



MODELO DE DESNERVAÇÃO NEURONAL EM RATOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM DIFERENTES INÓCULOS DA CEPA Y DE *Trypanosoma cruzi*

Camila Fernanda Brustolin¹; Carina Ribeiro Lopes¹; Neide Martins Moreira²; Carolina Felício Braga²; Denise Lessa Aleixo³; Silvana Marque de Araujo³

RESUMO: Este trabalho descreve um modelo de desnervação neuronal em ratos infectados experimentalmente com diferentes inóculos da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, visando posteriores abordagens inovadoras para intervenção terapêutica de indivíduos infectados por *T. cruzi*. O experimento foi realizado como ensaio cego, controlado, randomizado por sorteio, utilizando 24 ratos Wistar, machos de 8 semanas em grupos: controle não infectado controle (CNI), infectados com 15.000 (G15), 30.000 (G30), 60.000 (G60), 250.000 (G250), 500.000 (G500), 1.000000 (G1.000000) e 5.000000 (G5.000000) formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, via intraperitoneal. Aos 75 dias de infecção, os animais foram mortos. O cólon foi retirado, dissecado para obtenção da túnica muscular e serosa e submetido a técnica de Giemsa. Foram quantificados neurônios mientéricos presentes em 120 campos microscópios ao longo da circunferência intestinal do segmento distal do cólon de cada rato. A desnervação (morte neuronal) foi avaliada pela comparação da densidade neuronal entre grupos infectados e controle. Os dados foram analisados utilizando os testes ANOVA – Tukey e Kruskal-Wallis, com 5% de significância. Os animais infectados com (15.000), (30.000), (60.000) e (250.000) formas tripomastigotas sanguíneas, não apresentaram diferença significativa na densidade neuronal do cólon distal quando comparado ao grupo CNI. Os grupos infectados com 500.000, 1.000000 e 5.000000 formas tripomastigotas sanguíneas apresentaram redução significativa deste parâmetro, em relação ao grupo controle não infectado e aos grupos com menor inoculo, mostrando que o grau de desnervação neuronal mientérica em ratos Wistar está relacionada ao tamanho do inoculo a partir de inóculos com 500.000 formas tripomastigotas.

PALAVRAS-CHAVE: *Trypanosoma cruzi*; doença de Chagas; neurônios; ratos wistar.

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, descrita por Carlos Chagas em 1909, é uma zoonose causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, e ainda hoje representa um grave problema de saúde pública (Schmunis, 2010). A estimativa é de que aproximadamente 10 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo, principalmente na América Latina, onde a doença é endêmica, e mais de 25 milhões de pessoas estão sob o risco de adquirir a infecção (World Health Organization, 2013).

¹Mestrandas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. carinaedaniel@hotmail.com; Brustolin_camilaf@hotmail.com

²Doutorandas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. caroline_17fb@hotmail.com; neidemartinsenf@yahoo.com

³Professora Doutora da Disciplina de Parasitologia da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. deniseparasito@gmail.com smaraujo@uem.br;

No decorrer da doença observam-se duas fases clínicas, uma aguda que dura de 30 a 90 dias, caracterizada pelo elevado parasitismo tecidual e parasitemia patente, nos humanos exibindo-se frequentemente como não aparente, e na grande maioria das vezes apresenta sintomas inespecíficos. É seguida de uma fase crônica onde cerca de 70% dos indivíduos permanecem assintomáticos caracterizando a forma indeterminada ou inaparente da doença. Contudo, 30% das pessoas infectadas desenvolvem a fase crônica sintomática em um período de 10 a 30 anos após a infecção desenvolvendo as formas clínicas cardíaca e digestiva (Prata, 2001; Rassi, 2012).

Embora excepcionalmente os parasitos possam ser encontrados nas secções histológicas de rotina, a patologia dos megas associada à doença de Chagas nada tem de específico. Há tempos as alterações anátomo-patológicas dos megas - megaesôfago e megacólon são bem estabelecidas. Seus achados incluem intensa fibrose do plexo mioentérico, com desaparecimento ou diminuição de neurônios, hipertrofia da camada muscular do esôfago e as reações inflamatórias focais tanto na vizinhança dos plexos, quanto em plena camada muscular (Dias, 2000).

