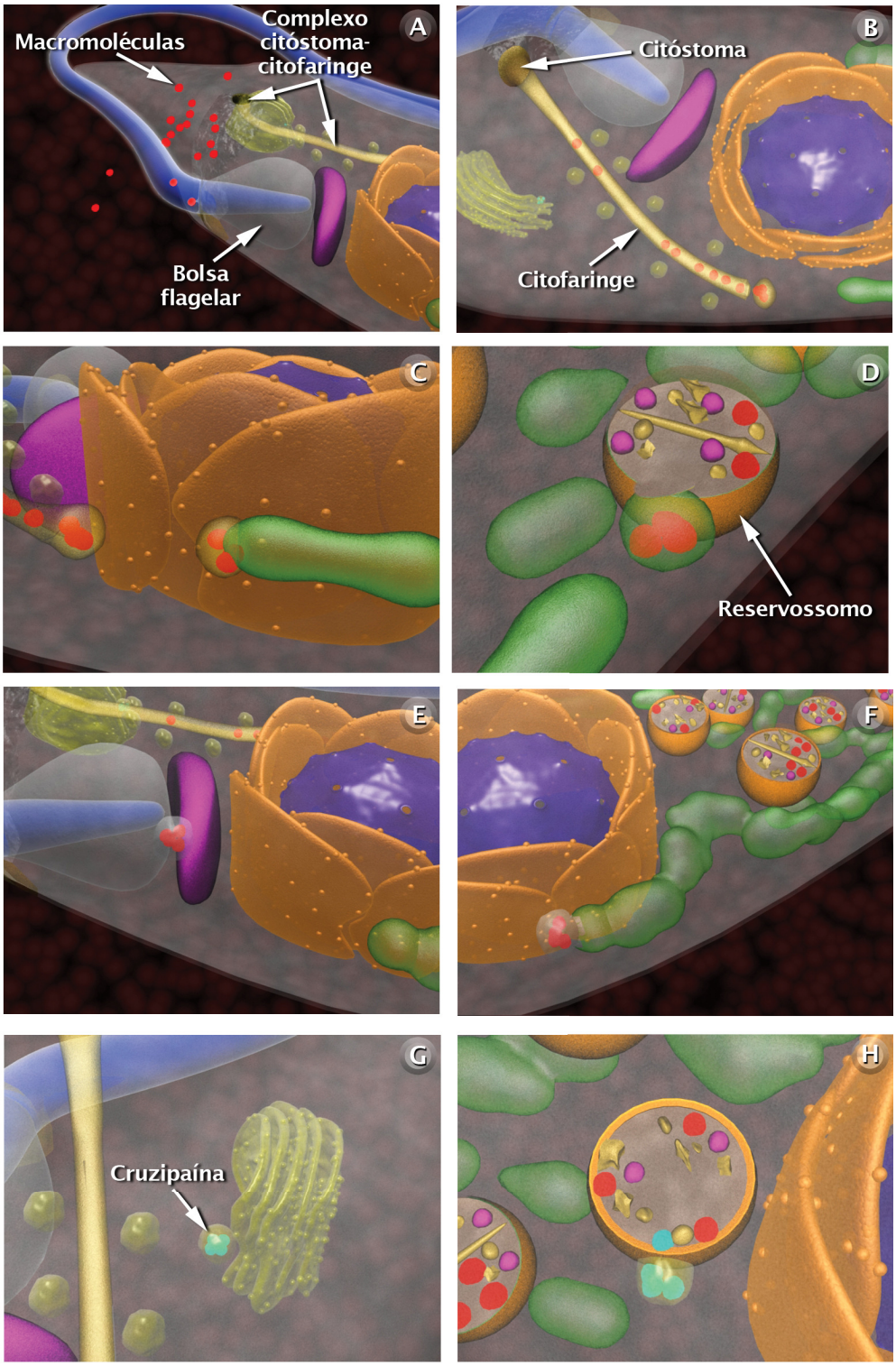
Fig. 16. Esquemas tridimensionais mostrando os principais eventos da divisão celular da forma amastigota do *T. cruzi* **(Vídeo suplementar 7)**. (A) **Fase preliminar:** núcleo com a cromatina condensada e nucléolo único. (B) **Fase inicial:** Dispersão da cromatina nuclear e desaparecimento do nucléolo. (C) **Fase equatorial:** ocorre o início do crescimento lateral do cinetoplasto seguido do surgimento de um novo corpo basal e de 10 placas densas na região equatorial do núcleo, associadas ao fuso intranuclear constituído por microtúbulos. (D) **Fase de alongamento:** novo flagelo emerge da bolsa flagelar. Divisão das placas densas que migram para os polos do núcleo. O núcleo começa a alongar e os microtúbulos sofrem uma mudança na disposição e ocorre surgimento de um novo pequeno flagelo. (E) **Fase de alongamento final:** As placas densas começam a migrar para os polos do núcleo que apresenta a forma de ampulheta, estágio que chega ao máximo da divisão. (F) **Fase de reorganização:** Os microtúbulos se despolimerizam de forma gradual. O nucléolo começa a se reconstituir e a cromatina começa a se condensar. Núcleos se separam nesta fase. (G) **Fase de constrição:** Constrição do cinetoplasto e do corpo celular e citocinese com a formação de duas formas amastigotas independentes (H).


Cromatina condensada
Nucléolo único
A
B
Dispersão da cromatina
Desaparecimento do nucléolo
Placas densas
C
D
Novo corpúspulo basal
Crescimento do cinetoplasto
Novo flagelo
E
F
G
H

Via endocítica

As formas de desenvolvimento do *T. cruzi* são capazes de ingerir macromoléculas do meio extracelular por via endocítica, sobretudo a forma epimastigota. Quando formas epimastigotas são incubadas na presença de macromoléculas, estas são interiorizadas através da bolsa flagelar ou pelo complexo citóstoma-citofaringe. Nos casos em que a endocitose é mediada por receptor, como ocorre com a interiorização de LDL e transferrina, inicialmente a macromolécula se liga à superfície e só posteriormente é interiorizada via pequenas vesículas que se formam na bolsa flagelar e na porção final do citóstoma. As vesículas formadas migram para a região mediana e posterior da célula, muitas vezes formando estruturas tubulares, possivelmente resultantes da fusão das vesículas endocíticas iniciais. Posteriormente, fundem-se aos reservossomos, que são o destino final de todas as macromoléculas ingeridas, conforme demonstrado da figura 17.

