

Avaliação Imunoistoquímica das Células Esplênicas e Pulmonares de Camundongos com Lagochilascariose Experimental

Neusa Mariana Costa DIAS & Mara Silvia CARVALHAES

Setor de Imunologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública,
Universidade Federal de Goiás

nmariana.biomed@gmail.com; msilvia@iptsp.ufg.br

Palavras-chave: *Lagochilascaris minor*, helmintose, imunoistoquímica, linfócitos

Introdução- A lagochilascariose é uma antropozoonose cujo agente etiológico é *Lagochilascaris minor*. É uma doença de evolução longa, que afeta a região da oro-naso-faringe provocando abscessos exudativos com presença de ovos, parasitos adultos e larvas, indicando a ocorrência de auto-infecção. Algumas vezes o parasita invade o tecido pulmonar e o sistema nervoso central, levando a morte do hospedeiro. O ciclo de vida natural de *L. minor* e o mecanismo de infecção não estão bem esclarecidos, talvez pelo fato do parasita possuir hábitos bem inusitados (Spadafora-Ferreira et al.2010). O ciclo experimental do parasita foi descrito utilizando-se camundongos como hospedeiros intermediários e felinos domésticos como hospedeiros definitivos (Campos et al.1992; Volcan et al. 1992).

A disponibilidade de linhagens isogênicas de camundongos com diferentes “background” genéticos favorece o estudo da relação parasita-hospedeiro que é crucial no estabelecimento da susceptibilidade ou resistência a uma infecção. Foi demonstrado recentemente que camundongos C57BL/6 são mais susceptíveis a lagochilascariose experimental que camundongos BALB/c, apresentando lesões pulmonares mais intensas e um grande número de nódulos subcutâneos contendo larvas L3 encistadas (Freitas et al. 2008).

Neste trabalho, foram avaliadas por imunoistoquímica a presença dos marcadores celulares F4/80 (macrófagos), CD19 (linfócitos B), CD4 (linfócitos T

auxiliares), CD8 (linfócitos T citolíticos) nas células pulmonares e esplênicas de camundongos BALB/c e C57BL/6 em diferentes períodos da infecção e respectivos animais controles.

Material e Métodos- Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram inoculados oralmente com $10^3 \pm 200$ ovos de *L. minor* por animal. Depois de 7, 35, 100, 150 e 250 dias de infecção, grupos de 5 animais foram sacrificados. O mesmo número de animais não infectados foi utilizado como controle. A quantificação dos tipos celulares foi realizada nas lâminas marcadas por imunoistoquímica com objetiva de 40x. Cortes de baço (35, 100, 150 e 250 dias após a infecção) e de pulmão congelados (7, 35 e 100 dias após a infecção) foram incubados com anticorpos marcados com PE: anti-F4/80, anti-CD19, anti-CD4, e anti-CD8. Os campos para quantificação foram capturados por meio de uma câmera acoplada ao microscópio e ao computador para digitalização. A diferenciação e quantificação celular foram realizadas no sistema analisador de imagens Image J (NIH/EUA). Foram quantificados campos ou pontos, calculados pela média acumulada. A contagem de células esplênicas considerou as células marcadas em 48 pontos. A contagem de células pulmonares considerou as células marcadas em 30 pontos. A análise estatística foi feita no programa Prisma 3 utilizando-se a média acumulada e desvio padrão seguida de teste T.

Resultados e Discussão- A análise quantitativa das células apresentando o marcador F4/80 no baço demonstrou que a linhagem C57BL/6 apresentou uma quantidade significativamente aumentada, aos 35, 100 e 250 dias após a infecção, quando comparados a linhagem BALB/c. A cinética desta população celular foi semelhante nas duas linhagens de camundongos, com queda aos 100 dias de infecção, e posterior aumento, dependente do tempo, que foi mais acentuado nos animais C57BL/6 infectados. Nos pulmões de camundongos BALB/c foi observado valor significativamente aumentado de células F4/80+ aos 100 dias pós-infecção, quando comparado à linhagem C57BL/6. Os macrófagos “classicamente ativados” são ativados por citocinas do perfil Ta1, produzindo reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio com alto poder microbicida. O óxido nítrico (NO) derivado desses macrófagos é citotóxico contra o estágio larvário em algumas helmintoses (Trujillo et al. 2007).

Macrófagos residentes e da corrente circulatória podem estar respondendo a *L.minor* no local de infecção, podendo ser macrófagos alternativamente ativados, os quais são ativados durante uma resposta do tipo Ta2, apresentando atividade anti-inflamatória e imunorreguladora, atuando no reparo tecidual pós-infecção.