Os roedores têm sido de extrema importância para estudos científicos em diversas áreas e são os animais mais utilizados pelos centros de pesquisa, por apresentarem características fisiológicas e genéticas muito semelhantes à dos humanos (Carvalho, 2009). Modelos de desnervação neuronal miontérica por *T. cruzi* em camundongos estão bem estabelecidos (Moreira et al, 2011) mas esta espécie é fatalmente sensível a esta infecção. Um modelo experimental mais resistente ao *T. cruzi* (Desquesnes, 2010) e com maior porte apresenta mais utilidade para o estudo de medicamentos ultra-diluídos. Cada espécie possui mecanismos fisiológicos próprios, podendo sofrer variações relacionadas ao sexo, idade, linhagem e resistência imunológica sofrendo, ainda, influência da dieta, manuseio e ambiente (Dantas, 2006). Dessa forma, este trabalho descreveu um modelo de desnervação neuronal em ratos Wistar infectados experimentalmente com diferentes inóculos da cepa Y de *T. cruzi*, visando abordagens inovadoras para intervenção terapêutica de indivíduos infectados por *T. cruzi*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ÉTICA:

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em experimentação animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Paraná - Parecer 110/2011.

2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL:

O experimento foi realizado como ensaio cego, controlado, randomizado por sorteio.

2.3 ANIMAIS:

Foram utilizados 24 ratos Wistar, machos de 8 semanas de idade, distribuídos em 8 grupos (N=3): controle não infectado (CNI), infectados com 15.000 (G15), 30.000 (G30), 60.000 (G60), 250.000 (G250), 500.000 (G500), 1.000000 (G1.000000) e 5.000000 (G5.000000) formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, via intraperitoneal. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno (dimensão 414 x 344 x 168 mm) tampadas com grade zincada com depressão central para deposição da ração e bebedouros. Os animais permaneceram em biotério climatizado (temperatura entre 21 e

23°C) com ciclo claro/escuro de 12h e com água (clorada) e ração (Nuvilab Cr-1[®] da Nuvital[®]) disponíveis “ad libitum”.

2.4 COLETA DE INTESTINO:

Aos 75 dias de infecção, os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico (cloridrato de cetamina 50mg/kg) e xilasina-10mg/kg, intraperitonealmente). O cólon de cada animal foi retirado, dissecado para obtenção da túnica muscular e serosa e submetido a técnica de Giemsa (Barbosa 1978).

2.5 ANÁLISE QUANTITATIVA DE NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS:

Foram quantificados os neurônios mioentéricos presentes em 120 campos microscópios equitativamente ao longo da circunferência intestinal do segmento distal do cólon de cada rato. Foi utilizado microscópio fotônico (Olympus CBA), com objetiva de 40X. A desnervação (morte neuronal) foi avaliada pela comparação da densidade neuronal entre grupos infectados e controle.

2.6 ANALISE ESTATÍSTICA:

A distribuição dos dados foi verificada com o teste D`Agostino Pearson. Para a comparação de dados entre os grupos foram utilizados os testes ANOVA-Tukey (para os que apresentaram distribuição normal), Kruskal-Wallis (para os que apresentaram distribuição não-especificada), com nível de significância de 5%. Foi utilizado o programa BioEstat 5.0[®].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, aos 75 dias de infecção, os animais infectados com (15.000), (30.000), (60.000) e (250.000) formas tripomastigotas sanguíneas não apresentaram diferença significativa na densidade neuronal no cólon distal quando comparado ao grupo CNI. Contudo, os grupos infectados com 500.000, 1.000000 e 5.000000 formas tripomastigotas sanguíneas apresentaram redução significativa neste parâmetro, em relação ao grupo controle não infectado e aos grupos com menor inoculo (Figura 1). No entanto, ao comparar a densidade neuronal entre os animais com estes três maiores inóculos, não foi observada diferença significativa. Estes dados coincidem com os de Moreira et al, (2011), que observaram que o grau de desnervação neuronal mioentérica da população neuronal total em camundongos não está relacionado ao tamanho do inoculo, mas sim ao tempo de infecção, quando comparados apenas dois inóculos 100 e 1000 tripomastigotas.

