

ALTERAÇÕES QUANTITATIVAS DAS CÉLULAS DE PURKINJE NA MOLESTIA DE CHAGAS EXPERIMENTAL NO CAMUNDONGO

EDYMAR JARDIM *

Desde as primeiras descrições de Carlos Chagas sobre a patologia da moléstia que leva o seu nome, é salientada a importância do comprometimento do sistema nervoso central. O grande cientista brasileiro afirmava então, "que relativamente à frequência das formas nervosas da tripanosomiase, possuímos numerosas observações que nos autorizam a afirmar que esta doença, talvez, provoque, em patologia humana o maior número de afecções orgânicas do sistema nervoso central" ⁴.

No entanto, a partir das publicações iniciais sobre a moléstia de Chagas, a atenção dos estudiosos dirigiu-se para as formas cardíacas, talvez em virtude de sua maior frequência. Daí o elevado número de trabalhos sobre os diferentes aspectos clínicos e patológicos dessa forma da moléstia.

Por outro lado, as investigações neuropatológicas são escassas, restringindo-se, em geral, à descrição de lesões observadas no sistema nervoso. Uma nova etapa das pesquisas sobre a moléstia de Chagas foi inaugurada por Köberle que, através de investigações originais, deixou bem clara a necessidade de estudos quantitativos sistematizados para a avaliação do grau de comprometimento do sistema nervoso, de sua extensão e de sua correlação com os achados clínicos. Este investigador chamou a atenção para o fato de que a simples verificação de lesões parenquimatosas não é suficiente para o estudo da forma nervosa, mas que "o patologista deve fazer constar o grau de destruição dos neurônios mediante investigações quantitativas das distintas partes do sistema nervoso central" ⁶.

Os estudos de Köberle e seus colaboradores, dirigidos sempre para a determinação das alterações quantitativas neuronais, vieram abrir novo panorama nas pesquisas sobre a patogenia dos megas (megaesôfago, megacolo, megabexiga, etc.) e da cardiopatia chagásica.

A ampla documentação neurológica apresentada por Chagas, há 50 anos, não encontrou repetição. A análise da literatura especializada não confirma o elevado número de casos neurológicos previsto por Chagas em suas primeiras publicações. A casuística é, em verdade, escassa. Poderia, então, surgir a pergunta: teriam desaparecido as formas nervosas da doença? Parece-nos que não. Existe, sim, dificuldade na correlação entre os diver-

Resumo da tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

* Professor Assistente do Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Prof. J. Armbrust-Figueiredo).

sos aspectos clínicos e a possível etiologia chagásica; sômente os estudos experimentais e os exames neuropatológicos de rotina poderão confirmar as suspeitas clínicas diagnósticas, permitindo que a moléstia de Chagas venha ocupar a posição de relêvo que lhe é devida dentro da Neurologia.

O estudo quantitativo sistematizado dos elementos neuronais na moléstia de Chagas vem sendo realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto desde 1955. Nessa ocasião Köberle iniciou suas pesquisas, que vêm se desenvolvendo de maneira contínua através dos últimos anos, congregando os esforços de diferentes Serviços. Vários setores da moléstia têm sido abordados, resultando em novos e importantes esclarecimentos sôbre o problema; investigações de valor têm constituído o assunto básico de várias teses apresentadas à nossa Faculdade, e o Departamento de Patologia continua a estabelecer os alicerces da estrutura dessa nova fase da moléstia de Chagas, demonstrando que as formas nervosas são, indiscutivelmente, "a essência da enfermidade" ⁶, pois as demais alterações orgânicas observadas devem ser consideradas como consequência da agressão inicial ao sistema nervoso, central ou periférico.

Köberle tem acentuado que êsse estudo "exige uma estreita colaboração do clínico com o patologista" ⁶. Decidimo-nos, pois, estudar um pequeno item da neuropatologia chagásica, ou seja, as alterações quantitativas das células de Purkinje na moléstia de Chagas experimental no camundongo.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizamos 24 camundongos albinos jovens, com idades variando entre 18 e 20 dias, de ambos os sexos, cujos pesos variaram entre 10 e 12 g. Dêsses 24 animais, 10 constituíram o grupo contrôle e 14 o grupo patológico.

Os animais do grupo normal são representados no texto, nos gráficos e nas tabelas, pelas letras CN e os do grupo patológico por CP, seguidas pelo número de ordem.

