

## RESULTADOS DAS INOCULAÇÕES INTRACEREBRAIS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE PARKINSONIANOS EM ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÕES

JAMES PITÁGORAS DE MATTOS \* — CLAUDIO DE MORAES ANDRADE \*\*  
ANGELA GONÇALVES DA SILVA \*\*\* — ALEXANDRE ALENCAR \*\*\*\*

---

**RESUMO** — Após as inoculações intracerebrais de líquido cefalorraquiano de pacientes parkinsonianos em 720 camundongos, no período de observação de 48 semanas, ocorreram 157 mortes de animais (21,8%): 76(31%) na primeira passagem, 41(17%) na segunda e 40(16%) na terceira. A incidência de mortalidade mostrou-se significativa, mais marcante na primeira passagem e nas 7 primeiras semanas nas três passagens. Tumefação, desintegração dos dendritos e edema das expansões nervosas constituíram os mais valorizados achados ultra-estruturais nos cérebros dos camundongos examinados.

**Results of intracerebral inoculations of parkinsonian's cerebrospinal fluid in animals.**

**SUMMARY** — Intracerebral inoculation of parkinsonian's cerebrospinal fluid were carried out in 720 mice, under strict observation during 48 weeks. The inoculations led to a mortality rate of 157 mice (21.8%), being 31% (76) in the first, 17% (41) in the second, and 16% (40) after the third one. High mortality rates occurred, most prevalent in the first inoculation and during the first 7 weeks. Dendrite tumefaction and desintegration as well as nerve cell swelling were the ultrastructural changes observed in the brain of mice.

---

A despeito do grande avanço ultimamente observado nas modernas técnicas de investigação da doença de Parkinson, a origem da enfermidade ainda constitui um mistério.

Com o objetivo de contribuir para o seu estudo etiológico, idealizamos a linha de pesquisa que constou da inoculação de líquido cefalorraquiano (LCR) em animais de experimentação para, posteriormente, serem analisadas a incidência de mortalidade e as alterações ultra-estruturais nestes animais.

### MATERIAL E MÉTODOS

Do nosso material constam os seguintes elementos: a) LCR de 20 pacientes parkinsonianos para inoculação intracerebral em camundongos recém-nascidos; b) 10 encéfalos de camundongos adultos selecionados para o estudo ultra-estrutural; em 9 inoculamos LCR de pacientes parkinsonianos e em um, de controle, solução tampão-fosfato (PBS).

As inoculações em animais de experimentação obedeceram à seguinte ordem: 1. Utilizando seringa hipodérmica injetamos 0,02 ml de LCR, de 20 pacientes parkinsonianos, diluído a 1/5 em solução tampão-fosfato (PBS), pH 7,2, estéril, por via intracerebral, em 12 camun-

---

Trabalho realizado no Instituto de Neurologia Deolindo Couto (INDC) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e no Departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia da UFRJ: \* Professor Adjunto e Doutor; \*\* Professor Adjunto e Docente Livre; \*\*\* Técnica de nível superior da FINEP; \*\*\*\* Professor Adjunto e Chefe do Laboratório de Neuropatologia do INDC.

dongos recém-nascidos para cada caso (1ª passagem). 2. Após uma semana, para cada um dos 20 casos, coletamos o cérebro de um animal da 1ª passagem; este foi macerado em Ten Brocken, estéril, sob refrigeração, na proporção de 1/5 (p/v), em PBS estéril, pH 7,2. Em seguida, os macerados foram submetidos, durante 60 min, a centrifugação a 10000 r.p.m., em aparelho BECKMAN, modelo J-21B, rotor JA-21 (8000 Xg). Injetamos 0,02 ml do sobrenadante, por via intracerebral, em outros 12 camundongos recém-nascidos para cada caso (2ª passagem). 3. Após outra semana, para cada um dos 20 casos, selecionamos o cérebro de um animal da 2ª passagem e, seguindo-se a mesma técnica, procedemos a 3ª passagem. Nas três passagens, todos os animais de experimentação foram colocados em observação durante 48 semanas. Ao final desse período estudamos a incidência de mortalidade ocorrida e realizamos o estudo ultra-estrutural em alguns camundongos adultos.

