

## **CORRELACIONES PATOGENICAS ENTRE LA ENCEFALITIS CHAGASICA EXPERIMENTAL Y LA HUMANA**

Dr. Armando Domínguez, C.

En 1911, publicó Carlos Chagas su trabajo "*Nova entidade mórbida do homen. Rezumo geral do estudos etiológicos e clínicos*", y dedicó un capítulo a la "Forma nerviosa" describiendo una gran variedad de síndromes clínicos neurológicos, entre los cuales asignaba gran importancia a los cuadros clínicos de diplejía cerebral donde predominaban los síntomas espásticos sobre los paralíticos. Como criterio para atribuirle a tales síndromes una etiología chagásica se basaba en la coincidencia en tales enfermos de otras manifestaciones clínicas atribuidas a la enfermedad de Chagas y a los resultados negativos de todas las investigaciones encaminadas a determinar otros factores etiológicos. Una primera autopsia practicada a un enfermo con schizotrypanosis; un niño muerto de una meningoencefalitis, suministró a sus observaciones clínicas. La principal característica anatómica de la localización del parásito en el sistema nervioso central eran focos múltiples dispersos en diversas zonas del encéfalo, en la corteza, en los núcleos centrales, en la protuberancia, bulbo, etc. Esta multiplicidad de localización explica las variantes clínicas del síndrome nervioso.

En el mismo año, Gaspar Vianna en su trabajo fundamental "*Contribuição para o estudo da anatomia patológica da Molestia de Carlos Chagas*" establece los fundamentos de la morfogénesis de la encefalitis chagásica.

A base de sus observaciones él concluye que el tripanosoma penetra en la célula donde se multiplica por partición binaria, distiende la membrana celular y finalmente la rompe a consecuencia de lo cual se produce una fuerte reacción en donde raramente las células nerviosas perecen. El afirma que las células invadidas por el parásito pertenecen a la neuroglia, pero cree que sus investigaciones hasta entonces no le permiten afirmar esto de manera absoluta; asevera no haber ninguna célula ganglionar o leucocitos parasitados. Concluye que en la enfermedad de Chagas existe una meningoencefalomielitis.

Con estas investigaciones iniciales de Carlos Chagas y Gaspar Viana se inicia el capítulo de la historia natural de la encefalitis chagásica, el cual ha venido evolucionando con el aporte de numerosos investigadores. Entre éstos son dignos de mención los trabajos experimentales de Magarinos Torres, Torres y Villaça, Torres y Villela, quienes demuestran que en la fase aguda de la infección chagásica está comprometido el sistema nervioso central, produciéndose disturbios nerviosos como parálisis del tren posterior.

La mayoría de los autores que se han ocupado del problema de la encefalitis chagásica están de acuerdo en que existe una correlación en lo referente a la morfogénesis del proceso en el hombre y en los animales de experimentación (Crowell, Torres y Villela, Alencar, Elejalde, Nador, etc.) Para ellos las alteraciones histológicas consisten principalmente en acúmulos celulares situados en las proximidades de los vasos sanguíneos; formados en su mayor parte por elementos microgliales movilizados viéndose ocasionalmente parásitos en el interior de estos pequeños granulomas o parasitando células de estirpe macroglial. Johnson encuentra en muchos de estos nódulos necrosis centrales.

En 1962, describimos en material humano una forma anatómica, la cual se caracterizaba por el predominio cortical de las lesiones; por su carácter necrotizante con presencia o no de calcificaciones, la cual designamos forma necrotizante cortical y expresamos la opinión de que el mecanismo patogenético estaba íntimamente ligado a la colonización masiva de los astrocitos corticales por los parásitos, los cuales se necrosaban, y a esto se sumaba la necrosis de las células parenquimatosas comprendidas en la zona de influencia del proceso patológico. Hacíamos resaltar el hecho de la tendencia a la necrosis de la célula parasitada y le restábamos importancia al factor mecánico que conducía a la ruptura simple de dicha célula. Nos faltaba explicar por cuál mecanismo se producía dicha necrosis. Nuestro objetivo, por consiguiente, es tratar de reproducir en estudios experimentales las alteraciones necróticas observadas en las células parasitadas y tratar de esclarecer su mecanismo patogenético y de este modo discutir las correlaciones patogenéticas entre la encefalitis humana chagásica y la encefalitis chagásica experimental, así como también investigar el comportamiento de diversas cepas en cuanto a su capacidad de provocar agresión al sistema nervioso central.

