

PARASITISMO DO ENCÉFALO DE RATOS POR *Trypanosoma cruzi*

Parasitism of the Encephalo of Rats by Trypanosoma cruzi

João Roberto da Mata, Sara Dayane Santos; Fabiana Ribeiro da Mata..

Laboratório de Doença de Chagas do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB III) da Universidade Federal de Goiás. Campus Samambaia Cep 7401/970; Caixa Postal – 131 - Goiânia - Goiás.

Autor para correspondência e-mail: jrdamata@pop.com.br

Avenida Itaberaí; Quadra 07; lote 08; número 929; Jardim São Judas Tadeu; Goiânia – Goiás

Recebido em 07/03/2010 - Aceito em 15/06/2010

RESUMO

Chagas fez o primeiro relato de parasitismo cerebral em pacientes chagásicos. A maior susceptibilidade em crianças tem sido observada. Este trabalho objetivou avaliar o parasitismo encefálico em ratos Holtzman, de 10 e 30 dias de idade sob infecção com baixo e alto número de tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*. Ratos holtzman machos de 10 e 30 dias de idade foram inoculados intraperitonealmente com 5×10^3 ou $2,5 \times 10^4$ tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*. Os animais foram sacrificados aos 13 dias após inoculação sob anestesia por cloral hidratado, perfundidos com paraformaldeído em tampão fosfato a 4%. Fragmentos encefálicos foram processados para inclusão em paraplast ou glicol metacrilato. Secções de paraplast foram coradas com hematoxilina e eosina e as secções de resina coradas por azul de toluidina-orangeG-eritrosina. Imunohistoquímica foi realizada usando soro anti-*T. cruzi* de coelho e anticorpo IgG conjugado à peroxidase. O parasitismo encefálico foi discreto nos animais inoculados com 5×10^3 aos 10 ou 30 dias de idade, demonstrado por esparsos nódulos gliais. A inoculação de $2,5 \times 10^4$ induziu parasitismo encefálico mais intenso no grupo infectado aos 10 dias de idade. Áreas encefálicas desprovidas de barreira hematoencefálica apresentaram baixo parasitismo.

PALAVRAS-CHAVES: Encéfalo, *Trypanosoma cruzi*, ratos.

ABSTRACT

Chagas made the first report on encephalic parasitism in chagasic patients. The greater susceptibility of the children has been established. This present work aims at assessing the encephalic parasitism in 10-day-old and 30-day-old Holtzman rats after infection with low and high number of trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Male Holtzman rats with 10-day-old and 30-day-old were

inoculates whit 5×10^3 or $2,5 \times 10^4$ tripomastigotes of the Y strain of *T. cruzi* intraperitoneally. The animals were killed 13 days after inoculation under chloral hydrate perfused whit 4% phosphate-buffered paraformaldehyde. The fragments were processed for paraplasm or glycolmethacrylate embedding. The paraplasm sections were stained whit hematoxilina-eosin and resin section whit toluidine blue-orange C-erytrosin. Immunohistochemical were performed by using anti-*T. cruzi* serum obtained from *T. cruzi*-infected rabbit and a peroxidase conjugated-anti-rabbit IgG (Sigma). The encephalic parasitism was discrete in the infection whit 5×10^3 both 10-day-old and 30-day-old being revealed by sparse glial nodules. The inoculation of the $2,5 \times 10^4$ tripomastigotes/50g of body weight induced more intense encephalic parasitism in the group infected at day 10 of age. Encephalic areas devoid of blood brain barrier showed very low parasitism.

KEY-WORDS: Brain, *Trypanosoma cruzi*, rats.