Animal	Dias após a inoculação				
	5º	6º	7º	8º	9º
CP1	2	6	9	22	
CP2	4	11	11	5	
CP3	2	6	11		
CP4	7	9	19		
CP5	9	18	28		
CP6	6	16	25		
CP7	6	14	14		
CP8	5	11	14		
CP9	4	10	10	32	
CP10	9	14	22	32	
CP11	5	11	18	32	
CP12	4	11	22	30	
CP13	4	12	5	5	
CP14	3	10	10	11	10

Tabela 1 — Médias de contagens de parasitos em 30 campos diferentes de 400× em cada animal.

A inoculação foi feita por via intraperitoneal com 0,1 ml de sangue citratado, obtido por punção cardíaca de outros camundongos parasitados com *T. cruzi*. Foi usada a cepa "Y" mantida no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, cujos animais foram submetidos previamente ao exame parasitêmico, colocando-se, entre lâmina e lamínula, uma gôta de sangue extraído por punção da cauda do animal. A parasitemia revelou, em todos os casos, 20 a 25 parasitos em média por campo de 400×, obtida por contagem de 30 campos diferentes (tabela 1).

A parasitemia dos animais inoculados foi verificada diariamente a partir do 5º dia de inoculação, segundo a técnica descrita. Os valores correspondentes constam da tabela 1.

Foram aproveitados os animais que morreram ou foram sacrificados entre o 7º e 9º dias após a inoculação. Os animais foram observados cada 2 horas a partir do 5º dia após a inoculação, a fim de que, em caso de morte, não houvesse demora na fixação do material, evitando a lise do sistema nervoso central. Os animais só foram sacrificados quando apresentavam quadros agônicos, caracterizados por grande prostração e por paralisias de segmentos corporais.

Os cerebelos foram retirados em bloco com o cérebro e fixados imediatamente em formol a 10%.

Antes de proceder ao estudo do material, verificamos o tamanho médio das células de Purkinje no camundongo, a fim de determinar a espessura dos cortes que deveriam ser usados, evitando que uma mesma célula fôsse contada mais de uma vez em cortes histológicos sucessivos. Para essa verificação usamos a câmara de Spencer, realizando medidas celulares em 5 camundongos normais. Encontramos os valores citados na tabela 2.

CN1		CN2		CN3		CN4		CN5	
Nº	Valôres	Nº	Valôres	Nº	Valôres	Nº	Valôres	Nº	Valôres
1	13,32	1	12,21	1	8,88	1	10,43	1	12,21
2	15,32	2	13,76	2	8,88	2	11,10	2	10,88
3	13,32	3	10,88	3	13,32	3	12,65	3	12,44
4	12,44	4	13,54	4	10,43	4	12,21	4	11,77
5	13,32	5	15,32	5	13,54	5	13,54	5	11,99
6	12,44	6	13,32	6	11,54	6	11,10	6	13,32
7	15,10	7	11,77	7	8,88	7	8,88	7	12,65
8	11,99	8	13,54	8	9,99	8	9,99	8	12,88
9	11,99	9	12,21	9	12,88	9	11,99	9	11,77
10	13,76	10	11,10	10	9,10	10	9,10	10	12,65
Total: 605,64						Média: 12,11 micra			

Tabela 2 — Medidas das células de Purkinje em 5 camundongos normais.

Baseados nesse valor médio, fizemos cortes seriados de 8 micra de espessura, estudando cada terceiro corte. Obtivemos cerca de 90 cortes para cada animal.

O método de coloração empregado foi o da hematoxilina-eosina, satisfatório para o estudo quantitativo, segundo a experiência de Köberle e colaboradores.

As contagens foram feitas em 200 campos diferentes de 400×, tomados indiscriminadamente para cada cerebelo de animal normal ou portador de tripanosomiase; contudo as contagens foram sempre efetuadas no segmento linear das folhas cerebelares. Foram examinados 4.800 campos, e contadas 60.718 células. Nessa

contagem foram incluídas tôdas as células de Purkinje ainda presentes, mesmo aquelas que mostravam alterações evidentes de sua estrutura.

No tratamento estatístico dos resultados, calculamos os limites de normalidade para o número de neurônios contados em cada grupo observado, usando uma estimativa do desvio padrão das médias dos neurônios dos camundongos normais, baseada no cálculo da variância entre os camundongos, obtida mediante análise de variância.

Verificamos, assim, que o limite inferior do intervalo da normalidade é de 14,4 neurônios por campo de 400×.

