

ESTUDO SOBRE O PAPEL DOS EOSINÓFILOS NA DESTRUIÇÃO DOS ESQUISTOSSÔMULOS DO *SCHISTOSOMA MANSONI* *IN VIVO*

(Nota Prévia)

ZILTON A. ANDRADE & MITERMAYER GALVÃO DOS REIS

Esquistossômulos obtidos através de processo mecânico foram injetados na veia da cauda de camundongos Balb/c (2.000 esquist./0,15ml) e as reações pulmonares foram estudadas histologicamente após 24, 48, 72 e 96 horas. Os animais estavam divididos em quatro grupos: 1) animais normais injetados com esquistossômulos vivos; 2) animais normais injetados com esquistossômulos mortos; 3) animais infectados há dez semanas com 30 cercárias do Schistosoma mansoni e injetados com esquistossômulos vivos e 4) animais semelhantes aos do grupo acima, mas injetados com esquistossômulos mortos.

As reações pulmonares bem desenvolvidas em torno dos esquistossômulos, só foram observadas nos animais injetados com esquistossômulos mortos e foram mais intensas e com maior quantidade de eosinófilos nos animais já infectados. Estes resultados diferem daqueles observados in vitro, em que os esquistossômulos são destruídos por um sistema composto de anticorpos específicos, complemento e eosinófilos, estas últimas células destruindo as larvas por citoaderência, degranulação e citotoxicidade. O presente trabalho indica que in vivo a infiltração de eosinófilos ocorre após a morte das larvas, no animal sensibilizado.

O mecanismo de resistência de um hospedeiro na esquistossomose parece não afetar muito os vermes já estabelecidos no sistema porta, mas se manifesta mais evidente contra os esquistossômulos cutâneos e pulmonares oriundos de uma reinfeção (Smithers & Terry, 1969). Os esquistossômulos são destruídos através de mecanismo imune humoral, com a participação de anticorpos específicos e complemento e tendo o eosinófilo como célula efetora. Um sistema *in vitro* tem permitido uma demonstração convincente destes fenômenos. Na presença de anticorpos específicos e complemento, os eosinófilos, mesmo não sensibilizados, aderem ao tegumento da larva e eliminam seus grânulos provocando lesões e a morte da mesma (Butterworth et al., 1979).

Entretanto, todo sistema *in vitro* tem limitações e precisa ser bem testado para que se entenda o quanto de real ou artificial está nele contido.

Em estudos anteriores em nosso laboratório (Andrade & Brito, 1982) havia sido assinalada intensa reação com eosinófilos em torno a esquistossômulos em desintegração nos tecidos de camundongos já infectados pelo *S. mansoni*, enquanto, concomitantemente, na pele e nos pulmões apareciam esquistossômulos íntegros e sem qualquer reação em torno. Para explicar este achado uma das nossas hipóteses era de que *in vivo* a atração e acumulação de eosinófilos se fazia somente após a morte dos esquistossômulos. Para testar esta hipótese foi feito preliminarmente o presente trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados camundongos Balb/c machos, adultos, jovens, pesando em torno de 18g. A metade destes animais foi infectada com 30 cercárias do *S. mansoni* recentemente eliminadas por caramujos infectados e criados no laboratório. Dez semanas após a exposição cercariana e a comprovação da infecção pelo achado de ovos nas fezes, oito destes animais e oito animais dos que permaneceram não infectados foram injetados através da veia da cauda com 2.000 esquistossômulos cada, em 0,15ml da solução de Hanks. Quatro animais infectados e quatro não infectados foram injetados com os esquistossômulos vivos, enquanto que os animais restantes foram com esquistossômulos mortos. Assim, ficaram estabelecidos dois grupos e quatro subgrupos, cada um destes últimos com quatro animais.

1º Grupo – animais infectados há dez semanas com o *S. mansoni*: a) injetados com esquistossômulos vivos; b) injetados com esquistossômulos mortos.