INTRODUÇÃO

O mecanismo de entrada de vários agentes infecciosos no sistema nervoso central (SNC) não está completamente esclarecido, e a doença de Chagas ainda afeta milhões de pessoas na América Latina ocorrendo dentre estes casos, quadros de encefalites chagásicas (MATA et al, 2009). O avanço da idade otimiza a proteção do cérebro de crianças a infecções comuns nesta fase da vida, tais como meningites e encefalites bacterianas. Isto se deve não apenas a maior resistência adquirida pelos indivíduos mais velhos, mas pelo menos em parte, por alterações em receptores apresentados pela barreira hematoencefálica (TUOMANEN, 1994).

O relato do parasitismo encefálico em paciente chagásico está descrito desde 1911 (CHAGAS, 1911), e apesar disto a encefalopatia chagásica ainda continua sem terapêutica com eficiência completa (SOUZA-JUNIOR et al, 2009). Nesta mesma época, já se observou maior resistência de indivíduos adultos ao *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). A

maior susceptibilidade de crianças tem sido relatada com quadros de meningoencefalite em pacientes jovens (LIBONATTI, 1977; DIAS, 1985; MATA et al, 2009). Em torno de 10% dos casos de doença de Chagas apresentam algum grau de alteração neurológica, sendo os casos mais graves em criança abaixo de dois anos de idade, indivíduos imunossuprimidos por AIDS ou devido a transplantes de órgãos (PRATA, 1994).

Em camundongos o parasitismo encefálico é insignificante (JARDIM, 1967; AMARAL et al, 1975) a não ser que se utilize inóculo elevado (4×10^5 a $1,5 \times 10^6$). A inoculação de 100.000 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* em camundongos, não induziu parasitismo no cérebro de animais adultos, porém ocorreu nos animais jovens (COSTA et al, 1986).

Parasitismo encefálico tem sido relatado em ratos inoculados com a cepa Y (MENEZES & ALCÂNTARA, 1965; Campos, 1969; Jardim, 1971 a, b; Mata et al., 2000). Ratos com idade menor que 25 dias são mais sensíveis à

infecção por *T. cruzi*, com parasitemia mais elevada e maior mortalidade (KOLODNY, 1939a; CULBERTSON et al, 1942; MATA et al, 2009).

Este trabalho objetivou avaliar o parasitismo encefálico em ratos holtzman, de 10 e 30 dias de idade infectados com baixo e alto inóculo, e verificar o comprometimento de áreas desprovidas da barreira hematoencefálica durante a infecção do SNC pelo *T. cruzi*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram inoculados intraperitonealmente, com 5×10^3 ou $2,5 \times 10^4$ tripomastigotas da cepa Y (SILVA & NUSSENZWEIG, 1953) do *T. cruzi* por 50g de peso corporal. Foram utilizados 24 ratos Holtzman aos 10 ou 30 dias de idade, formando os seguintes grupos com quatro animais cada.

1º grupo - ratos de 10 dias, inoculados com 2.300 formas (5×10^3).

2º grupo - ratos de 10 dias, inoculados com 100.000 formas ($2,5 \times 10^4$).

3º grupo - ratos de 30 dias, inoculados com 8.000 formas ($2,5 \times 10^3$).

4º grupo – ratos de 30 dias inoculados com 300.000 formas ($2,5 \times 10^4$).

5º grupo – ratos controles de 10 dias.

6º grupo – ratos controles de 30 dias.

Os animais após a inoculação foram mantidos no biotério do laboratório de Bioquímica e Neurociências do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, recebendo água e ração (labina-purina) à vontade. Os animais foram sacrificados no 13º dia após a inoculação sob anestesia por hidrato de cloral durante a perfusão intracardíaca de salina seguido de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato

0,1M, pH 7,2. Foram feitas secções frontais do encéfalo ao nível do quiasma óptico, do corpo mamilar e na extremidade caudal da ponte. Os fragmentos foram processados para inclusão em paraplax ou em glicol metacrilato (GMA). Secções de 4 micrômetros de espessura foram coradas com hematoxilina/eosina e submetidas a contagem dos nódulos gliais e ninhos de amastigotas. Os resultados foram comparados pelo teste estatístico Anova. Outras secções de resina com 2 micrômetros de espessura foram coradas com azul de toluidina-orangeG-eritrosina. A imunohistoquímica indireta para detecção de antígenos do *T. cruzi* foi realizada usando soro de coelho infectado com *T. cruzi* e anticorpo anti-coelho obtido em cabra conjugado à peroxidase (Sigma), revelado com 3'3 diaminobenzidina (DAB) e contra-corados com hematoxilina diluída em água a 0,25% (STERNBERGER, 1986).

