

CAPILLARIA HEPATICA: ALGUNS ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS DA INFECÇÃO ESPÚRIA E DA INFECÇÃO VERDADEIRA

Ivana Nascimento¹ e Moysés Sadigursky²

A fim de se observar uma possível proteção conferida pela infecção espúria contra uma infecção verdadeira por Capillaria hepatica, camundongos foram inoculados com ovos não embrionados (infecção espúria) e, posteriormente, com ovos embrionados (infecção verdadeira). Anticorpos específicos da classe IgG, detectados por teste imunoenzimático (ELISA), mostraram-se elevados a partir da segunda semana do experimento. O teste de hipersensibilidade cutânea tardia resultou negativo. O exame das lesões do fígado, assim como a contagem de ovos, utilizados como parâmetros para comparação entre os grupos de animais estudados, não apresentaram variação significativa indicando que a imunidade humoral induzida pela infecção espúria não tem potencial protetor.

Palavras-chaves: *Capillaria hepatica*: Capilariase. ELISA.

Capillaria hepatica é um helminto que infecta várias espécies de mamíferos²⁰, desde roedores e animais domésticos¹⁸ a primatas⁶, incluindo o homem. Tem sido encontrado em quase todas as regiões do mundo sob as mais diversas condições climáticas e ambientais^{7 8 11 12}.

Entretanto, apesar da ampla disseminação entre os animais e da capacidade dos ovos eliminados nas fezes, de embrionarem no solo e permanecerem viáveis em condições diversas¹³, a prevalência da doença em indivíduos da espécie humana é muito baixa, mesmo em comunidades que vivem em condições precárias de higiene.

Com base nesses dados decidimos ampliar o estudo sobre o papel da infecção espúria por via oral e verificar sua importância na resposta imune, na possível proteção conferida por esta contra uma infecção verdadeira posterior e ainda na imunopatologia, utilizando camundongos como animais de experimentação.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em camundongos "Swiss", não isogênicos entre 18 e 20 g, distribuídos em seis grupos tratados, no dia "0" do experimento, como descrito a seguir:

Grupo I – Nove animais infectados com 20 ovos embrionados (infecção verdadeira – I.V.);

Grupo II – Quinze animais inoculados com 2500 ovos não embrionados (infecção espúria – I.E.);

Grupo III – Onze animais inoculados com 2500 ovos nos dias 0, 7, 14 e 21;

Grupos IV e V – não foram inoculados nesta fase.

Grupo VI com oito animais conservados sem infecção, como controle normal.

Os Grupos I, II, III e IV foram infectados com 20 ovos embrionados e o grupo V com 2500 ovos não embrionados no 28º dia do experimento.

Ovos embrionados e não embrionados para manutenção do ciclo e infecção dos animais foram obtidos segundo a mesma técnica utilizada por Juliano¹⁰. As inoculações foram feitas por via oral utilizando-se seringas com agulha hipodérmica 30x8 com ponta romba revestida por solda metálica de prata. Fez-se o cálculo do número de ovos/ml contando-se 1 ml de suspensão de ovos em câmara de Sedgwick-Rafter¹. A diluição ou concentração foi feita em solução salina tamponada (SST) pH 7.2.

O nível de IgG específica anti-*C. hepatica* foi acompanhado mediante teste imunoenzimático (ELISA). Os soros foram obtidos por coleta de sangue do plexo retro-orbitário dos animais dos Grupos I, II, III, IV, V e VI no dia 0 do experimento e dos grupos I, II, III e VI nos dias 7, 14, 21 e 28. No 68º dia do experimento todos os animais foram sacrificados obtendo-se soro a partir de sangue coletado do plexo axilar.