### Material y métodos

Las cepas de *S. cruzi* utilizadas son de procedencia humana y han sido aisladas en el Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela, mediante hemocultivos de material humano y se denominan así:

1. Cepa "Bertoldo" obtenida de un italiano adulto recién llegado al país, quien desarrolló una miocarditis subaguda de evolución grave.

2. Cepa "MA" de paciente también adulto, venezolano, con larga permanencia en un área endémica de enfermedad de Chagas, sin manifestaciones clínicas ni electrocardiográficas de daño miocárdico durante un periodo de observación de cuatro años. Ambas cepas se estabilizan en su infectividad y virulencia en ratones altamente homocigotos.

Hemos utilizado en nuestra experiencia un total de 286 ratones altamente homocigotos de las razas CFW y C<sup>3</sup>H. El material de inoculación empleado ha sido siempre sangre de ratón tomada en el momento de máxima parasitemia mezclada al 1 por ciento con solución salina isotónica citratada al 3.8 por ciento usando la vía intraperitoneal, subcutánea-abdominal e intracerebral. La cantidad de parásitos inoculados varían entre 500 a 1 000 000 de tripanosomas por cada ratón de 20 a 25 gramos de peso.

Los animales inoculados fueron examinados en periodos de 8 días según el siguiente procedimiento.

1. Autopsia del cráneo, con extracción del encéfalo inmediatamente después de sacrificado el animal.

2. Sección en dos del encéfalo por un corte verticotransversal o por un corte horizontal anteroposterior.

3. La mitad del encéfalo se fija en formol al 10 por ciento y se incluye en parafina, la otra mitad se congela a  $-70^{\circ}$  en cabeza de congelación de anhídrido carbónico y se cortan en el Criostato a  $-20^{\circ}$  para estudio histoquímico. El material restante destinado para los cortes de Criostato se fija en formol-bromuro para estudios de glía.

El material incluido en parafina fue estudiado por los siguientes métodos de coloración: Hematoxilina-eosina, tricrómico de Gallegos, cresil-violeta, impregnación de plata según Bodian.

El material fijado en formol-bromuro fue cortado en el microtomo de congelación e impregnado por el método del oro sublimado de Cajal, para astrocitos.

En los cortes de Criostato se investigó la actividad de las fosfatasa ácidas según los métodos de plomo de Gomori y el método de L. S. Kaplow y M. S. Bustone con naftole AS-TR fosfato como sustrato y la técnica Nachlas, Crawford y Seligman para Leucina-aminopeptidasa (S. W. Thompson).

## Resultados

Con la vía de inoculación subcutánea o intraperitoneal se logró la localización del parásito en el sistema nervioso central en un 5 por ciento de los animales utilizados, siendo el parasitismo de grado variable y no permitiendo establecer con precisión de una manera dinámica la evolución patogenética del proceso encefalítico, presentándose ade-

más dificultades para los estudios histoquímicos. Con la vía de inoculación intracerebral se logró producir, con una gran regularidad, el cuadro morfológico de la encefalitis chagásica, tal cual lo habían observado otros investigadores utilizando otras vías, pero con la ventaja de poder seguir en una secuencia proyectada en el tiempo y el espacio la evolución del proceso patogenético. En estas condiciones se comprueban los hechos expuestos a continuación:

En las etapas tempranas del proceso, en las coloraciones de hematoxilina y eosina predomina la colonización del parásito en células diversas del sistema nervioso central. Se aprecian numerosos pseudoquistes, los cuales contienen número muy variable de parásitos. Las células parasitadas exhiben las características siguientes:

Células de estirpe glial, provistas de núcleos vesiculosos con gránulos de cromatina dispersos sin nucléolo evidente. En muchas células los granos de cromatina nuclear han desaparecido, evidenciándose la imagen de núcleos vacíos, con marcada hipercromasia de la membrana nuclear y festoneamiento de la misma. Otros núcleos son hipercromáticos y picnóticos. El cuerpo celular está por lo general balonado, y en el protoplasma se ven las formas leishmanoides del parásito; cada uno de éstos está rodeado de un halo claro. Cuando el número de parásitos es escaso, el protoplasma celular exhibe marcada eosinofilia. Ocasionalmente se observan en dichas células, con la coloración de hematoxilina y eosina, prolongaciones protoplasmáticas conteniendo parásitos. Por las características morfológicas se pueden clasificar dichas células como astrocitos, lo cual se comprueba por las impregnaciones del oro sublimado de Cajal. Con este procedimiento se ve que algunos astrocitos conteniendo aún parásitos, exhiben signos francos de necrosis y fluidificación, viéndose con precisión la fragmentación de las prolongaciones; los parásitos también se impregnan. En la vecindad de las células necróticas se aprecia proliferación microglial e histiocitaria, la cual invade el sitio de la célula necrótica, originando un nodulillo microglial-histiocitario; éste es poco compacto en su fase inicial, donde es posible observar aún restos del astrocito necrótico y algunos parásitos. En los nodulillos compactos de las fases avanzadas no se observan parásitos. En un mismo corte histológico es posible seguir la secuencia desde la fase inicial de pseudoquiste parasitario hasta la constitución del nodulillo compacto.

