

# **CONIC-SEMESP** 13º Congresso Nacional de Iniciação Científica

Anais do Conic-Semesp. Volume 1, 2013 - Faculdade Anhanguera de Campinas - Unidade 3. ISSN 2357-8904

**TÍTULO:** PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE COLORAÇÃO DE TECIDO CEREBRAL NA MALÁRIA EXPERIMENTAL OCASIONADA PELO P. BERGHEI

**CATEGORIA:** CONCLUÍDO

**ÁREA:** CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

**SUBÁREA:** FARMÁCIA

**INSTITUIÇÃO:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

**AUTOR(ES):** ALINE DA SILVA BARBOSA, LÂNGELA DOS SANTOS CARMO

**ORIENTADOR(ES):** MICHELLI ERICA SOUZA FERREIRA, SANDRO PERCÁRIO

Realização:



Apoio:



## 1. RESUMO

A malária é uma doença endêmica causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*, o qual é transmitido ao ser humano pela picada do mosquito do gênero *Anopheles* infectado. Essa é uma parasitose prevalente em regiões tropicais e subtropicais, com destaque para a causada pela espécie *P. falciparum* que promove elevada mortalidade em função do desenvolvimento de formas severas da doença como a malária cerebral. Esta é caracterizada pelas seguintes alterações fisiopatológicas, tais como: acúmulo de eritrócitos na rede capilar, produção de fatores pró-inflamatórios, impedimento do fluxo sanguíneo e ruptura da barreira hematoencefálica. Modelos experimentais em camundongos são utilizados para estudar a malária cerebral humana e suas alterações fisiopatológicas. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a permeabilidade da barreira hematoencefálica de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* através do método de coloração pelo Azul de Evans. Foram utilizados 50 camundongos *Swiss* divididos em dois grupos, o Grupo A, no qual os animais eram infectados pelo *P. berghei* e o Grupo B, constituído de animais não infectados. Cada grupo foi subdividido em cinco subgrupos, os quais foram submetidos à eutanásia em tempos determinados (24h, 5, 10, 15 ou 20 dias após a infecção). Após a eutanásia, os animais eram submetidos à avaliação da permeabilidade da barreira hematoencefálica em ambos os grupos e a contagem de parasitos por meio do esfregaço sanguíneo corado pelo Giemsa. Observou-se uma evolução progressiva na parasitemia com o tempo de infecção. Ocorreu impregnação do Azul de Evans no cérebro dos animais infectados após 10 dias da infecção, sendo nos dias seguintes menos intensas. Não se verificou correlação entre a permeabilidade da barreira hematoencefálica e a parasitemia. Paralelamente, o método proposto para avaliação da quebra da barreira hematoencefálica em camundongos infectados com *P. berghei* mostrou-se adequado.

**Palavras-chave:** Malária Cerebral, Barreira Hematoencefálica, Azul de Evans

## 2. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença endêmica, febril, transmitida pelo mosquito do gênero *Anopheles*, seu agente etiológico é o protozoário do gênero *Plasmodium*, que atinge aproximadamente 40% da população mundial e mais de 100 países,

ocasionando 350 a 500 milhões de casos e cerca de 1,1 milhões de óbitos ao ano, sendo que a maioria destes ocorre em crianças de até cinco anos de idade <sup>9,12,3</sup>. Desse gênero, são quatro as espécies de plasmódios que podem infectar o homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* e o *Plasmodium malarie*. O primeiro é responsável pela febre terçã maligna, o segundo e o terceiro pela terçã benigna e o último pela quartã cosmopolita <sup>4</sup>.

A maioria dos óbitos da malária é devido à malária cerebral, induzida por infecção com *Plasmodium falciparum*. O mecanismo exato responsável por esta neuro-patologia ainda não foi compreendido. Citoaderência de glóbulos vermelhos parasitados às células endoteliais da microvasculatura cerebral de pessoas infectadas com *P. falciparum* tem sido implicado como o principal processo responsável pelo desenvolvimento de malária cerebral em humanos <sup>2,7,11</sup>.

Com a finalidade de esclarecer o mecanismo de ação do parasita e promover um melhor tratamento da doença, pesquisadores vêm desenvolvendo estudos experimentais. No que diz respeito à forma grave e complicada da doença, têm sido utilizado os camundongos infectados pelo *P. berghei* ANKA, uma vez que os animais infectados desenvolvem sintomas semelhantes aos apresentados em humanos com malária por *P. falciparum*, frequentemente responsável pelos casos graves da doença como a malária cerebral. Assim como na doença humana, neste modelo experimental também se observa o sequestro de macrófagos, monócitos e células sanguíneas parasitadas <sup>5,6,10</sup>.