RESULTADOS

O parasitismo do encéfalo foi discreto, tanto em ratos aos 10 dias de idade (figura 1A) quanto aos 30 dias, inoculados com 5×10^3 tripomastigotas/50g demonstrado por nódulos gliais esparsos. Na maioria das secções, as amastigotas puderam ser identificadas somente pela técnica imunohistoquímica (figura 1B).

A inoculação de $2,5 \times 10^4$ tripomastigotas/50g induziu parasitismo encefálico mais intenso. O parasitismo foi maior no grupo infectado aos 10 dias de idade em comparação com a infecção dos ratos mais velhos (tabela -1). Aos 10 idades de idade os nódulos gliais (figura 1C) e ninhos de

amastigotas (figura 1D) foram particularmente numerosos no córtex cerebelar, sendo também encontrados em outras regiões do cerebelo. Nódulos gliais foram observados na região sub-pial (figura 2A) e ninhos por todo o

hemisfério cerebral (figura 2B). Áreas desprovidas de barreira hematoencefálicas tais como, área postrema, glândula pineal, plexo corióide (figura. 2C) e hipófise (figura 2D) mostraram raro parasitismo.

Tabela. 1 – Número de ninhos de amastigotas e de nódulos gliais no encéfalo de ratos Holtzman. Os ratos foram inoculados aos 10 ou 30 dias de idade, com 5×10^3 ou $2,5 \times 10^4$ tripomastigotas/50g de peso corporal (cepa Y do *Trypanosoma cruzi*) e sacrificados 13º dia de infecção.

| Grupos – ratos | Inóculo | Ninhos de Amastigotas | Nódulos |
|------------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|
| Infectados aos 10 dias | 5×10^3 | 18 ^a | 433 ^e |
| | $2,5 \times 10^4$ | 3.847 ^b | 1.196 ^f |
| Infectados aos 30 dias | 5×10^3 | 4 ^c | 6 ^g |
| | $2,5 \times 10^4$ | 560 ^d | 881 ^h |
| Controles | - | 00 | 00 |

Os valores com letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas. (anova).