Ocasionalmente se ven grupos de dos o tres astrocitos necróticos conteniendo aún parásitos, rodeados por células microgliales e histiocitarias movilizadas; otras veces nodulillos microglial-histiocitarios en etapa evolutiva laxa con centro necrótico. En los cortes impregnados por el método de Bodian los cilindroejes están fragmentados o hinchados, con desaparición de muchos de ellos en las vecindades de los astrocitos necróticos, apreciándose aún grupos de parásitos. En la fase de nudillos compactos, los cilindroejes están amputados en la periferia del nodulillo, no viéndose restos de ellos en el seno del mismo.

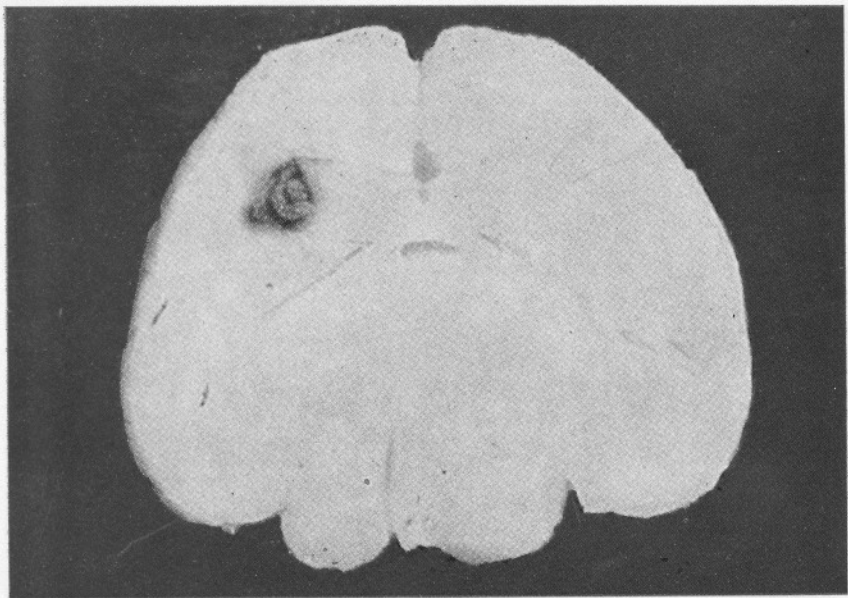


FIG. 1. Corte vértico-transversal de cerebro de ratón blanco cepa C. F. W. Se aprecia foco de inoculación intracerebral.

