

QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO SUBCUTÂNEO EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *TAENIA CRASSICEPS* / CISTICERCOSE

RODRIGUES, Ariana Alves¹; **GONÇALVES**, Sabrina Fernandes²; **MOURA**, Vânia Beatriz Lopes²; **VINAUD**, Marina Clare²; **OLIVEIRA**, Flávia Aparecida²; **LINO-JUNIOR**, Ruy de Souza³

PALABRAS-CHAVE: Cisticercose, patologia experimental, colágeno.

1. INTRODUÇÃO

A *Taenia crassiceps* é um parasito de camundongos similar a *T. solium*, e com o qual possui antígenos comuns. Os cisticercos da *T. crassiceps*, quando inoculados em camundongos, multiplicam-se rapidamente no peritônio do animal. Tal fato justifica o seu intenso uso em pesquisas científicas como importante modelo experimental, principalmente em pesquisas imunológica e imunohistoquímica de diagnóstico da cisticercose (VAZ et al., 1997).

Em modelos experimentais, foram identificados vários mecanismos utilizados pelo cisticerco para modular a resposta imune e inflamatória. O parasito secreta um inibidor de serina proteinase, também chamada de taeniaestatina, que inibe a ativação do complemento e linfócitos, e a produção de interleucinas (IL). A superfície do parasito é recoberta por uma camada de polissacarídeo que dificulta a ativação do sistema complemento na parede do cisto. A paramiosina, presente no parasito, também inibe a via clássica de ativação do complemento. O parasito produz prostaglandinas e proteínas de baixo peso molecular que diminuem a inflamação e alteram a produção de citocinas pelos linfócitos T auxiliares (Th2). Os estágios iniciais da morte do parasito estão associados à produção de citocinas por linfócitos Th1, Interferon- γ e IL-2 (WHITE, 2000). Existe também uma correlação entre a viabilidade do parasito e a produção de citocinas. Nos primeiros estágios, a resposta imunológica é do tipo Th1, determinando a resposta citotóxica, causando a destruição do parasito. Entretanto, nos estágios mais avançados, predomina a resposta do tipo Th2, com expressão de IL4, IL5 e IL10, que desenvolvem um papel importante na modulação da resposta inflamatória, levando a uma ativação policlonal (ROBINSON et al., 1997; RODRIGUES et al., 2000).

O objetivo desse trabalho foi quantificar e comparar o colágeno no tecido subcutâneo de camundongos BALB C infectados com *Taenia crassiceps* / cisticercose após 90 e 300 dias de infecção.

2. METODOLOGIA

A cepa ORF da forma larvária de *T. crassiceps* (Freeman, 1962) foi mantida por passagens intraperitoniais sucessivas, a cada 90 dias, em camundongos fêmeas BALB/c de 8 a 12 semanas de idade pela Disciplina de Patologia Geral do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás com técnica similar a outro estudo (Vaz et al., 1997).

Para a realização desse estudo, foram selecionados dois grupos: 1) Cinco animais infectados pelo cisticerco de *T. crassiceps*, analisados 90 dias após inoculação e; 2) Cinco animais infectados, pelo cisticerco de *T. crassiceps*, analisados 300 dias após a inoculação. Os animais foram sacrificados utilizando-se uma câmara de CO₂, logo após o tecido subcutâneo, adjacente ao local de implantação dos cisticercos, foi retirado e processado em álcoois com concentrações crescentes (70 a 100%), diafanizado em xilol e emblocado em parafina. Foram confeccionadas lâminas em cortes seriados de 4 μ m de espessura. A lâmina 1 foi

corada por hematoxilina e eosina (HE). A lâmina 2 foi corada por picrossírius (solução aquosa saturada de ácido pícrico adicionada de 0,1g% de vermelho da Síria F3b, Sirius red F3B-Bayer) (Junqueira, Bignolas e Brentani 1979) com contra-coloração pela hematoxilina por 1 minuto.

A quantificação da fibrose foi realizada na lâmina corada pelo picrossírius examinada sob luz polarizada, com objetiva de 40x. O campo para quantificação da fibrose foi capturado por meio de uma câmara acoplada ao microscópio e ao computador para digitalização da imagem.

As fotografias foram analisadas com o programa Image J (NHI) que forneceu a porcentagem da área que as fibras de colágeno ocupavam em cada campo. O colágeno foi quantificado em todos os campos, que em média correspondiam a 30. A quantidade de campos foi estabelecida pelo cálculo da média acumulada.

Para a análise estatística foi elaborado um banco de dados eletrônico. Foi analisado e comparado se existiam diferenças significativas entre os valores de colágeno encontrados referente a 300 DAÍ e 90 DAÍ. Foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, na comparação entre os dois grupos, sendo que o nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram encontrados na literatura trabalhos que descreveram as alterações anatomopatológicas provocada pela presença de cisticercos de *Taenia crassiceps* no subcutâneo de camundongos BALB/c.