Fig. 17. Via endocítica em formas epimastigotas de *T. cruzi* **(Vídeo suplementar 8)**. (A) A endocitose na forma epimastigota do *T. cruzi* ocorre em duas regiões de ingestão de macromoléculas: na bolsa flagelar e no complexo citóstoma-citofaringe. (B) No complexo citóstoma-citofaringe, a via de endocitose continua por uma pequena rede ramificada de túbulos e vesículas (C) até fundir-se ao reservossomo (D). (E) Na bolsa flagelar, a via de endocitose continua através de uma rede ramificada de túbulos e vesículas (F) que se estende até a extremidade posterior, antes de retornar na direção oposta e, finalmente, fundir-se aos reservossomos. (G) A cruzipaína, assim como outras proteases, é processada nas cisternas do complexo de Golgi e também é destinada aos reservossomos (H).


A
Macromoléculas
Complexo citóstoma-citofaringe
Bolsa flagelar
B
Citóstoma
Citofaringe
C
D
Reservossomo
E
F
G
Cruzipaína
H

Complexo do vacúolo contrátil

Durante o ciclo de vida, o parasita está sujeito a diferentes ambientes, onde são encontradas variações extremas na concentração de íons e osmolaridade do meio extracelular. Além do transporte de aminoácidos pela membrana plasmática, o *T. cruzi* possui uma organela importante para o mecanismo de regulação osmótica. Trata-se do **complexo do vacúolo contrátil (CVC)**, que é formado por um conjunto de túbulos e vesículas, denominado **espongioma**, que se conecta a um **vacúolo central (VC)** localizado próximo à bolsa flagelar.

Tem sido sugerido que a captação inicial de água ocorra principalmente através do espongioma, que em seguida conduz a água para o VC que, por sua vez, aumenta seu volume com a entrada de fluidos oriundos do citoplasma e, possivelmente com a incorporação de membrana do espongioma. Além disso, tem sido postulado que este processo envolva a cooperação de outra organela com característica ácida, rica em cálcio, polifosfato e outros íons, denominada **acidocalcissomo**, que funde-se com o CVC, liberando o seu conteúdo no lúmen desta organela, contribuindo para o aumento da pressão osmótica no vacúolo e, conseqüentemente, aumentando a captação de água. Uma vez completada esta etapa, o vacúolo se funde com a bolsa flagelar em um domínio específico, expulsando água e, possivelmente, outros componentes como íons e polifosfato.