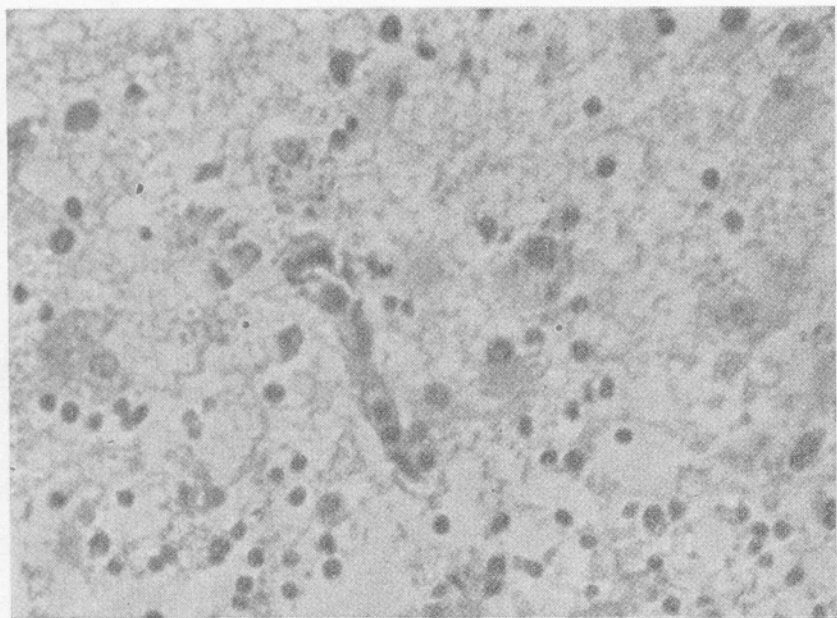


FIG. 2. Hematoxilina-eosina. Diversos estadios de la necrosis de los astrocitos parásitados. Tumefacción de los endotelios vasculares.

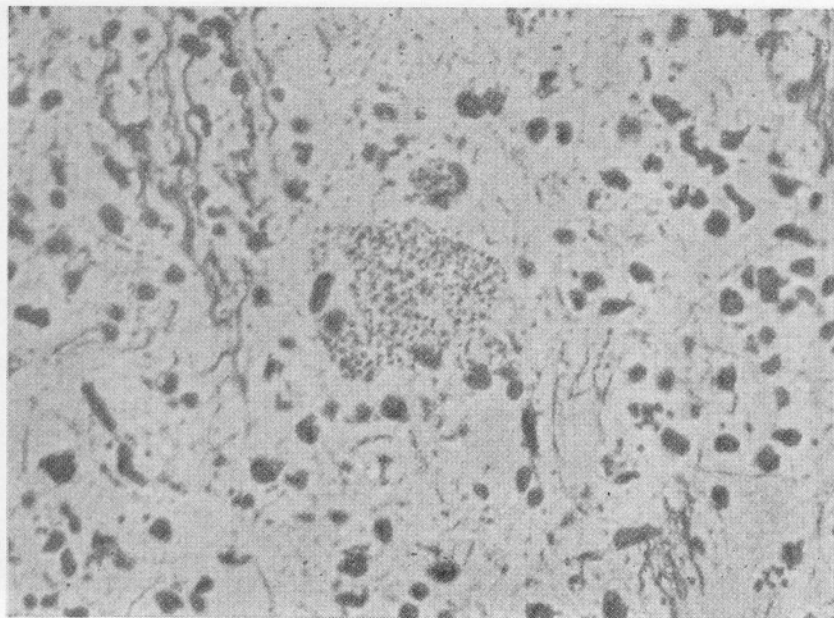


FIG. 3. Impregnación según Bodian. Nidos parasitarios. Intensa alteración de los cilindro-ejes de la sustancia blanca. Observar la extensión de la alteración en relación con los nidos de parásitos.

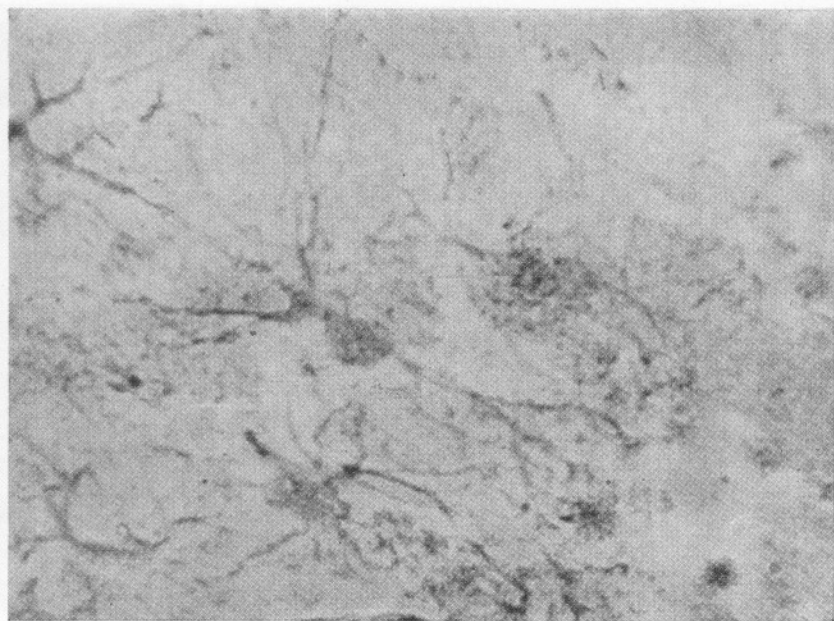


FIG. 4. Impregnación Oro-sublimado de Cajal. Astrocitos parasitados, hinchados, en vías de necrosis y desintegración.