As médias neuronais obtidas na observação do grupo patológico constam da tabela 3, onde podemos verificar que, dos 14 animais parasitados, apenas dois não mostraram diminuição da média de neurônios por campo contado, e que os 12 restantes apresentaram redução, que variou de 8,8 a 11,6, correspondendo dessa maneira a 85,7% de alterações. A tabela 4 mostra os números totais das contagens individuais e as médias neuronais correspondentes a cada animal normal. A comparação das tabelas 3 e 4 demonstra que a análise estatística dos resultados nos autoriza a afirmar que, durante a fase aguda da moléstia de Chagas experimental no camundongo, há redução significativa do número de células de Purkinje.

<i>Animal</i>	<i>Total</i>	<i>Média</i>	<i>Animal</i>	<i>Total</i>	<i>Média</i>
CP1	2.658	10,3	CP8	1.933	9,7
CP2	1.751	8,8	CP9	1.695	8,5
CP3	1.851	9,3	CP10	1.825	9,1
CP4	2.912	14,6	CP11	2.886	14,4
CP5	2.315	11,6	CP12	2.086	10,4
CP6	2.138	10,7	CP13	1.863	9,3
CP7	1.859	9,3	CP14	1.776	8,9

Tabela 3 — Número total e número médio de neurônios contados por campo em 14 animais parasitados.

<i>Animal</i>	<i>Total</i>	<i>Média</i>	<i>Animal</i>	<i>Total</i>	<i>Média</i>
CN1	3.297	16,4	CN6	3.120	15,6
CN2	3.390	16,9	CN7	3.118	16,5
CN3	3.207	16,0	CN8	2.999	14,9
CN4	3.345	16,7	CN9	3.126	15,6
CN5	3.117	15,5	CN10	3.051	15,2

Tabela 4 — Número total e número médio de neurônios contados por campo em 10 animais normais.

RESULTADOS

Nossos resultados demonstram que as alterações quantitativas das células de Purkinje, durante a fase aguda da moléstia de Chagas experimental no camundongo, são bastante evidentes. Dos 14 animais que morreram ou foram sacrificados entre o 7^o e 9^o dias após a inoculação, 12 (ou seja 85,7%) mostraram diminuição do número de neurônios, compreendida entre os limites de 1.695 e 2.315 cé-

lulas, com médias de 8,5 a 11,6 neurônios por campo, os dois animais restantes mostraram valores que correspondem ao limite inferior do intervalo de normalidade, isto é, de 2.886 e 2.912 neurônios, com médias de 14,4 e 14,6.

No grupo normal as variações foram de 2.999 a 3.390 células, com médias de 14,9 a 16,9. A média dos valores obtidos para os 12 animais do grupo patológico com alterações quantitativas significantes foi de 1.962 neurônios, ao passo que no grupo controle esta média foi de 3.177. A comparação destes dois valores revela que houve uma redução de 38,3% dos neurônios no grupo patológico, resultado que é concordante com trabalhos sobre redução quantitativa neuronal, realizados por Alcântara, Köberle, Brandão, Schwartzburd e Köberle, Penha e G. Köberle.

As alterações quantitativas no grupo patológico não foram, porém, constantes em todos os campos examinados. Um dos animais (CP 10) apresentou diminuição dos neurônios em todos os campos, ao passo que 11 animais (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13 e 14) sofreram essa diminuição na maior parte dos campos examinados, porém, com áreas de população neuronal aparentemente normal.

	Valores inferiores ao intervalo de normalidade		Valores iguais ao intervalo de normalidade		Valores superiores ao intervalo de normalidade	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Grupo normal	644	32,0	855	43,0	501	25,0
Grupo patológico	2423	85,1	164	5,9	113	4,0
Grupo patológico exceto CP4 e CP11	2224	92,7	144	6,0	31	1,3
Animais CP4 e CP11	199	49,7	120	30,0	82	20,3

Tabela 5 — *Frequência dos valores encontrados nas contagens, em relação ao intervalo de normalidade*

Assim, analisando-se a frequência dos valores encontrados nas contagens e considerando-se o intervalo de normalidade, os valores inferiores e superiores a este intervalo constam da tabela 5.

Nesta última, observamos que no grupo patológico os campos com redução de neurônios corresponderam a 85,1% do total; os campos com valores incidindo dentro dos limites do intervalo de normalidade corresponderam a 5,9% do total e que os campos com valores mais elevados que o limite superior do intervalo de normalidade corresponderam a 4%.