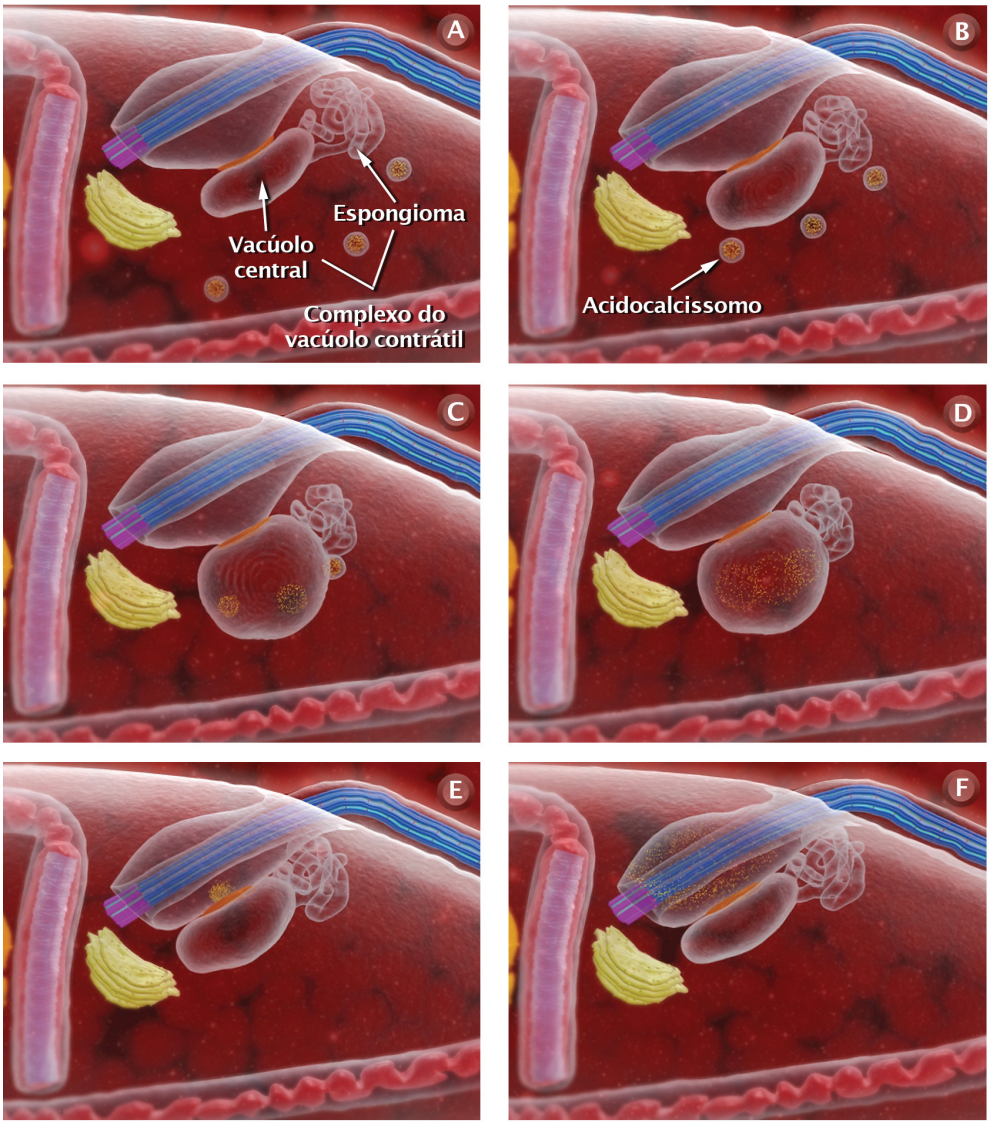


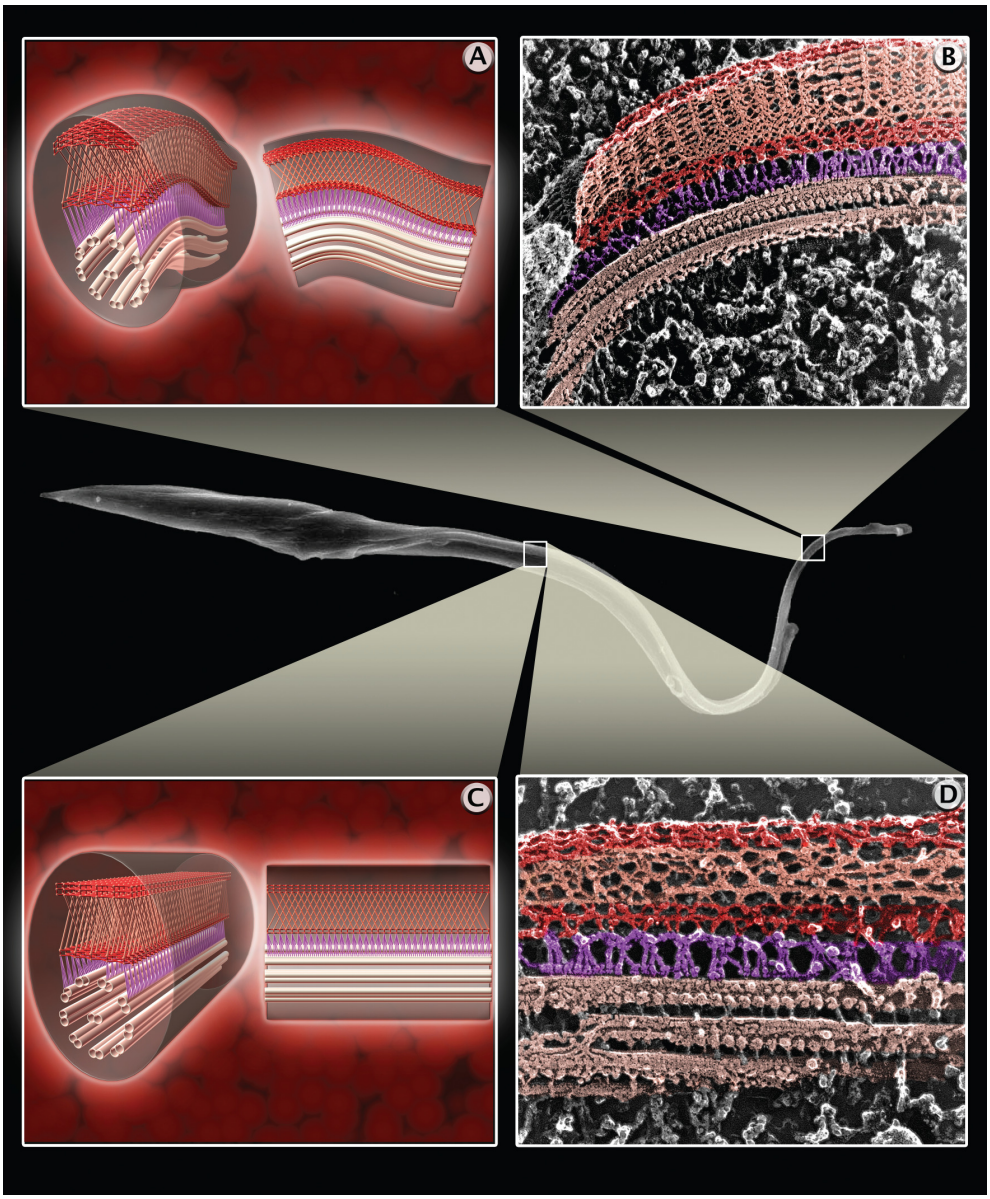
Fig. 18. Esquema tridimensional da hipótese do mecanismo de captação e saída de água realizado pelo CVC em cooperação com os acidocalcissomos na forma epimastigota de *T. cruzi* (**Vídeo suplementar 9**). (A) CVC com o VC associado ao espongioma. (B) Acidocalcissomos migrando em direção ao VC. (C) Os acidocalcissomos e os espongiomas se fundem e liberam o seu conteúdo no lúmen do VC, que aumenta de tamanho (D). (E) O conteúdo do VC é liberado na bolsa flagelar através da placa de adesão. (F) Água, íons e polifosfato no interior da bolsa flagelar.

Motilidade, flagelo e a estrutura paraflagelar

A principal função do flagelo é a locomoção (motilidade) do parasita. Nos tripanossomatídeos, o flagelo desempenha ainda outras funções, como adesão à célula hospedeira do vertebrado, e durante o processo de interação de formas epimastigotas, com a parede do tubo digestivo do hospedeiro invertebrado. No flagelo desses parasitas, encontramos uma estrutura denominada **estrutura paraflagelar**. Esta estrutura auxilia no batimento flagelar e é constituída por uma rede filamentosa com três regiões: porção distal, porção intermediária e a porção proximal, que está associada lateralmente ao axonema através de filamentos. Assim, a dinâmica da estrutura paraflagelar acompanha o movimento do axonema. Durante o batimento flagelar, enquanto a porção proximal se comprime, a porção distal se distende e vice-versa; enquanto a porção distal se comprime, a porção proximal se distende. Os filamentos da porção intermediária tendem a inclinar cada vez mais à medida que aumenta a curvatura do flagelo.