Para o estudo ultra-estrutural, selecionamos apenas nove (720 inoculados) dos que sobreviveram após decorrido o período de um ano. A seleção obedeceu a certos critérios, tais como o estado e o comportamento dos mesmos, assim como os resultados da coloração negativa também realizada. De cada passagem, escolhemos três camundongos referentes aos casos de pacientes parkinsonianos, assim distribuídos: 1. da primeira passagem: referentes aos casos 5, 11 e 15; 2. da segunda passagem: referentes aos casos 5, 10 e 12; 3. da terceira passagem: referentes aos casos 3, 19 e 20.

O camundongo controle, inoculado com 0,02 ml de solução tampão-fosfato (PBS), também ficou em observação por um período de um ano.

Quanto aos 20 pacientes parkinsonianos, 11 eram femininos e 9 masculinos; 17 eram brancos, dois pretos e um pardo; contavam com a média de idade de 60 anos e todos pertenciam ao tipo etiológico idiopático.

O processamento dos cérebros dos camundongos inoculados realizou-se de acordo com as normas modernas para a observação de amostras biológicas em microscópio eletrônico de transmissão: fixados inicialmente em glutaraldeído a 2%, desidratados em álcool etílico, incluídos em cápsulas de gelatina, cortados com navalha de vidro no ultramicrotomo REICHERT e corados em solução de acetato de uranila a 1%.

## RESULTADOS

Dividiremos a apresentação dos resultados analisando a incidência de mortalidade dos animais de experimentação e o estudo ultra-estrutural dos cérebros de camundongos após inoculações de LCR de parkinsonianos ou do sobrenadante de cérebros obtidos dos animais adultos da 1ª e da 2ª passagens.

1. Incidência de mortalidade — 1a) Mortalidade observada na população de camundongos, no período de um ano, após inoculação intracerebral de LCR de pacientes parkinsonianos (1ª passagem): do total de 240 camundongos inoculados, correspondentes aos 20 casos de parkinsonismo, observamos 76 mortes (31%) nas mais variadas semanas; no entanto, 33 destas (43%) ocorreram nas 7 primeiras semanas (Fig. 1.1 e Tabela 1). 1b) Mortalidade observada na população de camundongos, no período de um ano, após inoculação intracerebral do sobrenadante de cérebros obtidos de animais adultos da 1ª passagem (2ª passagem): do total de 240 camundongos inoculados, referentes aos 20 casos de parkinsonismo, observamos 41 mortes (17%) nas mais variadas semanas; porém, 18 destas (43%) ocorreram nas 7 primeiras semanas (Fig. 1.2 e Tabela 1). 1c) Mortalidade observada na população de camundongos, no período de um ano, após inoculação intracerebral do sobrenadante de cérebros obtidos dos animais adultos da 2ª passagem (3ª passagem): do total de 240 camundongos inoculados, relativos aos 20 casos de parkinsonismo, observamos 40 mortes (16%) nas mais variadas semanas, sendo que 25 destas (62%) ocorreram nas 7 primeiras semanas (Fig. 1.3 e Tabela 1).

2. Estudo ultra-estrutural de cérebros de camundongos após inoculações de LCR de parkinsonianos — 2a) Resultados no grupo controle: após inoculações intracerebrais de tampão-fosfato (PBS) em 12 camundongos, feitas um ano antes, os cortes correspondentes ao lobo temporal e ao tronco cerebral mostraram: alargamento do espaço intersticial, mitocôndrias de grande porte, predominância das fibras nervosas amielínicas sobre as mielínicas (Fig. 2.1). 2b) Resultados no grupo inoculado com LCR ou com o sobrenadante de cérebros obtidos dos animais adultos da 1ª e da 2ª passagens: os cortes correspondentes ao lobo temporal e ao tronco cerebral de 9 animais previamente selecionados evidenciaram alargamento do espaço intersticial, alterações mitocondriais tais como tumefação e desintegração de suas cristas, alterações nos dendritos tais como tumefação e desintegração, expansões nervosas edemaciadas (Fig. 2.2).