Estudos realizados por Baptista (2010) utilizando corante Azul de Evans 2% para avaliar a barreira hematoencefálica de camundongos infectados pelo *P. berghei* ANKA tratados com o antimalárico pirimetamina, identificaram o melhoramento da permeabilidade da barreira hematoencefálica nos animais com 6-7 de infecção, comparados com os animais controles não infectados, não havendo extravasamento do corante nos animais tratados com o antimalárico pirimetamina.

Morrel *et al.* (2011) utilizando modelo experimental semelhante e corante observaram que após cinco dias de infecção ocorreu elevado extravasamento do corante e que quando os camundongos infectados eram tratados com IFN- $\beta$  houve redução do extravasamento. Em modelo similar se observou que o tratamento com o ligante F1t3, importante citocina de diferenciação e homeostasia das células dendríticas, impediu a permeabilidade da barreira hematoencefálica <sup>10</sup>.

O modelo experimental utilizando camundongos infectados por *P. berghei* é um importante modelo para se estudar e conhecer melhor a malária humana, principalmente no que diz respeito à forma grave da doença, a cerebral, que pode levar a morte. Nessa forma clínica tem sido observado o sequestro de eritrócitos na rede capilar, produção de fatores pró-inflamatórios, impedimento do fluxo sanguíneo e ruptura da barreira hematoencefálica. Nesse sentido, implementar métodos de análise, como o de coloração do tecido cerebral pelo Azul de Evans, se torna importante, a medida que esta ferramenta pode contribuir com o entendimento de tal patologia e fornecer informações pertinentes quando comparados com outros marcadores e parâmetros envolvidos na doença em questão.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar a permeabilidade da barreira hematoencefálica de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* através do método de coloração pelo Azul de Evans.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Determinar a parasitemia dos camundongos infectados;
- Avaliar a difusão do corante no tecido cerebral de camundongos infectados pelo *P. berghei*;
- Comparar a parasitemia cerebral com a permeabilidade da barreira hematoencefálica.

### **4. METODOLOGIA**

#### **4.1. Animais**

Foram utilizados 50 camundongos Swiss, adultos jovens, procedentes do Biotério do Instituto Evandro Chagas (IEC) - Belém/PA, mantidos em gaiolas individuais à temperatura ambiente ( $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ) com ciclo claro/escuro de 12 horas, tratados com alimentação e água *ad libitum*. Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos, como segue:

Grupo A: No qual os animais foram inoculados com o *P. berghei*. Os animais do Grupo A foram subdivididos em 5 grupos (I-V) com n=5 cada: Grupo I foram

submetidos à eutanásia após 24h da infecção; Os animais do Grupo II foram submetidos à eutanásia após 5 dias da infecção; Os animais do Grupo III foram submetidos à eutanásia após 10 dias da infecção; Os animais do Grupo IV foram submetidos à eutanásia após 15 dias da infecção; Os animais do Grupo V foram submetidos à eutanásia após 20 dias da infecção;

Grupos B: Correspondem aos animais controles negativos (sham), os quais foram submetidos à mesma ambientação e procedimentos técnicos realizados no grupo A, com exceção da inoculação pelo protozoário. Esse grupo foi subdividido em 5 grupos (VI-X) com n=5 cada, submetidos à eutanásia nos mesmos tempos dos animais dos sub-grupos A.

O projeto foi aprovado no Comitê de Ética na Pesquisa com Animais de Experimentação – CEPAE/UFPA e obteve o seguinte número de aprovação nº125-13.

#### **4.2. Indução da malária nos animais**

Foi utilizada a cepa de *Plasmodium berghei* originalmente fornecida pelo Instituto Evandro Chagas - IEC/Belém/Pará. Foi realizada a injeção intraperitoneal de  $10^6$  hemácias infectadas pelo *P. berghei* ajustada a essa concentração em meio RPMI contendo albumina do soro bovino.