Fig. 19. Esquemas tridimensionais (A e C) e micrografias de *deep-etching** colorizadas (B e D) da estrutura paraflagelar durante a curvatura do flagelo (A e B) e em estado de repouso, em um momento sem curvatura do flagelo (C e D) (Imagem de Gustavo Rocha) **(Vídeo suplementar 10).**

* Técnica de microscopia eletrônica em que a célula é congelada e fraturada à baixa temperatura. Em seguida, procede-se à sublimação de parte do gelo e obtenção de uma réplica que é examinada no microscópio eletrônico de transmissão.

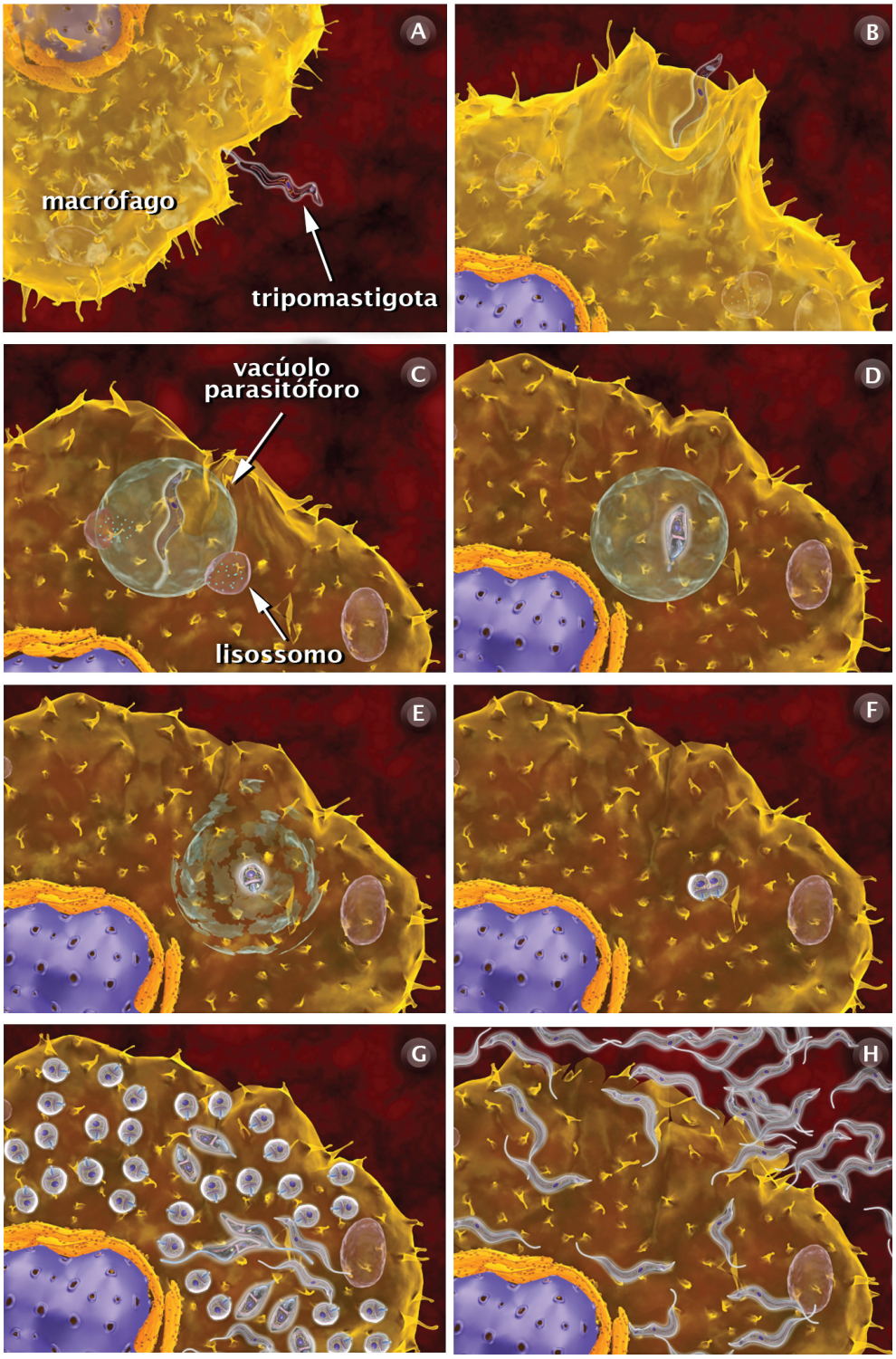

A
B
C
D

6. Interação do *Trypanosoma cruzi* com a célula hospedeira

Interação da forma tripomastigota com o macrófago

As formas infectantes do parasita encontradas na corrente sanguínea são tripomastigotas e amastigotas. O processo de interação da forma tripomastigota do *T. cruzi* com a célula hospedeira envolve as seguintes etapas: adesão e reconhecimento, sinalização, invasão (ou fagocitose) e multiplicação. A etapa de adesão envolve o reconhecimento de moléculas presentes na superfície do parasita e da célula do hospedeiro mamífero. Em uma segunda fase, ocorre a ativação de uma série de processos de sinalização que culminam em internalização do parasita por vários processos endocíticos. Em um desses processos ocorre a formação de pseudópodes, típicos de um processo de fagocitose. Outros dois mecanismos são conhecidos: endocitose, onde não ocorre a formação de pseudópodes; e invaginação da membrana. O processo de invasão conta com o recrutamento de lisossomos para o local de invasão do parasita, que se fundem ao vacúolo parasitóforo em formação. No interior do vacúolo, ocorre a diferenciação do parasita para a forma amastigota e a lise da membrana do vacúolo parasitóforo. Dá-se início à etapa de multiplicação no citoplasma da célula hospedeira (De Souza, *et al.* 2010).