Passagens	Resultados nas 48 semanas			Mortalidade		
	Inoculados	Mortos	%	48 Sem	7 Primeiras Sem	%
1º	240	76	31	76	33	43
2º	240	41	17	41	18	43
3º	240	40	16	40	25	62
Totais	720	157	22	157	76	49

Tabela 1 — Incidência de mortalidade global dos camundongos, nas diferentes passagens, após 720 inoculações intracerebrais de LCR de parkinsonianos ou do sobrenadante de cérebros obtidos de animais adultos. Sem, semanas.

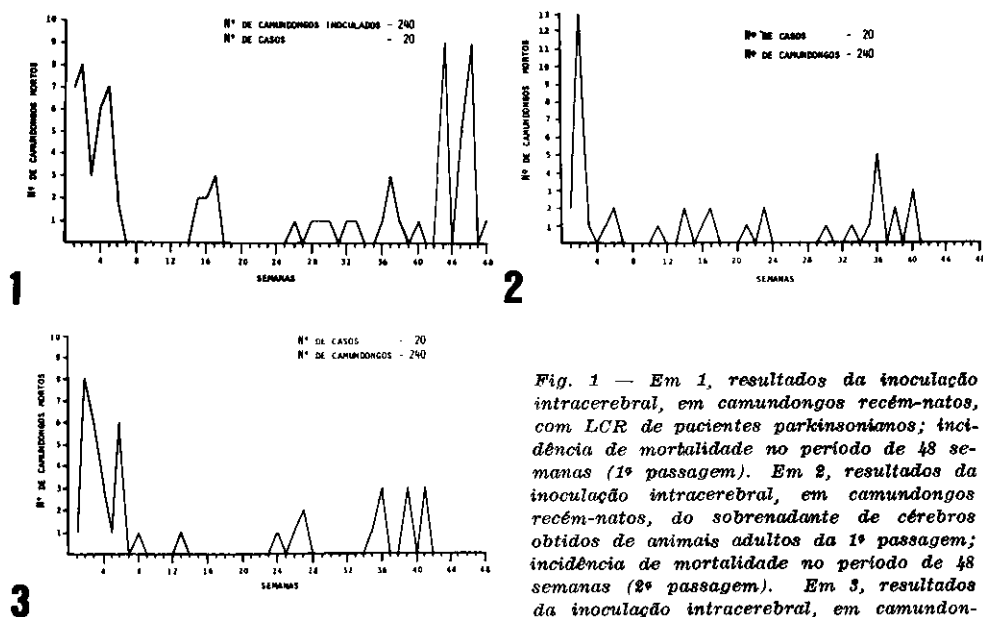


Fig. 1 — Em 1, resultados da inoculação intracerebral, em camundongos recém-natos, com LCR de pacientes parkinsonianos; incidência de mortalidade no período de 48 semanas (1ª passagem). Em 2, resultados da inoculação intracerebral, em camundongos recém-natos, do sobrenadante de cérebros obtidos de animais adultos da 1ª passagem; incidência de mortalidade no período de 48 semanas (2ª passagem). Em 3, resultados da inoculação intracerebral, em camundongos recém-natos, do sobrenadante de

cérebros obtidos de animais adultos da 2ª passagem; incidência de mortalidade no período de 48 semanas (3ª passagem).