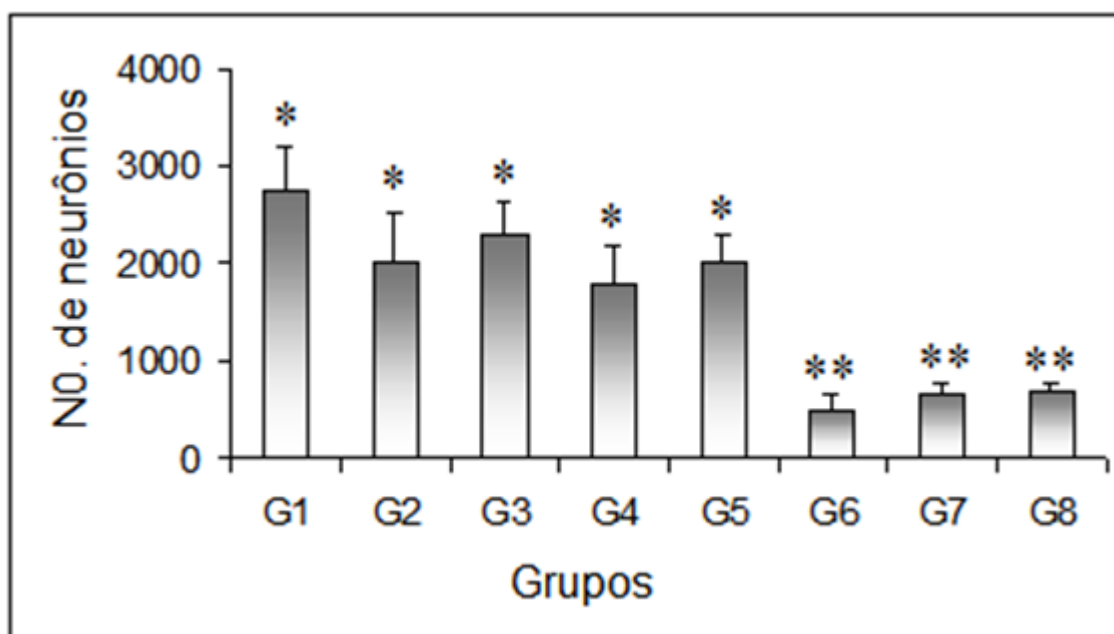


Figura 1 – Densidade neuronal miontérica do cólon distal de ratos, infectados com tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*, aos 75 dias, controle não infectado (G1), 15.000 formas tripomastigotas sanguíneas (G2), 30.000 (G3), 60.000 (G4), 250.000 (G5), 500.000 (G6), 1.000000 (G7) e 5.000000 (G8).

Algumas das principais complicações da doença de Chagas estão relacionadas ao comprometimento do funcionamento do tubo digestório e do coração. Entre elas, destaca-se o megaesôfago e megacolo, resultante da destruição de neurônios mioentéricos. Esta desnervação ocorre em graus variados de forma irregular e descontínua dependendo tanto do parasito quanto das condições do hospedeiro (Rassi, 2012).

4. CONCLUSÃO

O modelo de desnervação neuronal proposto utilizando ratos Wistar, infectados com diferentes inóculos da cepa Y de *T. cruzi* é válido, pois mostra alterações na população neuronal miontérica total com redução na densidade/morte neuronal e a redução a partir do inóculo de 500.000 formas tripomastigotas.

5. REFERENCIAS

BARBOSA A.J.A.. Técnica histoquímica para gânglios nervosos intramurais e preparados espessos. *Rev Bras Pes Méd Biol* 1978, 11: 95-97.

CARVALHO G. D. *et al.* Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. *Revista CERES* 56(1):51-57 (2009).

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen., n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1909, 1: 159-218.

DANTAS J. A. et AL. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. *Acta Sci. Health Sci.*, Maringá, v. 28, n. 2, p. 165-170, 2006

DESQUESNES, M.; LANA, M. Veterinary Aspects and Experimental Studies. In American Trypanosomiasis Chagas Disease: one hundred year of research. Edited by Telleria J, Tibayrenc M. London: Elsevier Inc.; 2010.

DIAS, J. C. P. Patologia da Doença de Chagas. In: BRENER, Zilman; ANDRADE, Zilton A.; NETTO, Manoel Barral. *Tripanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. PP 201-230.

Moreira N.M., Sant`Ana D.M.G., Araújo E.J.A., Toledo M.J.O., Gomes M.L. & Araújo S.M. (2011) Neuronal changes caused by *Trypanosoma cruzi*: an experimental model. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 83, 545-555.

Prata, A.; Clinical and epidemiological aspects of Chagas diseases. *Lancet Infect Dis* 1. 2001: 92-100.

RASSI A. Jr; RASSI A.; MARCONDES DE REZENDE J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am.* 2012 Jun;26(2):275-91.

SCHMUNIS, G.A; YADON Z.E.; Chagas disease: A ican health problem becoming a world health problem. *Acta Trop.* 2010; 115 (1-2): 14-21

WHO.; World Health Organization. Chagas diseases(American trypanosomiasis). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acessado em: 25/02/2013