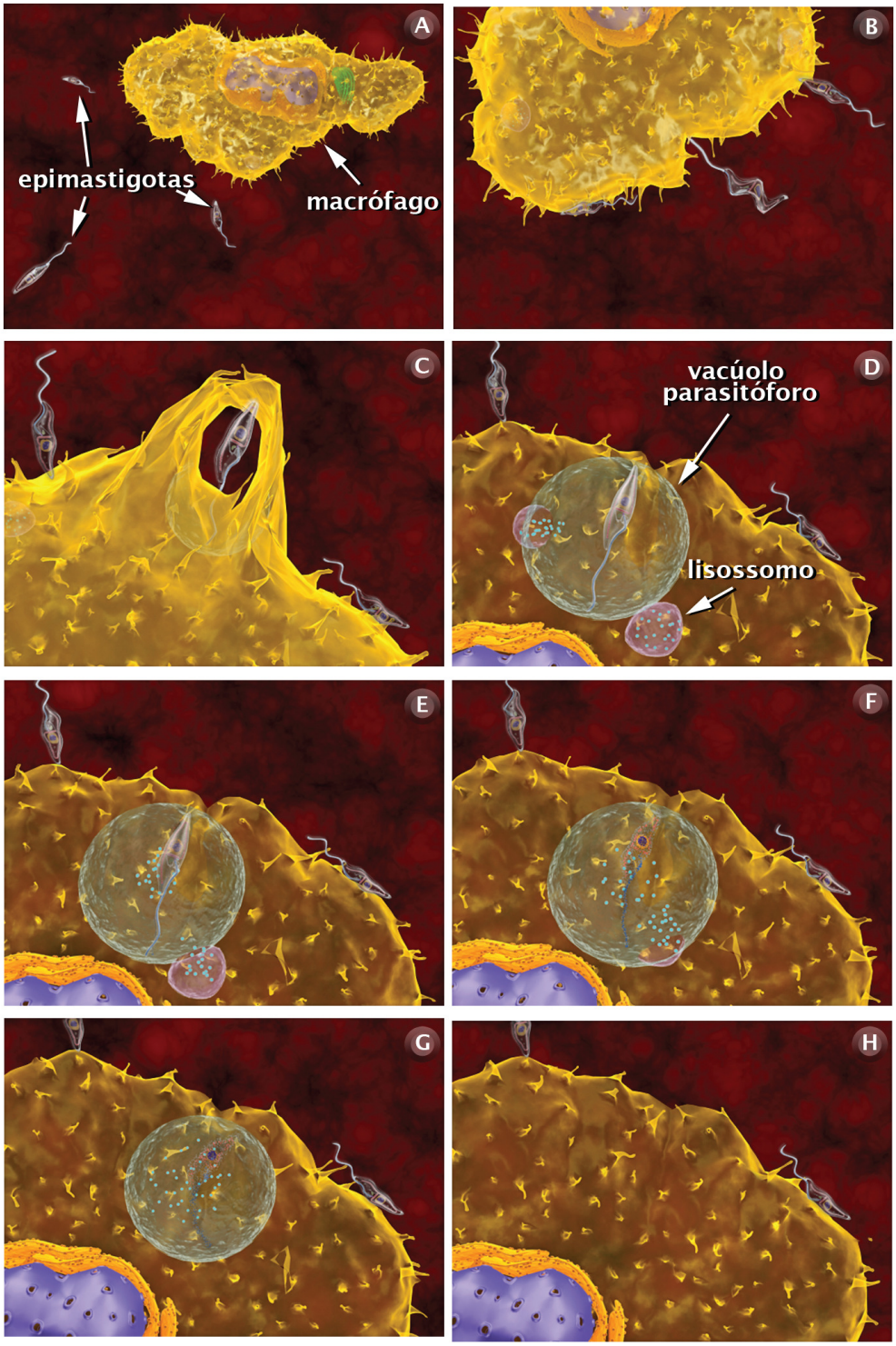
Fig. 20. Processo de interação do *T. cruzi* com a célula hospedeira (macrófago) **(Vídeo suplementar 11)**. (A) Tripomastigotas metacíclicos se aderindo e invadindo o macrófago. (B) Tripomastigota sendo fagocitado pelo macrófago e iniciando o processo de internalização via fagocitose, onde há a formação de pseudópodes e o recrutamento de lisossomos para o local de invasão do parasita, que se fundem ao vacúolo parasitóforo em formação. (C) Lisossomos liberam enzimas no interior do vacúolo. (D) Diferenciação dos tripomastigotas para amastigotas. (E) Lise do vacúolo parasitóforo. No citoplasma, as formas amastigotas se multiplicam por fissões binárias (F) sucessivas, podendo tomar todo o citoplasma. (G) Amastigotas se diferenciam na forma tripomastigota antes da célula hospedeira ser rompida pelo excesso de parasitos (H), mas pode ocorrer a lise antes da transformação ser completada, o que gera o aparecimento de formas ainda em desenvolvimento no meio externo.


A
macrófago
tripomastigota
B
C
vacúolo
parasitóforo
lisossomo
D
E
F
G
H

Interação da forma epimastigota com o macrófago

As formas epimastigotas não representam o estágio infeccioso. O processo de interação da forma epimastigota do *T. cruzi* com a célula hospedeira envolve as seguintes etapas: adesão e reconhecimento, sinalização, fagocitose e degradação. A etapa de adesão ocorre predominantemente pelo flagelo e envolve o reconhecimento de moléculas presentes na superfície das membranas do parasita e da célula do hospedeiro mamífero. A membrana do macrófago começa a envolver o parasita, formando um tipo de funil, que culmina na entrada do parasita. Após o processo de fagocitose, ocorre o recrutamento de lisossomos que se fundem ao vacúolo parasitóforo. No interior do vacúolo parasitóforo, a forma epimastigota é degradada.