#### COMENTÁRIOS

Inicialmente, gostaríamos de chamar a atenção para a análise da incidência de mortalidade nos animais de experimentação, após inoculação intracerebral de LCR ou do sobrenadante de cérebros obtidos de animais adultos da 1ª e da 2ª passagens, análise esta observada independentemente das condições a que os animais estavam submetidos. O número de camundongos mortos significou o número de camundongos "encontrados mortos" ou em estado agônico, no período de observação de 48 semanas. Em que pesem os cuidados com estes animais em colônias, sabemos que ocorrem mortes que não guardam relação com as inoculações e que são devidas às condições ambientais desfavoráveis, tais como: frio, calor, fome, sede e agressões, entre outras. Por outro lado, atente-se, também, para certas enfermidades que comumente cursam em animais submetidos a encarceramentos, isto é: micoses e adenocarcinomas mamários. A mortalidade observada não significou, pois, necessariamente, conseqüência das inoculações intracerebrais. Os eventos comprometeram em parte, obviamente, o valor

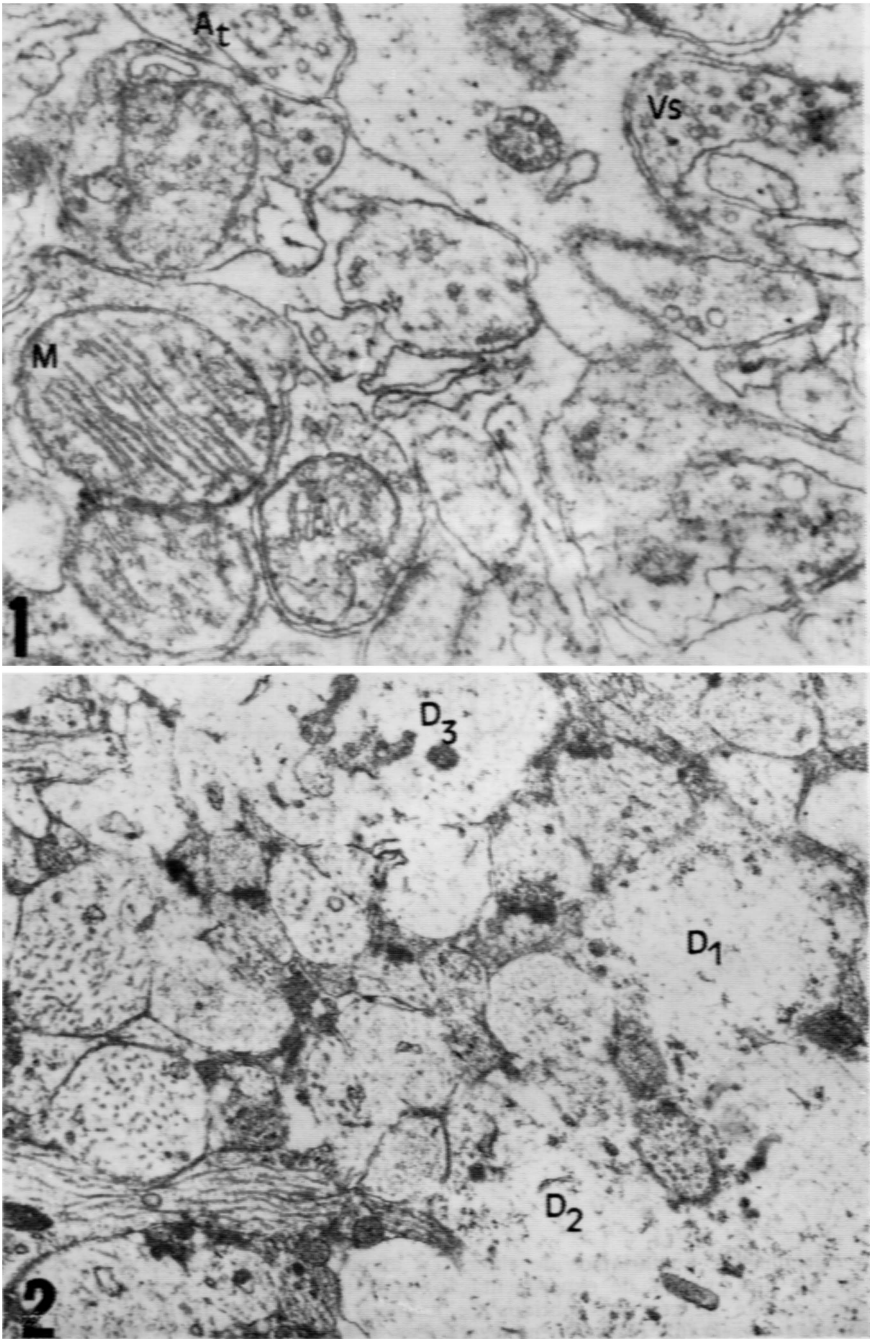


Fig. 2 — Em 1, eletronomicrografia de cérebro de camundongo, fixado em glutaraldeído, sacrificado após inoculação intracerebral de solução tampão-fosfato, um ano antes; corte correspondente ao lobo temporal: dendritos e axônios terminais ( $A_t$ ) com vesículas sinápticas ( $V_s$ ), assim como mitocôndria ( $M$ ) de grande porte, alargamento do espaço intersticial ( $57000\times$ ). Em 2, eletronomicrografia de cérebro de camundongo adulto, fixado em glutaraldeído, sacrificado 45 dias após inoculação intracerebral de LCR de parkinsoniano; corte correspondente ao lobo temporal: vêem-se no neurópilo, dendritos bem conservados e, outros ( $D_1, D_2, D_3$ ), alterados, como em processo de desintegração ( $22000\times$ ).

da análise de mortalidade dos animais. Assim, dos 720 camundongos inoculados, 157 (22%), morreram: 76 (31%) na primeira passagem, 41 (17%) na segunda, e 40 (16%) na terceira (Tabela 1). Acrescente-se que o tempo médio de vida dos camundongos brancos suíços, utilizados nesta pesquisa é de, aproximadamente, dois anos (96 semanas). No grupo controle de camundongos, no qual fizemos inoculações intracerebrais com solução tampão-fosfato (PBS), não houve mortes, o que demonstra certa importância, a despeito das adversidades apontadas.