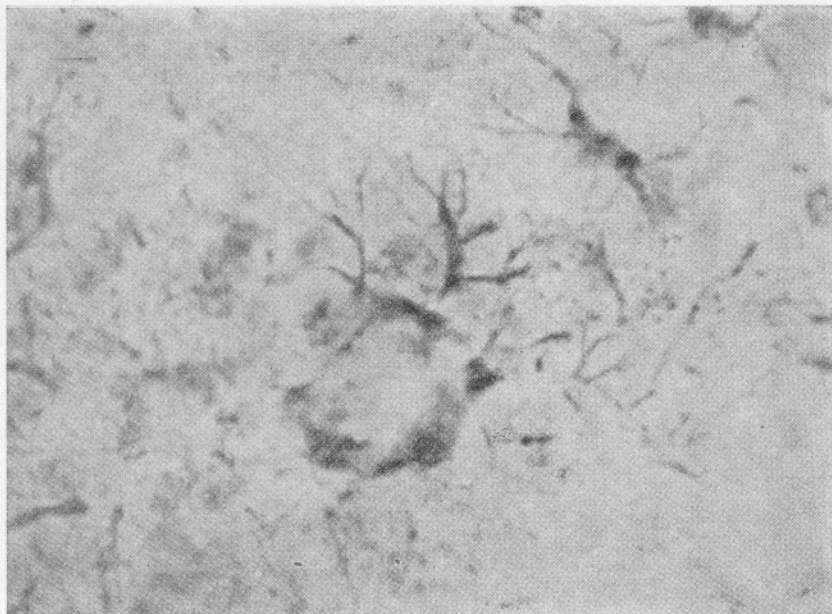


FIG. 5. Impregnación Oro-sublimado de Cajal. Astrocito hinchado, necrótico, con fragmentación de las prolongaciones.

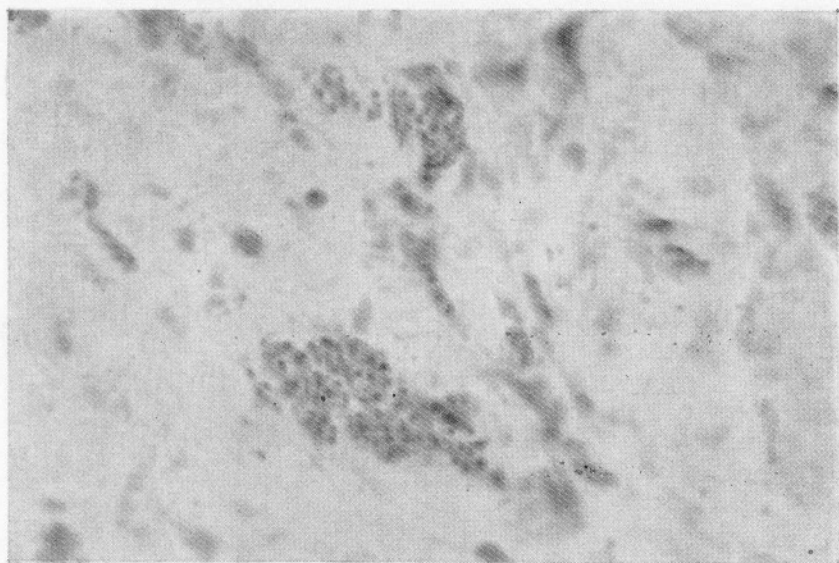


FIG. 6. Técnica para fosfatasa ácida según Gomori. Intensa actividad enzimática a nivel de los seudoquistes parasitarios.



FIG. 7. Técnica para fosfatasa ácida según Kaplow y Bustone. (Naftaol AS-TR fosfato). Actividad enzimática electiva en los pseudoquistes parasitarios.