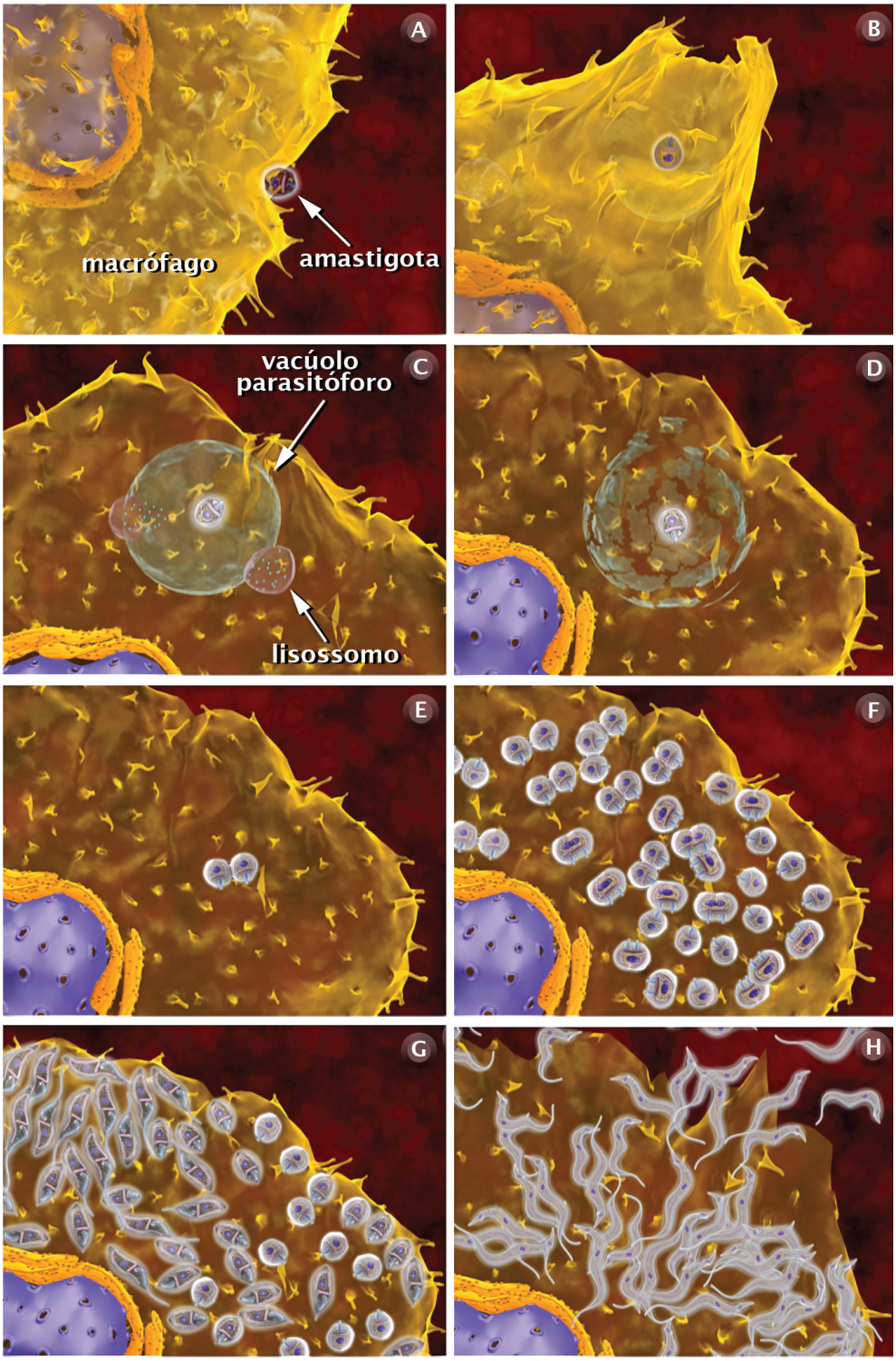
Fig. 21. Processo de interação da forma epimastigota do *T. cruzi* com a célula hospedeira (macrófago) **(Vídeo suplementar 12)**. (A) Formas epimastigotas e o macrófago. (B) Parasitas aderindo ao macrófago. (C) Epimastigota sendo fagocitada pelo macrófago e posteriormente, a formação do vacúolo parasitóforo (D). (E) Lisossomos liberam suas enzimas que degradam o parasito (F-G).


A
epimastigotas
macrófago
B
C
D
vacúolo
parasitóforo
lisossomo
E
F
G
H

Interação da forma amastigota com o macrófago

O processo de interação da forma amastigota do *T. cruzi* com a célula hospedeira envolve as seguintes etapas: adesão e reconhecimento, sinalização, invasão e multiplicação. A etapa de adesão envolve o reconhecimento de moléculas presentes na superfície do parasita e da célula do hospedeiro mamífero. Nas formas amastigotas, ocorre uma série de processos de sinalização celular, que resultam na fagocitose, onde a célula hospedeira emite pseudópodes que culminam na invasão do parasita. Posteriormente, ocorre fusão de lisossomos com o vacúolo parasitóforo e a lise da membrana do vacúolo parasitóforo e, assim, inicia-se a etapa de multiplicação no citoplasma da célula hospedeira (De Souza, *et al.* 2010).