#### **4.3. Avaliação da Permeabilidade da Barreira Hematocerebral**

A permeabilidade da barreira hematocerebral foi avaliada de acordo com procedimentos técnicos descritos por Herbas et al. (2010), em 5 camundongos de cada grupo A (I-V) e B (VI-X), através do qual podemos visualizar a impregnação do corante azul de Evan (2%) no tecido. Esse foi preparado em solução salina e inoculado (200µL) na veia lateral da cauda 1h antes da injeção do anestésico. Como o corante se liga a proteína albumina que é plasmática, durante o extravasamento sanguíneo dos vasos se a barreira endotelial não estiver preservada o complexo corante-proteína migra para o tecido, corando o mesmo em azul e tornando-o visível ao olho nu.

#### 4.4. Contagem de Parasitos no Sangue

A contagem do parasito foi realizada por meio do esfregaço sanguíneo corado pelo Giemsa. Procedimento iniciado pela preparação do esfregaço de gota espessa, que deve ser seco em temperatura ambiente, em seguida fixado com álcool metílico por 5min, posteriormente corado com o Giemsa a 5% e deixar secar na posição vertical por 10min, terminado esse período lava-se o mesmo em água corrente. A visualização do parasito intercorreu em microscópio óptico (100X), através do qual se realiza a contagem de hemácias parasitadas em comparação as hemácias totais, em dez campos consecutivos.

### 5. DESENVOLVIMENTO

O grupo A de camundongos foi analisado após 24h, 5, 10, 15 e 20 dias após a injeção de  $10^6$  hemácias infectadas pelo *P. berghei*. De forma semelhante foi feita a análise do grupo B após a inoculação do meio de preparação do parasita na referida concentração.

Chegado os dias de eutanásia foi realizada inicialmente a pesagem dos camundongos para os cálculos de volume de injeção da solução do azul de evans 2%, seguida da preparação do esfregaço sanguíneo e coloração com o GIEMSA para posterior leitura da lâmina no microscópio.

Posteriormente os camundongos foram anestesiados e efetuou-se a injeção da solução de azul de evans a 2% na veia lateral da cauda, passado 1h da injeção do corante o camundongo foi novamente anestesiado e em seguida submetido toracotomia e exsanguinação cardíaca, para a posterior dissecação do cérebro e observação a olho nu e fotografia do órgão.

### 6. RESULTADOS

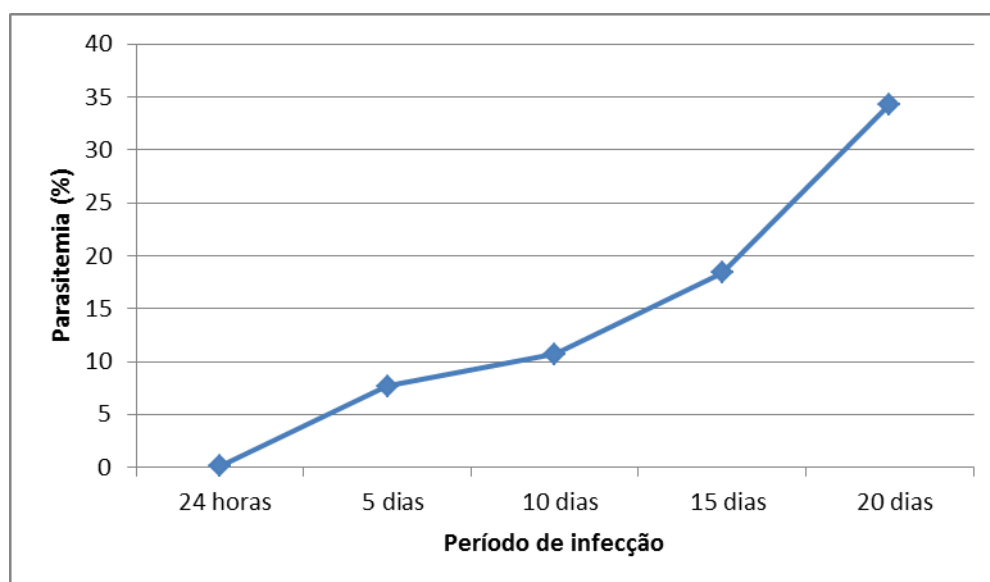
#### 6.1. Parasitemia

Os animais infectados apresentaram uma parasitemia progressivamente crescente (tabela 1 e figura 1) de acordo com o aumento do período de infecção, resultado semelhante encontrado por Herbas et al. (2010), em que se utilizou o mesmo valor de inoculação intraperitoneal de hemácias infectadas em camundongos C57BL/6J.