COMENTARIOS

A diminuição de neurônios por campo, em cada animal, não foi constante, excetuados CP4 e CP11, nos quais essa redução se verificou na maioria dos campos examinados. Contudo, alguns dos campos estudados apresentavam valores normais. Isto nos permite deduzir que as alterações das células de Purkinje não ocorrem com a mesma intensidade em todo o córtex cerebelar.

Observamos, durante as contagens, a presença de pseudocistos e de leishmânias esparsas no córtex cerebelar em alguns animais. As regiões adja-

centes a estas zonas mostraram alterações morfológicas celulares pronunciadas. Tal fato já foi assinalado por Köberle em 1959 e está documentado nas figuras que se seguem ao texto.

Os animais CP4 e CP11 não evidenciaram alterações significativas. Os valores encontrados são semelhantes àqueles obtidos para o grupo controle. Este achado não parece constituir fato excepcional, pois o próprio Chagas⁵, em 1916, achava razoável "admitir que a substância nervosa não constitui de modo constante, ou pelo menos com a constância do miocárdio, sede de multiplicação do tripanosoma".

Como foi dito anteriormente, incluímos nas contagens tôda e qualquer célula de Purkinje que conseguimos identificar em cada campo independentemente do grau de alterações que apresentasse. As alterações morfológicas celulares que observamos nos animais patológicos foram de tal modo intensas que nos parece licito admitir que, se houvesse sobrevivência à fase aguda, um estudo histopatológico posterior provavelmente deveria mostrar muito maiores destruições neuronais que as encontradas.

O mecanismo intrínseco desta destruição é ainda desconhecido. Chagas⁵, em 1916, já suspeitava da presença de uma substância tóxica para a célula nervosa; Torres¹², em 1941, dizia que o "processo inflamatório na doença de Chagas é, pois, a consequência de uma ação induzida à distância pelo *S. cruzi* por meio de uma hipotética toxina esquizotripânica". Alvarenga², em 1959, estudando camundongos infectados experimentalmente, aventou a hipótese da existência de uma toxina liberada ao nível dos tecidos parasitados, e "capaz de lesar qualquer tipo de tecido".

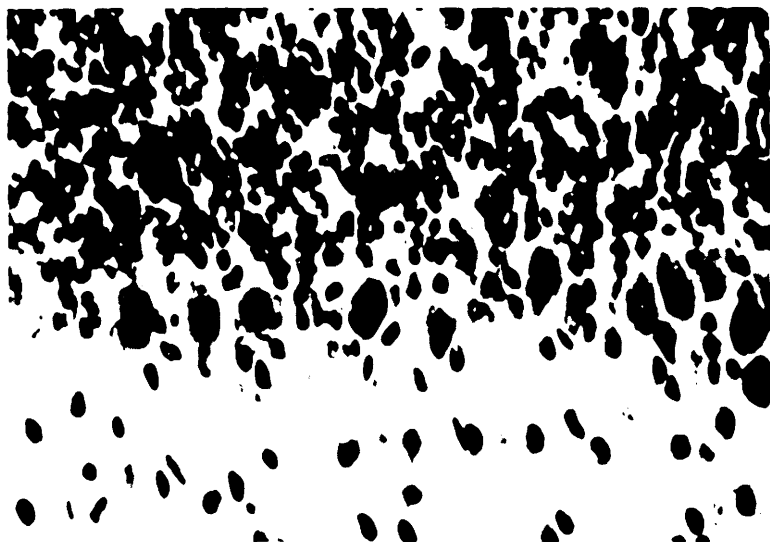


Fig. 1 — Aspecto das células de Purkinje em camundongo normal. Animal CN1. (Hematoxilina-eosina, 1600×).