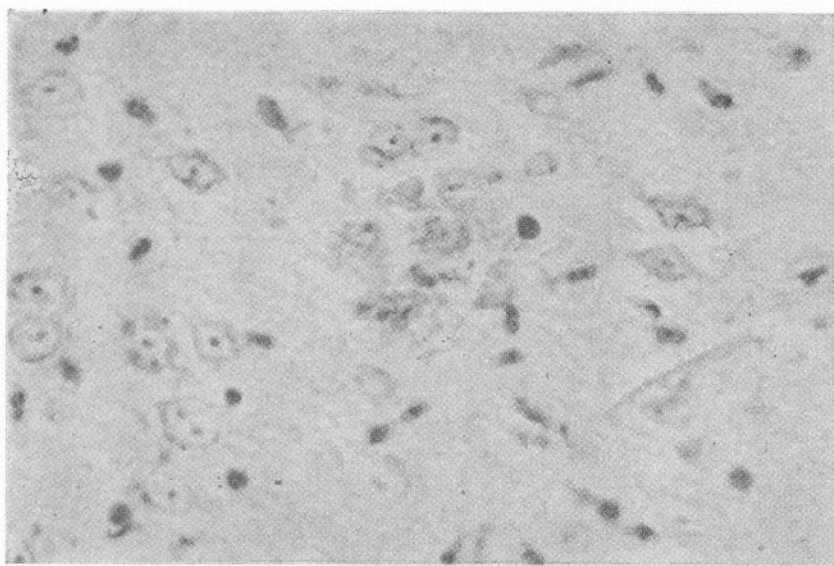


FIG. 8. Actividad de la leucina-amino-peptidasa según técnica de Nachlas, Grawford y Seligman.



Además de la macroglia existen células de la adventicia de los vasos que han sido colonizadas por el parásito y ocasionalmente células endoteliales parasitadas. La evolución del proceso en tales células es análoga a la observada en los astrocitos.

El aparato vascular encefálico participa en el proceso; esta participación se traduce en hinchazón de los endotelios vasculares e infiltrados perivasculares formados por linfocitos y algunas células histiocitarias. A nivel de las leptomeninges existen de manera constante infiltrados linfohistiocitarios difusos de grados variables de intensidad. En cuanto a la distribución de las lesiones, no parecen existir zonas de predilección. Las células parasitadas y los nodulillos resultantes de la evolución del proceso se encuentran diseminados sin ninguna sistematización en las diversas regiones del sistema nervioso central. Al lado de una célula recién parasitada se observan nodulillos en fase compacta. La relación con los vasos es también variable; a veces se observan nodulillos paravasculares resultantes de la colonización de una célula adventicial, otras perivasculares o paracapilares o alejados de los vasos.

En nuestro material no se observó colonización de las neuronas por el parásito. Las células ganglionares por lo general no exhiben alteraciones regresivas; aquellas situadas en las proximidades de los astrocitos necróticos muestran grados variables de cromólisis con alteraciones nucleares, a veces necrosis y fluidificación.

En algunos animales existían a nivel del encéfalo extensos focos de necrosis aislados. En el seno de la necrosis se observan parásitos libres y en sus bordes algunos pseudoquistes parasitarios. Ocasionalmente existen pequeñas calcificaciones en estos focos de necrosis.

Desde el punto de vista de la incidencia del parasitismo del sistema nervioso central en relación con la cepa utilizada no se apreciaron diferencias de significación cualesquiera que fuese la vía de inoculación.

Con las técnicas usadas, la actividad de la fosfatasa ácida está fuertemente presente a nivel de los pseudoquistes parasitarios. La actividad de la leucinaaminopeptidasa en menor grado. La fosfatasa ácida fue positiva pero en menor grado en las células nerviosas y algunos astrocitos aislados en los plexos coroideos. La actividad de la aminopeptidasa es débil a nivel de los plexos coroideos.

En las neuronas y la neuroglia no se apreció actividad aminopeptidásica.

### Comentarios

Al revisar la literatura referente al cuadro histopatológico de la encefalitis chagásica, llama la atención el que la mayoría de los autores hacen referencia especialmente a la forma anatómica nodular diseminada, algunos autores (Johnson, Noetzel y Cola) describen algunos nodulillos con centro necrótico. Ninguno de los autores explica el me-

canismo patogenético ni la evolución de las lesiones provocadas por el parásito. Sólo Gaspar Vianna describe que los pseudoquistes son invadidos por células migratorias originándose grandes focos inflamatorios, menciona que en los focos frescos se encuentran los parásitos mientras que en los focos antiguos desaparecen y opina que el proceso se origina por acción directa del parásito.

Según la descripción de Vianna, se puede colegir la existencia de un proceso de macrofagia de la célula parasitaria y que dicha célula necesariamente debe haber sufrido fenómenos regresivos graves que la conducen a la necrosis. El foco de necrosis observado por los autores citados anteriormente, corresponde por consiguiente a la célula parasitada necrótica; esta necrosis no queda limitada a la célula en sí, sino que se extiende un poco más de los límites celulares.