2º Grupo – animais normais, não infectados: a) injetados com esquistossômulos vivos; b) injetados com esquistossômulos mortos.

Os esquistossômulos foram obtidos através de processo mecânico (Ramalho Pinto et al., 1974) a partir de cercárias espontaneamente eliminadas por caramujos criados e infectados no laboratório, com miracídeos da cepa Feira de Santana, Bahia. Os esquistossômulos vivos, móveis e não corados pelo azul de metileno, foram injetados logo após a obtenção. Para conseguir esquistossômulos mortos, foi feito o congelamento dos mesmos seguido de descongelamento. O teste de impregnação pelo azul de metileno foi empregado para comprovar a inviabilidade dos esquistossômulos a serem injetados.

Os animais foram sacrificados, um de cada subgrupo, 24, 48, 72 e 96 horas após a injeção dos esquistossômulos. Os animais foram anestesiados, exsangüinados e os pulmões foram fixados e levemente distendidos pela injeção intratraqueal de líquido de Bouin. Fragmentos representativos de todo o pulmão foram incluídos em parafina e os cortes múltiplos obtidos foram corados pela hematoxilina-eosina.

RESULTADOS

O material obtido foi de excelente qualidade e os pulmões se apresentavam livres de processos secundários como pneumonia, edema ou hemorragias. Os animais, infectados ou não infectados, que foram injetados com esquistossômulos vivos, não exibiram alterações pulmonares em torno dos mesmos, a não ser em alguns após 72 ou 96 horas da injeção. A maioria absoluta dos esquistossômulos aparecia bem preservada, situada em capilares alveolares, sem qualquer reação evidente, desde 24 até 96 horas após a injeção (Fig. 1).

As reações ocorreram com os esquistossômulos mortos. Nos animais não infectados as larvas em desintegração apareciam envolvidas por uma coleção de células mononucleares (Fig. 2). Esta reação parecia progressiva e as reações mais celulares foram observadas após 48 e 72 horas, embora a infiltração de algumas células estivesse presente desde 24 horas após a injeção. A presença de polimorfonucleares foi escassa e se fazia tardiamente. Entre os polimorfonucleares, alguns eram eosinófilos.