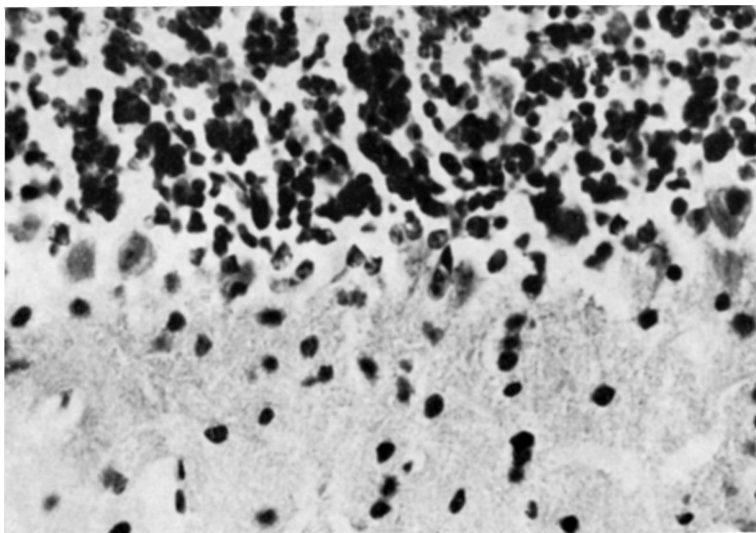


Fig. 2 — Intensa destruição das células de Purkinje em camundongo chagásico. Animal CP13. (Hematoxilina-eosina, 1600×).

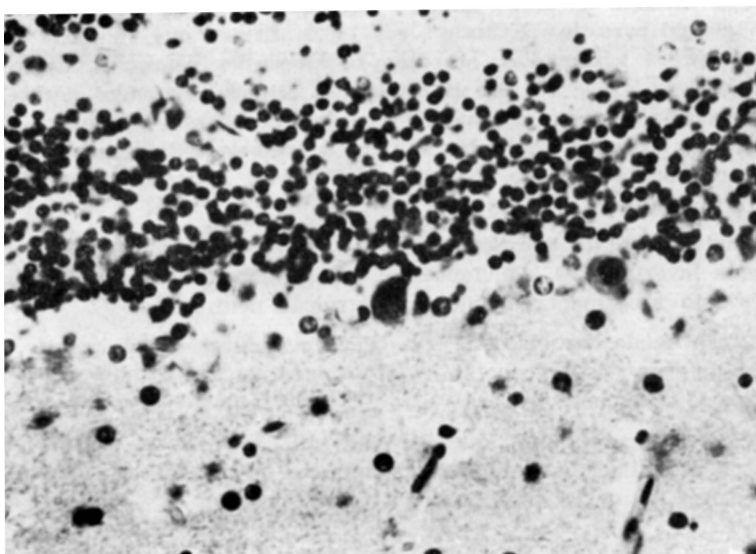


Fig. 3 — Aspecto do córtex cerebelar em camundongo chagásico, mostrando a destruição intensa das células de Purkinje. Animal CP2. (Hematoxilina-eosina, 1600×).

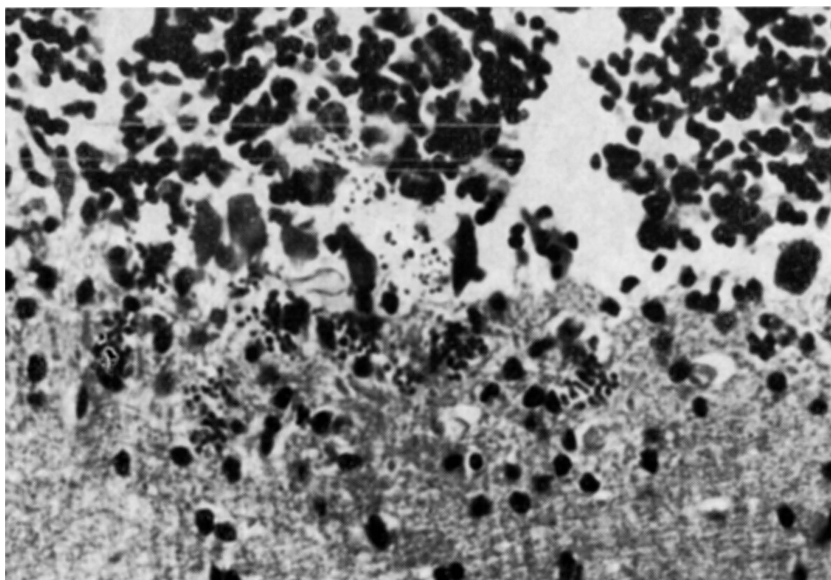


Fig. 4 — Ninhos de leishmânia no córtex cerebelar. Animal CP9. (Hematoxilina-eosina, 1600X).