Ya hemos mencionado en la introducción, la importancia que atribuimos nosotros a estos fenómenos necróticos, en la patogenia de las lesiones observadas en la encefalitis chagásica.

En nuestras observaciones en material humano y experimental ella nunca falta, su comprobación depende de la etapa evolutiva en que llegue el material a nuestras manos. Las observaciones escalonadas en el tiempo del material experimental, nos permite afirmar que toda célula parasitada sufre un proceso de necrosis y que el nodulillo observado en la etapa evolutiva avanzada, etapa observada más frecuentemente por los investigadores, es la culminación de un proceso de remoción y fagocitosis de microfoco de necrosis. En cierto sentido, dicho nodulillo debe considerarse como un nodulillo residual.

En nuestro material experimental hemos comprobado extensos focos de necrosis con parásitos libres en su seno y pseudoquistes parasitarios en su periferia, no observándose por lo demás trombosis vasculares. Estos focos extensos de necrosis son en todo comparables a los vistos por nosotros en material humano, en la forma anatómica necrotizante cortical, en cuyo mecanismo patogenético juega un papel primordial la colonización masiva de los parásitos en los astrocitos corticales. Estas observaciones nos permiten presumir la existencia de un proceso citolítico, y nos conduce, por consiguiente, a una concepción opuesta a la sustentada por Alencar y Elejalde quienes en sus observaciones con material experimental afirman no haber encontrado ninguna evidencia histológica de que las leishmanias *S. cruzi* produzcan alguna sustancia de naturaleza tóxica o citolítica.

Según Ferreira-Berrutti, las miofibrillas desaparecen en los nidos repletos de parásitos, porque les sirven de medio nutritivo. En otros términos, los parásitos se nutren de la sustancia de la miofibrilla y la hacen desaparecer.

Sanabria, en sus estudios electromicroscópicos de la fase temprana de la miocarditis chagásica experimental en el ratón, comprueba destrucción de los sarcómeros y alteraciones de las mitocondrias en la fibra

parasitada y opina que tales alteraciones caracterizan anatomopatológicamente la miocarditis chagásica aguda experimental en el ratón blanco. Tales hallazgos evidencian la existencia de alteraciones regresivas graves en elementos estructurales de la fibra parasitada, los cuales pueden conducir a la necrosis segmentaria de la fibra, como tendremos ocasión de demostrar en otra oportunidad. Parece evidente que a nivel de los pseudoquistes parasitarios se desarrollen fenómenos citolíticos que conducen a la necrosis de la célula parasitada.

Nuestras investigaciones histoquímicas nos demuestran una gran actividad de la fosfatasa ácida y de la leucinaaminopeptidasa a nivel de los pseudoquistes parasitarios, lo cual sugiere la existencia de un sistema enzimático lisosómico liberado en ellos, lo que podría muy bien explicar los fenómenos citolíticos observados. Esta actividad enzimática lisosómica la hemos podido observar, por lo demás, en los pseudoquistes parasitarios del miocardio en la fase temprana de la miocarditis chagásica experimental.

Sabido es que los lisosomas juegan un importante papel en la fagocitosis, digestión, transporte transcelular, necrosis y autólisis. La membrana de los lisosomas es frágil y puede romperse liberando su sistema enzimático bajo el influjo de ciertas reacciones de orden inmunológico y en *vitro* bajo la acción de detergentes, solventes lípidos, fosfolipasa, proteasa, vibraciones sónicas, etc. Al parecer, los lisosomas juegan un importante papel en la remoción de partes de células, de células enteras y de material extracelular. Existen evidencias que indican que las enzimas lisosómicas pueden descargarse fuera de la célula para producir efectos líticos.

Particularmente tenemos la impresión de que la actividad de la fosfatasa ácida y de la leucinaaminopeptidasa está localizada inicialmente en el protoplasma de las formas leishmánicas del parásito y luego se difunde en todo el pseudoquiste. Esta impresión no la podemos afirmar de manera categórica, para ello necesitaríamos emprender investigaciones que nos permitieran una localización más fina de la actividad enzimática, como sería la investigación de la fosfatasa ácida por el microscopio electrónico, puesto que existe la posibilidad de que el sistema enzimático lisosómico liberado provenga de la célula parasitada.

Presentamos estos aspectos de nuestras investigaciones sobre la patogenia de la encefalitis chagásica experimental con el objeto de demostrar el camino que hemos seguido, con la esperanza de que otros investigadores repitan nuestras experiencias y las sometan a una rigurosa crítica científica.