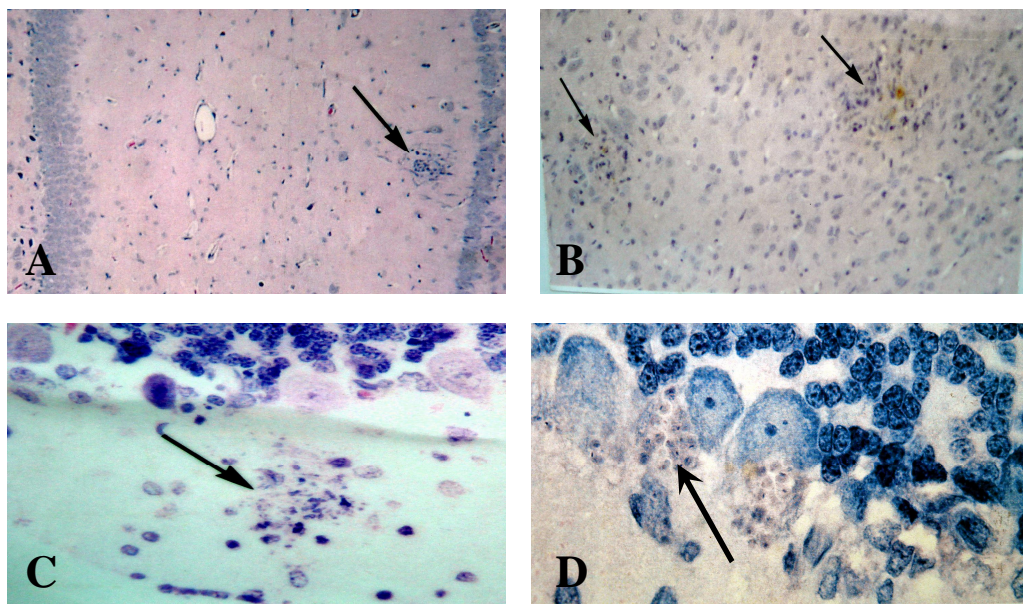


Figura 1 – Ratos inoculados aos 10 dias de idade com 5×10^3 ou $2,5 \times 10^4$ tripomastigotas/50g de peso corporal e sacrificados aos 13 dias de infecção.

A - Nódulo glial (seta) no córtex do hipocampo. Inóculo de 5×10^3 . Hematoxilina/eosina, 70X.

B - Nódulos gliais (setas) no córtex cerebral exibindo amastigotas (coradas em marrom). Inóculo de 5×10^3 . Imunohistoquímica para *Trypanosoma cruzi*, 80X.

C - Nódulo glial (seta) no córtex cerebelar. Inóculo de $2,5 \times 10^4$. Hematoxilina/eosina, 150X.

D - Ninho de amastigotas (seta) no córtex cerebelar. Inóculo de $2,5 \times 10^4$. Azul de toluidina-orangeG-eritrosina, 850X.

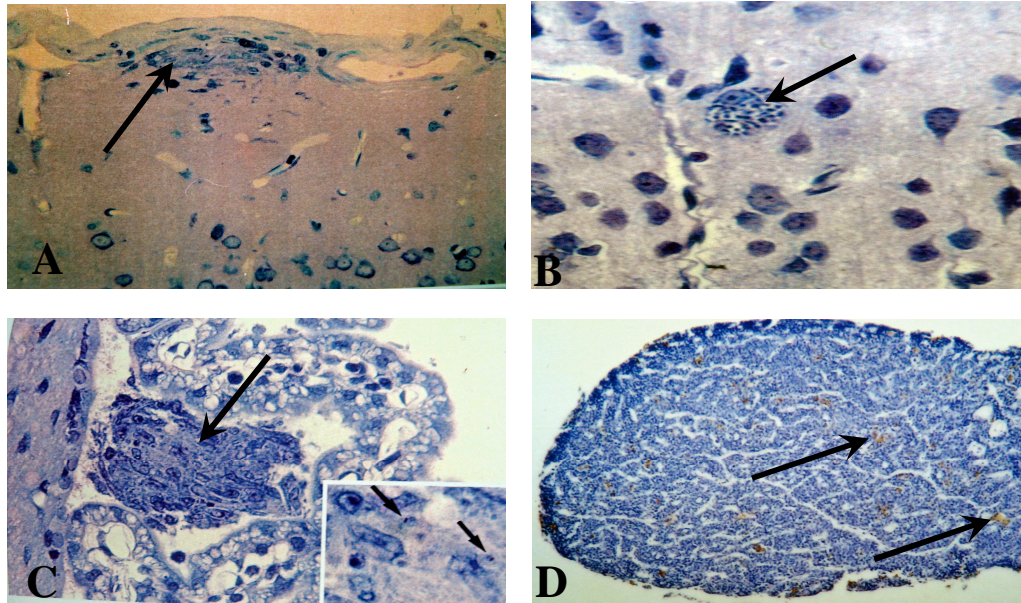


Figura 2 – Ratos infectados aos 30 dias de idade com $2,5 \times 10^4$ tripomastigotas/50g de peso corporal e sacrificados no 13º dia de infecção.