Consideramos oportuno analisar a mortalidade dos camundongos ocorrida nas 7 primeiras semanas que se seguiram às inoculações intracerebrais. O que nos chamou a atenção, particularmente, foi o fato de a grande mortalidade observada na primeira passagem (43%) ter-se mantido na segunda (43%) e aumentado na terceira (62%). Na primeira, esta poderia ter sido determinada por fator tóxico-alérgico do LCR. No entanto, nas inoculações subseqüentes — processadas com suspensões de cérebros de animais adultos — esta não poderia ter sido atribuída a fatores tóxico-alérgicos e, sim, ao aumento da virulência pela possível presença de agente infeccioso (?) desconhecido. Por último, lamentamos profundamente a inexistência, na literatura consultada, de dados que pudessem ser cotejados com os nossos.

No que se refere ao estudo ultra-estrutural de cérebros de camundongos (grupo controle e grupo inoculado com LCR de parkinsonianos), não valorizamos o encontro das alterações mitocondriais e do alargamento do espaço intersticial, visto terem ocorrido em ambos os grupos. Todavia, a tumefação e a desintegração dos dendritos, assim como o edema das expansões nervosas, além de mais expressivas, somente ocorreram no grupo inoculado com LCR ou com o sobrenadante de cérebros de animais. Infelizmente, também não encontramos para este ensaio, na literatura, estudo similar que servisse de confronto com os nossos resultados, a não ser o de Gibbs e Gajdusek<sup>1</sup> que, em 1982, demonstrara a falha da transmissão primária da doença de Parkinson para vários animais, após inoculações de tecidos de autópsias de 12 pacientes.

#### REFERENCIA

1. Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC — An update on long-term in vivo and in vitro studies designed to identify a virus as the cause of amyotrophic lateral sclerosis, parkinsonism-dementia, and Parkinson's disease. In Rowland LP (ed): *Human Motor Neuron Diseases*. Raven Press, New York, 1982, pg 343.