### Resumen

Se presenta un estudio comparativo entre la encefalitis chagásica humana y la encefalitis chagásica experimental desde el punto de vista

morfológico y patogenético; se comprueba una similitud en el aspecto de las lesiones. Se comenta la importancia de los fenómenos necróticos en el mecanismo patogenético y el papel que juegan los fenómenos de macrofagia. La técnica histoquímica utilizada sugiere la existencia de un sistema enzimático lisosómico al cual se le atribuye los fenómenos citolíticos observados. Se discute el origen de este sistema enzimático lisosómico. No se observó ninguna diferencia en el comportamiento de las cepas parasitarias utilizadas en la experiencia.

### Summary

A comparative pathogenetic and morphologic study of the human and experimental chagasic encephalitis is made. There is a similarity in the morphologic aspect. The pathogenetic importance of necrotic and macrophagic phenomena are emphasized. The histochemical studies suggest that there is an enzymatic lisosomal system to which the cytolytic phenomena are probably due. Is discussed the source of this enzymatic system. There was no difference in the behavior of the strains inoculated.

### Referencias

1. Adams, C. W. M.: Neurohistochemistry. Elsevier Publishing. Company. Amsterdam - London New York, 1965.
2. Alencar, A. e Elejalde, P.: O sistema nervoso central no infestação experimental do Camundongo Albino pelo Schizotripanum Cruzi. Anais do Congresso Internacional sobre a doença de Chagas. Rio de Janeiro V. I.: 25, 1959.
3. Crowell, B. C.: The acute form of American Trypanosomiasis. Notes on its pathology with autopsy. Report and observations on Trypanosomiasis Cruzi in animals. Ame. J. Trop. Med., III: 425, 1923.
4. Chagas, Carlos: Nova entidade mórbida do homem. Rezumo geral de estudos etiológicos e clínicos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. T. III. Fs., 1-2: 219, 1911.
5. De Robertis, E. D. P.; Nowinski, W. W., y Sáez, F. A.: Biología celular. Librería "El Ateneo" Editorial. Buenos Aires, Lima, Río de Janeiro, Montevideo, México, Barcelona. Sexta edición.
6. Dominguez, A.: Über Enzephalitis (Chagas-Enzephalitis, Neuro-Mykosen und Helminthosen) in Venezuela. IV. Internationaler Kongress für Neuropathologie. München. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. Vol. III. Thema, IV: 281, 1961.
7. Feirreira-Berrutti, P.: Miocarditis en la enfermedad de Chagas. Anais do Congresso Internacional sobre a doença de Chagas. Rio de Janeiro, V. I.: 205, 1959.
8. Johnson, C. M.: American Trypanosomiasis. M. Clin. North America, 822, May, 1943.
9. Kaplow, L. S., y Burstone, M. C.: Citochemical demonstration of acid Phosphatase in hematopoietic cells in Health and in various hematological disorders using Azo Dye Techniques. The J. of Histoch. and Citoch., 12: 805, 1964.
10. Magarinos Torres, C., e Villaça, J.: Encefalite e mielite causadas por un tripanosomo (T. cruzi). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. IX. Fs., 1: 80, 1919.
11. Noetzel, M.; Elejalde, P., u Dias, E.: Über die Gehir veränderungen

- bei der Chagas Krankheit. Zeitsch, f. Trop. Med. u parasit. B, 9: 27, 1958.
12. Sanabria, A.: Ultraestructura del Trypanosoma cruzi en el miocardio del ratón. Parte I. Estadio Tripanosoma. Acta Científica Venezolana, 16: 163, 1965.
13. Thompson, S. W.: Selected Histochemical and Histopathological Methods. Charles, C. Thomas. Publisher, Springfield, Illinois, U.S.A.
14. Vianna, G.: Contribuição para o estudo da Anatomia Patologica da "Molestia de Carlos Chagas". Mem. Inst. Oswaldo Cruz. T. III. Fs., 1-2: 277, 1911.
15. Villela, E., e Magarinos Torres, C.: Lésions histopathologiques dans la paralysie expérimentale à Schizotrypanum cruzi chez le chien. Nature des cellules contenant le parasite dans le système nerveux central. C. R. Biol. T., 93(21): 133, 1925.
16. Villela, E., e Magarinos Torres, C.: Estudo histo-pathologico do systema nervoso central em paralyisia experimental determinada pelo Schizotrypanum Cruzi. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. T. XIX. Fasc., II: 175, 1926.