Tabela 1 – Parasitemia dos camundongos dos grupos infectados (Grupos I-V)

Animal	Parasitemia (%)				
	24h	5 dias	10 dias	15 dias	20 dias
1	0,0	10,4	13,5	14,3	17,4
2	0,1	11,2	8,0	17,6	44,0
3	0,2	0,0	16,0	16,6	41,6
4	0,1	4,4	5,5	NSAD	NSAD
5	0,1	4,6	0,0	25,0	NSAD
X±SD	0,1±0,07	6,1±4,7	8,6±6,3	18,4±4,6	34,3±14,7

X= Média; SD= desvio padrão; NSAD= Não sobreviveu até o dia. Grupo I = animais infectados pelo *Plasmodium berghei* e submetidos à eutanásia 24h após a infecção; Grupo II = idem após 5 dias; Grupo III = idem após 10 dias; Grupo IV = idem após 15 dias; Grupo V = idem após 20 dias.

Figura 1- Progressão da parasitemia nos camundongos infectados com *P. berghei*

## 6.2. Avaliação da Permeabilidade da Barreira Hematocerebral nos Camundongos

A avaliação da quebra da barreira hematocerebral foi realizada através da injeção do corante Azul de Evans nos camundongos de ambos os grupos A e B, respectivamente inoculado pelo *P. berghei* e sem inoculação do parasito, em seus respectivos períodos de eutanásia, 24 horas, 5, 10, 15 e 20 dias. Observou-se a olho nu após a injeção que ambos os grupos apresentaram a coloração azul distribuída no corpo do animal, sendo bem evidente nas patas e na região oral (figura 2).



Figura 2: Patas e região oral de camundongo após injeção do corante Azul de Evans 2%.

Após 1h de circulação do corante no camundongo observou-se que não houve impregnação no cérebro após 24h e 5 dias de infecção, enquanto que após 10 dias o órgão se encontrava impregnado pelo corante, sugerindo a quebra da barreira hematoencefálica, característica que fica menos intensa no 15º e 20º dias (figura 3).

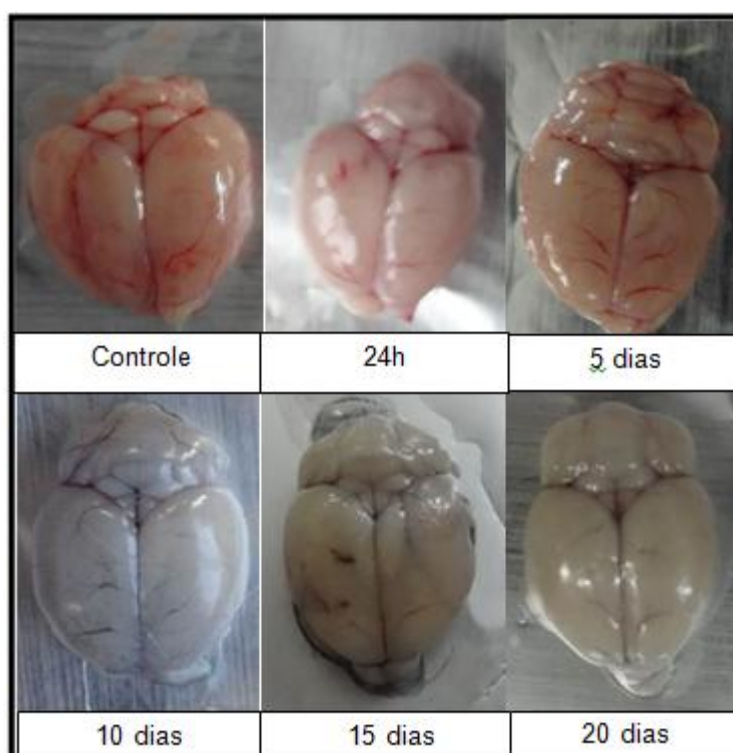


Figura 3: Cérebros dos camundongos após infecção pelo *Plasmodium berghei* (24 h, 5 dias, 10 dias, 15 dias e 20 dias) e após injeção do corante Azul de Evans.



Estes dados são semelhantes aos encontrados por Herbas *et al.* (2010), os quais visualizaram a quebra da barreira hematoencefálica no sétimo dia após infecção de camundongos C57BL/6J. Também Morrel *et al.* (2011) e Tamura *et al.* (2011), utilizando mesmo tipo de roedores, constatou a quebra da barreira no sexto dia pós-infecção.