A cinética das células CD19+ nas duas linhagens de camundongos foi diferente. Nos animais BALB/c observamos aumento gradativo destas células até os 150 dias de infecção e posterior queda. Nos camundongos C57BL/6 foi observado redução de células CD19+ aos 100 e 250 dias de infecção, com aumento real aos 150 dias. Os camundongos C57BL/6 apresentaram maior quantidade de células esplênicas CD19+, quando comparados aos BALB/c, durante todo o período estudado. Nos pulmões da linhagem C57BL/6, não foi observado diferença estatística na quantidade destas células ao longo da infecção; entretanto, em camundongos BALB/c observou-se uma cinética decrescente de aparecimento de células CD19, com diferença estatística em todos os dias de infecção. É importante evidenciar a participação de células B na evolução da lagochilascariose experimental. Os resultados encontrados nas células esplênicas na linhagem C57BL/6 podem refletir pequena participação de células B convencionais e maior participação de células B1. Células B1 produzem grandes quantidades de imunoglobulinas IgM, IgA e IgG3. Estudos demonstraram que nesta linhagem níveis de imunoglobulinas IgM e IgA específicas para o extrato bruto do parasita, foram detectadas precocemente aos 15 dias pós-infecção (Prudente et al. 2009)

Aos 35, 100 e 150 dias de infecção, na linhagem BALB/c, foi observado diferença estatística na quantidade de células CD4+, com queda aos 100 dias e aumento dependente do tempo até os 250 dias pós-infecção. Na linhagem C57BL/6, foi observada diferença estatística entre os diferentes dias de infecção, com quantidade máxima de células CD4+ aos 150 dias, e redução aos 250 dias de infecção. Camundongos BALB/c infectados apresentaram o dobro de células CD4+ nos pulmões aos 100 dias pós-infecção, que os C57BL/6 infectados. As células CD4+ da linhagem C57BL/6 podem não estar migrando do baço para os pulmões e pode estar relacionada a mecanismos imunomoduladores induzidos pelos antígenos de *L.minor*, que atuam inibindo a

resposta proliferativa celular. Os helmintos podem interagir com a resposta imune do hospedeiro levando à supressão sistêmica da imunidade inata e adquirida, com a indução de linfócitos T reg (CD4+ CD25+) ou citocinas anti-inflamatórias como IL-10, TGF- β , ou outro tipo de célula T, incluindo células T CD8+ com atividade supressora independente de citocinas (Jackson et al. 2008).

Foi demonstrada no baço de camundongos BALB/c uma diferença estatística nas contagens entre os diferentes dias após a infecção, com número máximo de células CD8+ aos 150 dias e número mínimo aos 100 dias após a infecção. Nos camundongos C57BL/6, foi visualizado queda de células CD8+ aos 100 e 250 dias, com pico máximo aos 150 dias de infecção. Camundongos BALB/c infectados apresentaram o dobro de células CD8+ nos pulmões quando comparados aos C57BL/6 infectados durante os 100 dias pós-infecção. Linfócitos TCD8+ encontrados durante a infecção podem refletir a produção de interferon gama (IFN- γ), que pode estar contribuindo no controle da infecção. Estas células podem exercer funções extras no combate a esta infecção, através da produção não convencional de citocinas de resposta Ta1 ou Treg.

Freitas et al. (2008) descreveram que camundongos da linhagem BALB/c apresentaram maior nível sérico de IFN γ durante a infecção. Assim, as células ao produzirem IFN γ durante a infecção poderiam estar atuando na resistência durante a lagochilascariose experimental.

Conclusões- Camundongos C57BL/6 apresentaram maior quantidade de macrófagos, linfócitos B e células CD8+ esplênicas. Considerando o tecido pulmonar, camundongos BALB/c apresentaram maior número de macrófagos, linfócitos B e células T CD4+ e CD8+. Camundongos BALB/c, mais resistentes à lagochilascariose experimental, apresentaram aumento de células T CD4+ desde o início da infecção. Chamamos atenção para a presença de linfócitos TCD8+ durante a lagochilascariose experimental, que não é comum em infecções por helmintos. A análise das populações celulares presentes nos pulmões e baço, detectadas por imunistoquímica, mostraram que a infecção por *L. minor* envolve diferentes populações celulares, que atuam simultaneamente no controle ou na resistência à infecção.

Órgãos financiadores: FAPEG (002-2007) e FAPESP

Referências Bibliográficas

Campos DMB, Freire Filha LG, Vieira MA, Paçô JM, Maia MA 1992. Experimental life cycle of *Lagochilascaris minor* Leiper 1909. *Rev Inst Med Trop S.Paulo* 34: 277-287.

Freitas JG, Prudente MFS, Spadafora-Ferreira M, Junqueira-Kipnis AP, Paula EC, Tambourgi DV, Lino-Júnior RS, Carvalhaes MS 2008. *Lagochilascaris minor*: Experimental infection of C57BL/6 and BALB/c isogenic mice reveals the presence of adult worms. *Exp Parasitol* 119: 325-331.

Jackson AJ, Friberg MI, Little S, Bradley EJ 2008. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: Immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies? *Immunology* 126: 18–27.

Prudente MFS, Crespo AMC, Carvalhaes MS 2009. *Lagochilascaris minor*: antibody production in experimentally infected mice. *Rev da Soc Bras de Med Trop* 42:325-328.

Spadafora-Ferreira M, Fernandes LC, Hoffman Pfrimer IA, Pichitelli CR, Vilarinho Tambourgi D, de Souza Lino-Junior R, Carvalhaes MS 2010. *Lagochilascaris minor*: Susceptibility and resistance to experimental infection in mice is independent of H-2a haplotype and correlates with the immune response in immunized animals. *J Parasitol Res*: 1-8.

Trujillo JA, Montoya IR, Sosa MR, Terrazas LI 2007. Nitric oxide contributes to host resistance against experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitol Res* 100:1341-1350.

Volcan GS, Medrano CE, Payares G 1992. Experimental heteroxenous cycle of *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909 (Nematoda: Ascarididae), in white mice and cats. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 532-535.