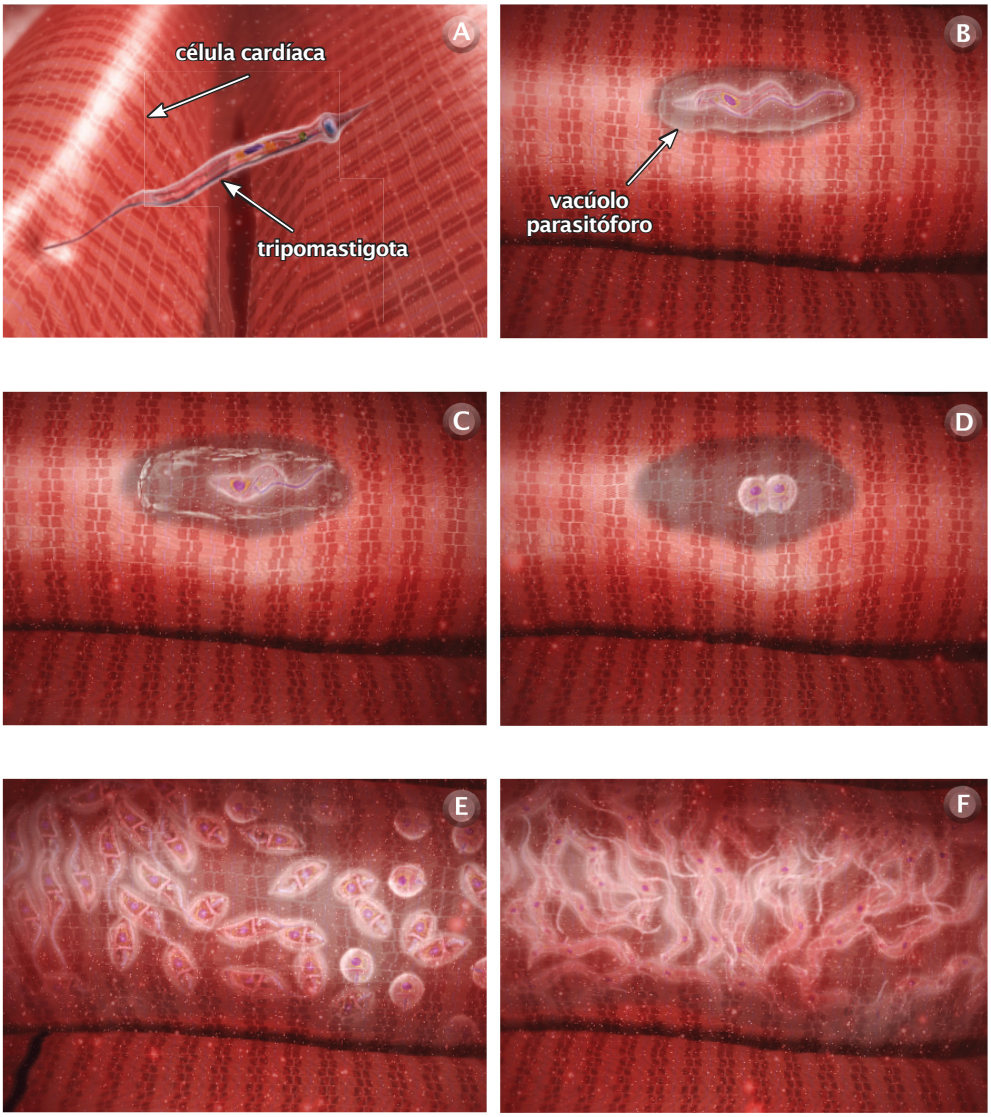
Fig. 22. Processo de interação da forma amastigota do *T. cruzi* com a célula hospedeira (macrófago) **(Vídeo suplementar 13)**. (A) Amastigota aderindo e invadindo o macrófago. (B) Amastigota sendo fagocitada pelo macrófago e posteriormente a formação do vacúolo parasitóforo (C). Lisossomos liberam enzimas no interior do vacúolo. (D) Lise da membrana do vacúolo parasitóforo. No citoplasma, multiplica-se por fissões binárias (E) sucessivas, podendo tomar todo o citoplasma. (F) Amastigotas se diferenciam em tripomastigotas antes da célula hospedeira ser rompida pelo excesso de parasitos (H), mas pode ocorrer a lise antes da transformação ser completada, o que gera o aparecimento de formas ainda em desenvolvimento no meio externo.


A
macrófago
amastigota
B
C
vacúolo
parasitóforo
lisossomo
D
E
F
G
H

Interação da forma tripomastigota com células cardíacas

O processo de tropismo do *T. cruzi* por células musculares envolve as seguintes etapas: adesão e reconhecimento, sinalização, invasão e multiplicação.

Fig. 23. Processo de interação da forma tripomastigota do *T. cruzi* com células musculares cardíacas **(Vídeo suplementar 14)**. (A) Tripomastigotas metacíclicos se aderindo e invadindo células cardíacas. (B) Tripomastigota no interior do vacúolo parasitóforo. (C) Diferenciação dos tripomastigotas para amastigotas e lise do vacúolo parasitóforo. (D) As formas amastigotas escapam para o citoplasma, onde se multiplicam por fissões binárias (F) sucessivas, podendo tomar todo o citoplasma. (E) Amastigotas se diferenciam na forma tripomastigota antes da célula hospedeira ser rompida pelo excesso de parasitos (F).