### **6.3. Correlação entre Parasitemia e Quebra da Barreira Hematoencefálica**

A partir da análise da parasitemia e de identificação da impregnação do Azul de Evans no cérebro observou-se que o extravasamento não ocorreu de forma crescente como a parasitemia. O cérebro se tornava mais impregnado pelo corante quando o camundongo estava com a parasitemia média de 8,6% no 10º dia após infecção. No 15º e 20º dias identificou-se parasitemia média de 18,4% e 34,3%, respectivamente, e impregnação menos intensa em ambos os grupos.

Uma possível explicação para a mudança de padrão após o 10º dia reside na sugestão que as alterações cerebrais decorrentes da quebra da barreira cerebral e da infecção promoveriam a redução do fluxo sanguíneo cerebral e, desta forma, ocasionariam menor impregnação de corante. Entretanto, esta sugestão precisa ser mais bem investigada através de estudos histológicos do tecido cerebral nas condições deste experimento.

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Após a verificação da parasitemia, a qual foi crescente com o aumento do período de infecção e análise do cérebro quanto a quebra da barreira hematoencefálica no modelo experimental proposto de visualização a olho nu da impregnação do tecido cerebral pelo Azul de Evans, conclui-se que a parasitemia aumenta progressivamente com o tempo de infecção; que a quebra da barreira hematoencefálica se torna evidente após o décimo dia de infecção, porém não está diretamente relacionada com a parasitemia, possivelmente devido a diminuição do fluxo sanguíneo cerebral que cursa com a evolução da malária cerebral nos animais.

## 8. FONTES CONSULTADAS

1. BAPTISTA, F.G; PAMPLONA, A; PENA A. C; MOTA, M. M; PIED, S; VIGÁRIO M. Accumulation of Plasmodium berghei-Infected Red Blood Cells in the Brain Is Crucial for the Development of Cerebral Malaria in Mice. **Infection and immunity**, v. 78, n. 9, p. 4033–4039, 2010.
2. BERENDT, A. R; TUMER G. D; NEWBOLD C. I. Cerebral malaria: the sequestration hypothesis. **Parasitology Today** 10:412–414, 1994.
3. CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. About malaria, 2010a. Disponível em: <http://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html>. Acesso em: 27 de março de 2012.
4. CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. About malaria, 2010b. Disponível em: <http://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html>. Acesso em: 29 de março de 2012.
5. HERBAS, M. S; OKAZAKI, M.; TERAOKA, E.; XUAN, X.; ARAI, H.; SUZUKI, H.  $\alpha$ -Tocopherol transfer protein inhibition is effective in the prevention of cerebral malaria in mice. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.91, p.200–207, 2010.
6. HERMSEN, C. C.; MOMMERS, E.; VAN DE WIEL, T.; R. W. SAUERWEIN; ELING, W. M. C. Convulsions Due to Increased Permeability of the Blood-Brain Barrier in Experimental Cerebral Malaria Can Be Prevented by Splenectomy or Anti-T Cell Treatment. **The Journal of Infectious Diseases**, v.178, p.1225–1227, 1998.
7. MACPHERSON, G. G; WARRELL, M. J; WHITE, N. J; LOOAREESUWAN, S; WARRELL, D. A. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. **American Journal of Pathology**. 119:385–401, 1985.
8. MORRELL, C. N.; SRIVASTAVA, K.; SWAIM, A.; LEE, M. T.; CHEN, J.; NAGINENI, C.; HOOKS, J. J.; DETRICK, B. Beta Interferon Suppresses the Development of Experimental Cerebral Malaria. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 4 p. 1750–1758, 2011.
9. SARAIVA, M. G. G.; AMORIM, R. D. S.; MOURA, M. A. S.; MARTINEZ-ESPINOSA, F. E.; BARBOSA, M. G. V. Expansão Urbana e Distribuição Espacial da

Malária no Município de Manaus, Estado do Amazona. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 515-522, 2009. 12

10. TAMURA, T., KIMURA, K., YUDA, M., YUI, K. Prevention of Experimental Cerebral Malaria by Flt3 Ligand during Infection with Plasmodium berghei ANKA. **Journal Infection and Immunity**, v. 79, n. 10, p. 3947-3956, 2011.

11. TAYLOR, T. E; FU, W. J; CARR, R. A; WHITTEN R. O; MUELLER, J. S; FOSIKO, N. G; LEWALLEN, S; LIOMBA, N. G; MOLYNEUX, M. E. Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. **Natural Medicine** 10:143–145. 2004

12. WORLD HEALTH ORGANIZATION – **Malaria Case Management: Operations manual**. SWITZERLAND, 2009.