A - Nódulo glial sub-pial (seta) no córtex cerebral. Azul de toluidina-orange-G-eritrosina 300X.

B - Ninho de amastigotas íntegro na camada piramidal externa (seta) do córtex cerebral. Azul de toluidina-orangeG-eritrosina, 600X.

C - Nódulo glial (seta maior) no plexo coriódio do ventrículo lateral, 300X. Inseto exibindo amastigotas (setas menores). Azul de toluidina-orangeG-eritrosina, 850X.

D - Distribuição esparsa de amastigotas coradas em marrom (setas) na adeno-hipofise após imunohistoquímica para antígenos de *Trypanosoma cruzi*, 70X.

DISCUSSÃO

Apesar de que os mecanismos de penetração do *T. cruzi* no hospedeiro não estarem completamente definidos, este depende em parte da cepa do parasito (OLIVEIRA et al, 2007) e na interação parasito-hospedeiro durante o curso da doença há aumento da expressão de proteínas caderinas (DAMASCENO et al, 2008). Os resultados ratificam tanto a influência da idade do hospedeiro quanto do tamanho do inóculo no parasitismo do SNC. Animais inoculados com alto número de tripomastigotas ($2,5 \times 10^4$) apresentaram parasitismo mais intenso

em contraste com parasitismo discreto encontrados em ratos infectado com a mesma idade e baixo inóculo (5×10^3), conforme já registrado (JARDIM, 1967; AMARAL et al., 1975). De fato, houve maior parasitismo encefálico quando se conjugou a menor idade com o maior inóculo, todavia experimento com a cepa Y em ratos apresentam intensa miocardite e raro parasitismo encefálico o que sugere maior refratariedade do SNC ao *T. cruzi* (MACHADO & RIBEIRO, 1989; MATA et al, 2000).

A ausência de parasitismo em neurônios do SNC mesmo em animais jovens

ratificou a refratariedade destas células ao *T. cruzi* (TANOWITZ, 1992; MATA et al, 2000). Por outro lado, também não houve parasitismo preferencial pelas áreas desprovidas de barreira hematoencefálica, o que sugere que outros fatores, além da barreira hematoencefálica, podem estar envolvidos no comprometimento do SNC pelo *T. cruzi*. A elevada frequência de parasitismo nas vizinhanças das células de Purkinje sugere as alterações neste sítio, como fator promotor da diminuição do número destas células

(JARDIM, 1967) assim como inibidor da síntese protéica encontrada nestas células (CAMPOS, 1969) a despeito da ausência do parasitismo neuronal (MATA et al., 2000).

CONCLUSÕES

O parasitismo encefálico foi maior nos animais mais jovens quando infectados com o maior inóculo e as áreas encefálicas desprovidas de barreira hematoencefálica não foram alvos de parasitismo mais intensos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL CFS, TAFURI WL, BRENER Z. Frequência do parasitismo encefálico em camundongos experimentalmente inoculados com diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*. Rev Soc Bras Med Trop, 1975, 9(5): 243-246.

CAMPOS JCP. Radioutographic study of the protein synthesis in the Purkinje cells at the acute phase of the experimental trypanosomiasis cruzi in rats. Rev Inst Med Trop São Paulo, 1969, 11(1): 25-33.

CHAGAS C. Nova entidade mórbida no homem. Resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1911, 3: 219-275.

COSTA SCG, CALABRESE KS, ALENCAR AA, LAGRANGE PH. *Trypanosoma cruzi* invasion on structures related to development and central nervous system. Rev Bras Neurol. 1986, 22(6): 183-190.

CULBERTSON JT, KESSLER WR. Age resistance of mice to *Trypanosoma cruzi*. J Parasitol. 1942, 28: 155-158.

DAMASCENO AD, ARAUJO EG, MATA JR, FIORAVANTI MCS, SALES TP, PEIXOTO FJG. Upregulation of B-catenin and cadherin expression in hearts of mice in acute and chronic phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Ciência Animal Brasileira. 2008, 9(4): 1062-1070.