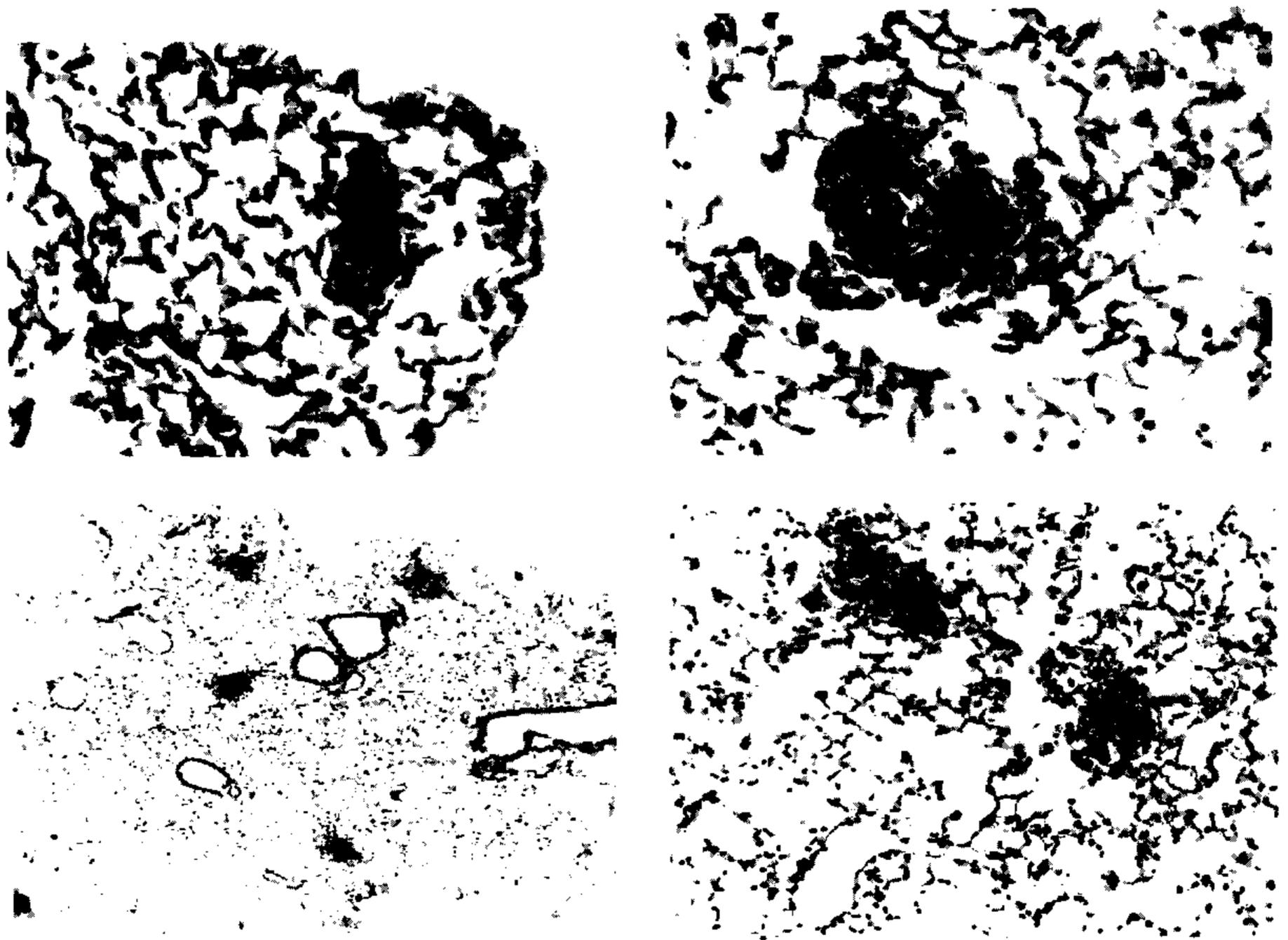


Fig. 1: esquistossômulo íntegro no interior do tecido alveolar pulmonar sem reação em torno. Injeção de esquistossômulos vivos 72 horas antes em animal com dez semanas de infecção pelo *S. mansoni*. Hematoxilina e eosina, 150X. Fig. 2: esquistossômulo morto e em desintegração no seio do tecido pulmonar rodeado por um colar de células mononucleares. Animal normal que foi injetado com esquistossômulos mortos 96 horas antes. Hematoxilina e eosina, 150X. Fig. 3: secção de pulmão de um camundongo infectado há dez semanas pelo *S. mansoni* e que foi injetado na veia da cauda com esquistossômulos mortos 24 horas antes de ser sacrificado. Vêm-se vários esquistossômulos rodeados por acúmulos de células inflamatórias (eosinófilos). Hematoxilina e eosina, 80X. Fig. 4: esquistossômulos em desintegração e infiltração focal de leucócitos eosinófilos. Animal infectado injetado 48 horas antes com esquistossômulos mortos. Hematoxilina e eosina, 120X.

Nos animais infectados, as reações foram nítidas e ocorreram uniformemente em torno de cada esquistossômulo logo após as 24 horas (Fig. 3). O elemento celular nesta reação foi o leucócito polimorfonuclear eosinófilo (Fig. 4). Ao contrário da reação macrofágica nos animais não infectados, onde as células formavam um colar em torno da larva em desintegração, nos animais previamente infectados os eosinófilos se misturavam com os detritos das larvas ou pareciam invadi-las precocemente.