Macroscopicamente observamos aumento do volume do dorso dos animais na região da inoculação do parasito. Após a incisão no local da inoculação foram encontrados nódulos que diferem em relação aos animais sacrificados após 90 e 300 DAÍ. Processo que pode ser explicado pela reação inflamatória ali instalada. Esse aumento foi registrado nos camundongos com 90 e 300 DAÍ.

Nos animais com 90 DAÍ, notamos a presença de nódulos circunscritos de aspecto opaco e esbranquiçado com membrana delgada, essa região esbranquiçada sugere a presença de tecido conjuntivo envolvendo os cisticercos. Essa região estava altamente vascularizada e no interior dos nódulos foram verificados cisticercos viáveis e em processo de destruição.

Nos com 300 DAÍ observamos lesões nodulares de tamanho menor que as lesões encontradas aos 90 DAÍ, de coloração amarelada, circundada por uma membrana espessada característica do processo de fibrose. A área ao redor do nódulo estava hiperemiada e inflamada. Após a incisão feita nesses nódulos podemos observar no interior cisticercos viáveis e em processo de destruição.

Após a análise da infecção por cisticercos de *Taenia crassiceps* no subcutâneo dos animais observamos pela microscopia a formação de uma reação inflamatória crônica e produção de fibrose, além disso, detectamos um aumento significativo ($p \leq 0,001$) na quantidade de colágeno nos animais com 300 DAÍ (mediana = 1,8) quando comparados aos de 90 DAÍ (mediana = 0,9).

Nos animais com 90 DAÍ, observamos maior quantidade de fibras delgadas e com tons avermelhados, isto é, tipo I. Nos animais com 300 DAÍ, observamos que as fibras colágenas são de espessura maior em cores que variam entre o vermelho e o verde, isto é, tipo III. De acordo com a literatura o colágeno tipo I aparece como fibras espessas (aproximadamente: 75 nm), birefringentes de cor amarelo ou vermelho. Já o colágeno tipo III aparece com um grupo de fibras delgadas (aproximadamente: 45 nm), birefringentes esverdeadas (SOUZA *et al*,2002).

O processo inflamatório presente nos animais com 90 DAÍ e 300 DAÍ, pode ser considerado crônico, tanto pelo tempo de infecção como pela presença de colágeno, entretanto os animais com 300 DAÍ possuem ao final do experimento 1 ano de idade, sendo portanto considerados idosos (WALTERS & CLAMAN, 1975). Acreditamos que a idade dos animais teria influência significativa no aumento de colágeno.

4. CONCLUSÃO

Foi possível observar macroscopicamente durante a necropsia dos animais que as lesões provocadas pelo parasito em 90 e 300 DAÍ eram diferentes, principalmente com relação ao tamanho do nódulo e aspecto da membrana de tecido conjuntivo que recobria os cisticercos.

A porcentagem de colágeno foi significativamente maior nos animais com 300 DAÍ. Houve diferença no tipo de colágeno encontrado nos animais com 90 e 300 DAÍ, com predomínio de colágeno tipo I em animais com 90 DAÍ e colágeno tipo III em animais com 300 DAÍ. A diferença na porcentagem encontrada pode ter ocorrido pela diferença de idade dos animais, visto que o animal com 300 DAÍ era idoso e portanto sujeito a um aumento de colágeno.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ROBINSON, P., ATMAR, R.L., LEWIS, D.E., WHITE, A.C. Granuloma cytokines in murine cysticercosis. *Infection and Immunity*, v.65, p.2925-2931, 1997.
2. RODRIGUES, JR. V., MELLO, F.A., MAGALHÃES, E.P., RIBEIRO, S.B.F., MARQUEZ, J.O. Interleukin-5 and interleukin-10 the major cytokines in cerebrospinal fluid from patients with active neurocysticercosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.33, p.1059-1063, 2000.
3. SOUZA; R. R. Aging of myocardial collagen. *Biogerontology* 3, p. 325-335, 2002.
4. VAZ A. J., NUNES C. M., PIAZZA R. M. F., LIVRAMENTO A. J., SILVA M. V., NAKAMURA P. M., FERREIRA W. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol 57, n.3, p. 354-357, 1997.
5. WALTERS C. S., CLAMAN H. N. Age-related changes in cell-mediated immunity in BALB/C mice. *Journal of immunology*, vol 115, p.1438-1443.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq/PIBIC

1 Bolsista de iniciação científica. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG – ariana.biomed@gmail.com

2. Disciplina de Patologia Geral do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública /UFG

³ Orientador/Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública /UFG, ruy@iptsp.ufg.br