Mata, J.R., Santos, S.D., Mata, F.R./ Revista Eletrônica de Farmácia Vol 7 (2), 70 – 77, 2010.

DIAS JCP, LOYOLA CCP, BRENER S. Doença de Chagas em Minas Gerais: situação atual e perspectivas. Rev Bras Malariol Doenças Trop. 1985, 37: 7-28.

JARDIM E. Alterações quantitativas da células de Purkinje na fase aguda da moléstia de Chagas experimental no camundongo. Arq Neuro-Psiquiatr (São Paulo). 1967, 25(3): 199-208.

JARDIM E. Moléstia de Chagas experimental no rato: parasitismo do núcleo do III par craniano. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1971a, 13(6): 405-410.

JARDIM E. Moléstia de Chagas experimental no rato. Parasitismo do núcleo do III par craniano. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1971b, 13(6): 405-410.

KOLODNY MH. Studies on age resistance trypanosome infections: I. The resistance of rat on different ages to infection with *Trypanosoma cruzi*. Am J Hyg. 1939a, 29: 13-24.

LIBONATTI E, MAGLIO F. Manifestações neurológicas agudas na Doença de Chagas Mazza. Rev Neurol Arq. 1977, 3(3): 420-424.

MACHADO CRS, RIBEIRO ALP. Experimental American Trypanosomiasis in rats sympathetic denervation parasitism and inflammatory process. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989, 84: 549-556.

MATA JR, CAMARGOS ERS, CHIARI E, MACHADO CRS. *Trypanosoma cruzi* infection and the rat central nervous system: proliferation of parasites in astrocytes, and the brain reaction to parasitism. Brain Research Bulletin. 2000, 53(2): 153-162.

MATA JR, MATA FR, NASCIMENTO GNL, AVERSI-FERREIRA TA. Pequeno comprometimento do encéfalo em ratos Holtzman imunossuprimidos e infectado por *Trypanosoma cruzi*. Acta Scientiarum. Health Sciences. 2009, 31(1): 45-50.

MENEZES H, ALCÂNTARA FG. Distribuição dos parasitas (pseudo-cistos) no sistema nervoso central de ratos infectados experimentalmente pelo *Trypanosoma cruzi*. Rev Goiana Med. 1965, 11:21-25.

OLIVEIRA KM, SOUZA-JUNIOR NB, MATA FR, SABOIA-MORAIS SMT, AVERSI-FERREIRA TA, MATA JR. Alterações Teciduais agudas induzidas em ratos Wistar por *Trypanosoma cruzi*. Revista Eletrônica de Farmácia. 2007, 4(1): 86-94.

PRATA A . Chagas' disease. Infec Dis Clin Am. 1994, 8(1): 61-76.

Mata, J.R., Santos, S.D., Mata, F.R./ Revista Eletrônica de Farmácia Vol 7 (2), 70 – 77, 2010.

SILVA AA, NUSSENZWEIG G. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Fol Clin Biol. 1953, 20: 191-207.

SOUZA-JUNIOR NB, OLIVEIRA KM, SANTOS SD, MATA FR, MATA JR. Caracterização de um isolado de *Trypanosoma cruzi* obtido de um paciente chagásico com comprometimento cardíaco e digestivo. Revista Eletrônica de Farmácia, 2009, 6(3): 70-80.

STERNBERGER, L.A. Immunocytochemistry. 3rd ed., p 90-209. John Wiley and Sons, New York, 1986.

TANOWITZ HB, KIRCHHOFF LV, SIMON D, MORRIS, SA, WEISS LM, WITTNER M. Chagas'disease. Clin Microbiol Rev. 1992, 5: 400-419.

TUOMANEN E. Susceptibility to infection and age-related changes in the blood-brain barrier. Neurobiol Aging. 1994, 15(6): 757-758.