COMENTÁRIOS

No presente experimento, uma reação precoce e intensa por parte de eosinófilos em torno a esquistossômulos ocorreu apenas nos animais já infectados com o *S. mansoni* e, assim mesmo, só quando foram injetados esquistossômulos mortos. Estes achados diferem daqueles obtidos *in vitro* e apontam a participação dos eosinófilos na reação aos esquistossômulos como tardia e secundária. Parece que a desintegração dos esquistossômulos libera fatores quimiotáticos para os eosinófilos e que a rapidez e intensidade com que se faz a reação destes dependem da presença da infecção prévia pelo *S. mansoni*.

Dados obtidos através da depleção de eosinófilos com a utilização de um soro monoespecífico anti-eosinófilos, aparentemente mostraram que estas células contribuem fortemente para a resistência às reinfeções (Mahmoud, Warren & Peters, 1975). Todavia, não se sabe que outros fatores são alterados com a administração do anti-soro, nem até hoje foi possível se repetir este trabalho. Por outro lado, foi visto que a depleção de leucócitos circulantes e dos tecidos de ratos por irradiação gama não altera significativamente a imunidade humoral transferida (Góes & Ramalho-Pinto, 1980). Os achados deste último trabalho sugerem que a morte dos esquistossômulos depende da participação de anticorpos específicos e independe da participação dos leucócitos. Os achados observados no presente trabalho concordam com esta possibilidade. Estudos mais detalhados, inclusive com a injeção de esquistossômulos pulmonares (de cinco dias), estão em curso e deverão contribuir para o melhor esclarecimento do problema.

SUMMARY

Schistosoma mansoni cercariae mechanically transformed into schistosomula were injected, either dead or alive, into the tail vein (2.000 larvae/0,15 ml) of Balb/c mice which were either previously infected with *S. mansoni* (10 weeks/50 cercariae) or non-infected. Histological examination of the lungs 24, 48, 72 and 96 hours after injection revealed that inflammatory reaction around schistosomula occurred only in the groups injected with dead schistosomula (killed by freezing and thawing). In non-infected animals the reaction was predominantly macrophagic while in those infected many eosinophils appeared around the dead larvae.

These results are at variance with those obtained *in vitro* and suggest that *in vivo* the participation of eosinophils in the schistosomulum induced reaction in sensitized animals is secondary to the death of the larvae.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, Z.A. & BRITO, P.A., 1982. Curative chemotherapy and resistance to reinfection in murine schistosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31 :116-121.
- BUTTERWORTH, A.E.; VADAS, M.A.; WASSON, D.L.; DESSEIN, A.; HOGAN, M.; SHERRY, B.; GLEICH, G.Y. & DAVID, J.R., 1979. Interactions between human eosinophils and schistosomula of *Schistosoma mansoni*. II. The mechanism of irreversible eosinophil adherence. *J. Exper. Med.*, 150 :1456-1471.
- GÓES, A.M. & RAMALHO-PINTO, F.Y., 1980. Efeito da depleção de leucócito de ratos por irradiação subtotal na imunidade passiva transferida ao *Schistosoma mansoni*. 32ª Reunião Anual da SBPC, Rio de Janeiro, 6/12 de julho.
- MAHMOUD, A.A.F.; WARREN, K.S. & PETERS, P.A., 1975. A role for the eosinophil in acquired resistance to *Schistosoma mansoni* infection as determined by anti-eosinophil serum. *J. Exper. Med.* 142 :805-813.
- RAMALHO-PINTO, F.J.; GAZZINELLI, G.; HOWELLS, R.E.; MOTA SANTOS, T.A.; FIGUEIREDO, E.A. & PELEGRINO, J., 1974. *Schistosoma mansoni*. Defined system for stepwise transformation of cercariae to schistosomule *in vitro*. *Exper. Parasitol.* 36 :360-372.
- SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J., 1969. Immunity in schistosomiasis. *Ann. New York Acad. Sci.* 160 :826-840.