Köberle e Alcântara⁹, em 1960, sugeriram que a destruição das células se dá à custa de uma "toxina", liberada por destruição de formas em leishmânia do parasito. Köberle⁸, em 1962, afirmou que "à medida que se desintegram as leishmânias, observam-se alterações neuronais, desde lesões nucleocitoplasmáticas, até lise completa das células. Baseados nestas observações, somos forçados a concluir que, na ocasião da desintegração das leishmânias, ocorre a liberação de uma substância extremamente deletéria para o neurônio. Segundo a nossa opinião deve tratar-se de uma endotoxina (neurotoxina)".

A natureza desta substância neurotóxica é, ainda, questão pendente de ulteriores investigações bioquímicas, e, na opinião de Köberle⁸, secundária, pois "o fato fundamental reside na destruição neuronal".

A fase aguda, no material estudado, teve duração máxima de 9 dias. Dos 14 animais desse grupo, 6 (43%) morreram no 7.º dia, 7 (50%) no 8.º dia e 1 (7%) no 9.º dia.

Não nos pareceu, pois, que houvesse relação entre a duração da fase aguda da moléstia e a diminuição do número de neurônios, cuja explicação talvez esteja na curta duração desta fase.

CONCLUSÕES

1) Na fase aguda da moléstia de Chagas experimental no camundongo, há redução do número de células de Purkinje, estatisticamente significativa;

2) dos 14 animais estudados, 12 apresentaram diminuição neuronal; 3) as reduções neuronais na maior parte dos animais estudados se apresentaram alternadas com áreas de população neuronal aparentemente normal; 4) nas regiões onde haviam leishmânias no interior de pseudocistos ou esparsas nos tecidos, constatamos alterações morfológicas neuronais intensas; 5) não nos pareceu que houvesse relação entre a duração da fase aguda e a redução do número de neurônios.

RESUMO

O autor estudou quantitativamente as células de Purkinje em cortes semi-seriados do cerebelo de camundongos inoculados experimentalmente com *T. cruzi*, tendo verificado considerável destruição neuronal na fase aguda da enfermidade.

SUMMARY

Quantitative study of Purkinje cells in the acute phase of experimental Chagas' disease

A quantitative study of Purkinje cells was done through semi-serial sections of cerebellum of mice experimentally inoculated by *Trypanosoma cruzi*. A very marked neuronal destruction was found in the acute phase of Chagas' disease.

REFERÊNCIAS

1. ALCANTARA, F. G. — Sistema neurovegetativo do coração na moléstia de Chagas experimental. Tese de doutoramento, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1959.
2. ALVARENGA, R. J. — Histopatologia da fase aguda da moléstia de Chagas em camundongos. I Congresso Internacional sobre a Moléstia de Chagas, Rio de Janeiro, 1959.
3. BRANDÃO, H. J. S. — Estudo quantitativo de neurônios simpáticos e parasimpáticos na moléstia de Chagas experimental em ratos. Tese de doutoramento, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1961.
4. CHAGAS, C. — Les formes nerveuses d'une nouvelle Trypanosomiase. *Trypanosoma cruzi* inoculé par *Triatoma megista* (maladie de Chagas). *Nouv. Iconogr. Salpêtrière* 26(1):1-19, 1913.
5. CHAGAS, C. — Processos patogênicos da tripanosomiase americana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio* 8(2):5-36, 1916.
6. KÖBERLE, F. — El mal de Chagas. Enfermedad del sistema nervioso. *Rev. Med. Córdoba* 47(2):105-133, 1959.

7. KÖBERLE, F. — Estudos quantitativos da destruição neuronal na moléstia de Chagas. IV Reunião da Associação Latino-Americana de Ciências Fisiológicas, Ribeirão Preto, 1961.
8. KÖBERLE, F. — Patologia da moléstia de chagas. Medicina CARL, Ribeirão Preto 1(2):73-98, 1962.
9. KÖBERLE, F. & ALCANTARA, F. G. — Mecanismo da destruição neuronal do sistema nervoso periférico na moléstia de Chagas. Hospital 57(6):173-178, 1960.
10. PENHA, Fº, P. D. & KÖBERLE, G. — Megaesôfago chagásico. Estudo quantitativo do plexo de Auerbach. Rev. Goiana Med. 5:185-192, 1959.
11. SCHWARTZBURD, H. & KÖBERLE, F. — Chagas-Myelopathie. Zschr. f. Tropen-med. u. Parast. 10:309-314, 1959.
12. TORRES, C. M. — Sôbre a anatomia patológica da doença de Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 36(3):391-404, 1941.

Departamento de Neurologia — Faculdade de Medicina — Caixa Postal 301 — Ribeirão Preto, SP — Brasil.