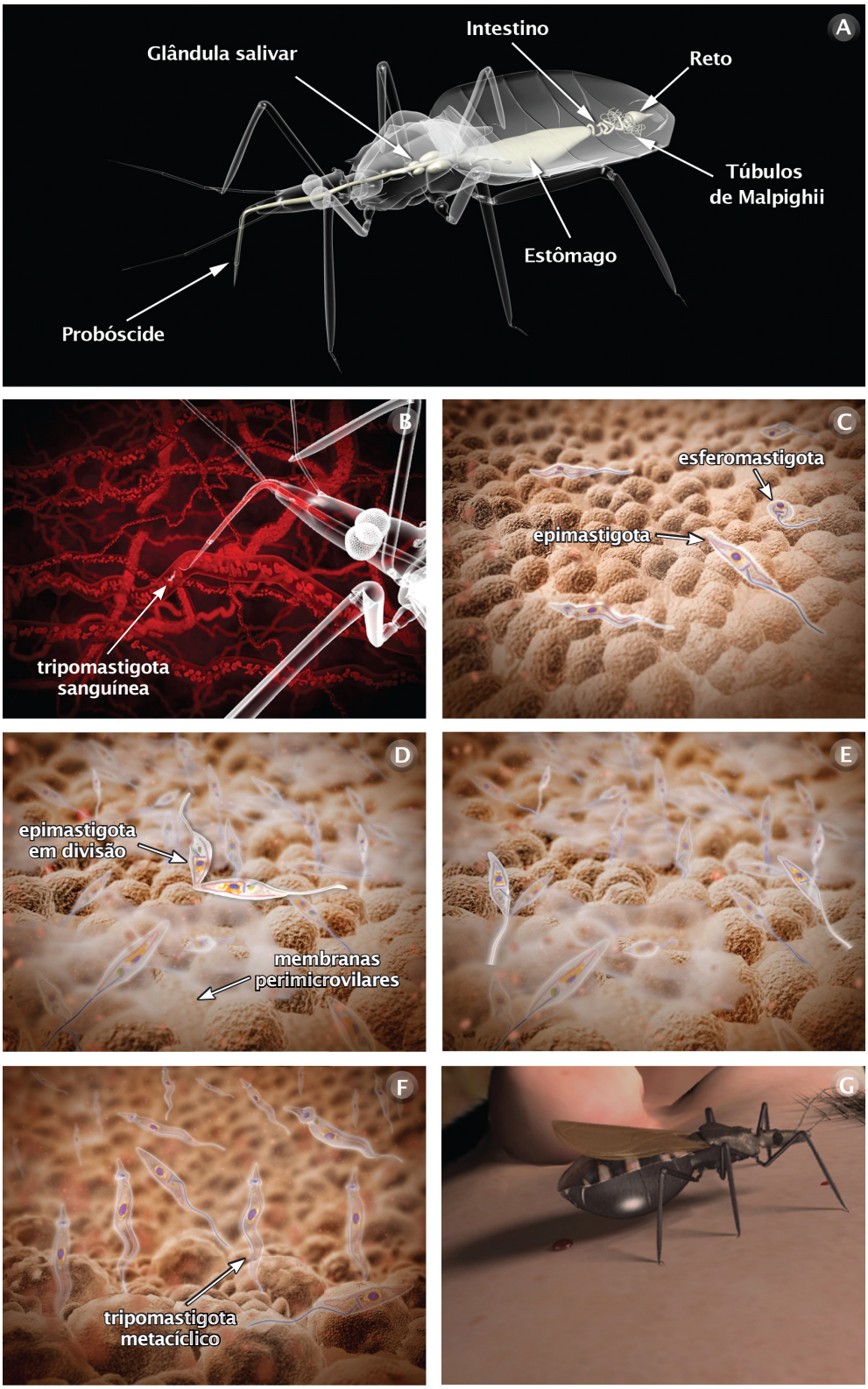

A
célula cardíaca
tripomastigota
B
vacúolo
parasitóforo
C
D
E
F

7. Interação do *Trypanosoma cruzi* com o hospedeiro invertebrado

A contaminação do barbeiro ocorre quando este pica um mamífero infectado e ingere formas tripomastigotas sanguíneas, que são conduzidas à porção anterior do estômago. Neste novo ambiente, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas e algumas esferomastigotas. Ainda no estômago, formas de transição, esferomastigotas e epimastigotas são digeridas. As formas epimastigotas sobreviventes, quando alcançam o intestino, começam a se multiplicar sucessivamente por divisão binária e se aderem às membranas perimicrovilares que são secretadas pelas células intestinais. Esta adesão ocorre predominantemente pela região do flagelo. Posteriormente, os epimastigotas se soltam e movem-se para o intestino posterior, onde iniciam o processo de diferenciação em tripomastigotas metacíclicos, que em seguida aderem à cutícula que reveste o epitélio do reto e do saco retal do inseto. Ao se soltarem do epitélio, podem ser eliminados na urina ou fezes do inseto em seu próximo repasto sanguíneo.

A contaminação de um hospedeiro vertebrado ocorre quando o barbeiro infectado pica o mamífero. Neste processo, o inseto geralmente defeca e urina, depositando, assim, sobre a pele ou mucosa do mamífero a forma tripomastigota metacíclica, que é a forma infectiva.

Fig. 24. Fases do ciclo de vida do *T. cruzi* no interior do inseto vetor **(Vídeo suplementar 15)**. Inicialmente, para melhor compreensão do ciclo de vida no interior do inseto, apresentamos uma vista esquemática do inseto hemíptero por transparência para observar o tubo digestório (A). (B) Inseto (barbeiro) hematófago ingerindo sangue com formas tripomastigotas metacíclicas presentes em um mamífero infectado. (C) No estômago do barbeiro, as formas tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas e algumas esferomastigotas. (D) Ao chegar ao intestino, as formas epimastigotas começam a se multiplicar por divisão binária e se aderem ao epitélio intestinal (E). (F) No reto, tripomastigotas metacíclicos aderidos ao epitélio. Os parasitas se soltam do epitélio, podendo ser eliminados na urina ou fezes do inseto (G).


A
Intestino
Glândula salivar
Reto
Túbulos
de Malpighii
Estômago
Probóscide
B
tripomastigota
sanguínea
C
esferomastigota
epimastigota
D
epimastigota
em divisão
membranas
perimicrovilares
E
F
tripomastigota
metacíclico
G

8. Referências básicas

Este trabalho não pretende substituir os livros didáticos e baseia-se em algumas revisões e capítulos de livros, devendo ser encarado apenas como uma das muitas fontes de informação no estudo do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.

De Souza, W. (2002). Special organelles of some pathogenic protozoa. Parasitol Res. *88*: 1013-25.

De Souza, W., Sant'Anna, C., Cunha-e-Silva, N. (2009). Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. Prog Histochem Cytochem. *44*: 67-124.

De Souza, W., De Carvalho, T.M., Barrias, E.S. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. Int J Cell Biol 18p.

Docampo, R., De Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., Moreno, S.N. (2005). Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. Nat Rev Microbiol. *3*: 251-261.

Liu, B., Liu, Y., Motyka, S.A., Agbo, E.E., Englund, P.T. (2005). Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. Trends Parasitol. *21*: 363-369.

Moreno, S.N., Docampo, R. (2009). The role of acidocalcisomes in parasitic protists. J Eukaryot Microbiol. *56*: 208-213.

Parsons, M. (2004). Glycosomes: parasites and the divergence of

peroxisomal purpose. Mol Microbiol. *53*: 717-724.

Rohloff, P., Docampo, R. (2008). A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. Exp Parasitol. *118*: 17-24.

Sant'Anna, C., Parussini, F., Lourenço, D., De Souza, W., Cazzulo, J.J., Cunha-e-Silva, N.L. (2008). All *Trypanosoma cruzi* developmental forms present lysosome-related organelles. Histochem Cell Biol. *130*: 1187-1198.

Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (2010). Boletim eletrônico epidemiológico: Situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública, *2*:10-11.

Soares, M.J., De Souza, W. (1987). Ultrastructural visualization of lipids in trypanosomatids. J. Protozool. *34:* 199-203.

Solari, A.J. (1980). The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. Chromosoma. *78*: 239-255.

Yoshida, N. (2008). *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. Parasitol Int. *57*: 105-109.

ISBN 978-85-7648-767-8
9 788576 487678