Para o teste imunoenzimático utilizou-se antígeno solúvel retirado de ovos não embrionados e de vermes adultos os quais foram obtidos por esmagamento manual do fígado o que permitiu coletar os vermes ainda vivos. Os ovos não embrionados foram extraídos triturando-se os fígados em liquidificador com SST 0,15M, pH 7,2 contendo 100U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estrept-

1. Departamento de Biomorfologia, ICS, Universidade Federal da Bahia, Salvador-Bahia-Brasil.

2. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ/UFBA). Trabalho realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Recebido para publicação em 26/6/85

tomicina. Após decantação o sedimento foi ressuspenso em SST 0,15M, pH 7,2 e a operação repetida até o sobrenadante ficar claro. O sedimento foi tratado com tripsina a 0,25%, sob agitação. Após centrifugação a 300 g durante 10 minutos, o sedimento foi ressuspenso em SST 0,15M, pH 7,2 novamente centrifugado repetindo-se a operação três vezes. Finalmente o sedimento contendo os ovos de *C. hepatica* foi homogeneizado juntamente com os vermes adultos, em homogeneizador Porter durante 30 minutos em recipiente com gelo e centrifugado durante 10 minutos a 300g. O sobrenadante coletado apresentou uma concentração de proteínas da ordem de 560 µg/ml. Este antígeno foi, então, diluído em tampão carbonato 0,05M pH 9,5, para concentração final de 10 µg de proteína por ml. Duzentos microlitros desta solução foram colocados em cada um dos poços de placas de microtitulação (Linbro Microplate, 96 Flat bottom wells. lot. n.º 76-381-04 Virginia 22102, USA) as quais foram incubados a 37° C durante, no mínimo, 3 horas. Após lavagem foram adicionados duzentos microlitros do soro a ser testado, diluído 1:40 (diluição padronizada previamente) em SST/Tween realizando a reação em duplicata para cada soro. O antissor, anti-IgG de camundongo produzido em cabra, conjugado com peroxidase (Sigma Chemical Co. Lot. 72F 8835), foi diluído a 1:1000. A reação foi revelada com OPD (Sigma). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de leitura múltipla automática (Titer-tek Multiskan) em 492nm de comprimento de onda.

Para o teste de hipersensibilidade cutânea tardia utilizou-se antígeno solúvel obtido por homogeneização de ovos não embrionados em SST pH 7,4. O teste foi realizado no 64º dia do experimento, em cinco animais de cada grupo. Inoculou-se no coxim da pata traseira esquerda de cada animal, 50 µg de proteína em 35 µl de SST pH 7,4 e, no coxim da pata direita traseira, 35 µl de SST pH 7,4. A medida da espessura dos coxins das patas traseiras foi feita antes da inoculação e 2, 24 e 48 horas depois.

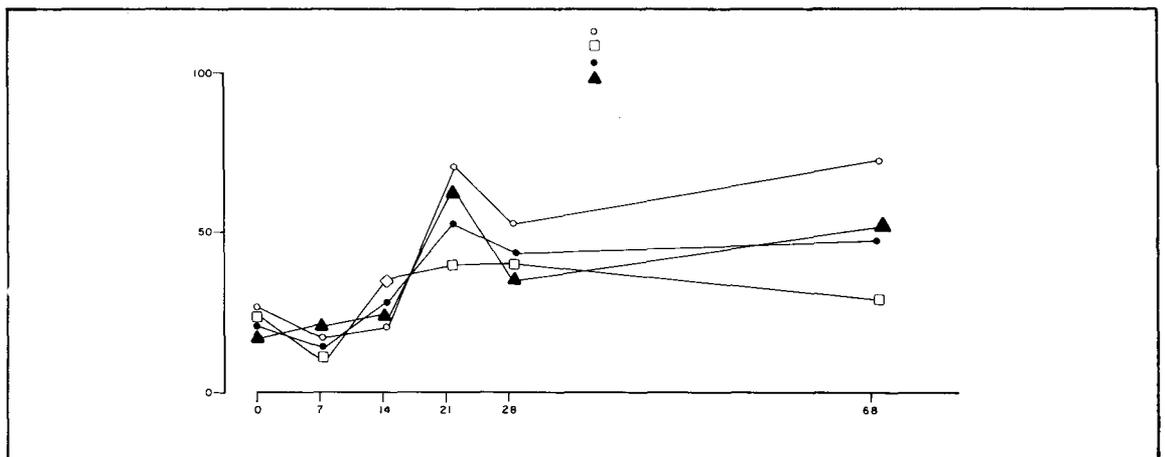
No 68º dia do experimento todos os animais foram sacrificados, retirando-se o fígado de cinco animais do grupo I, quatro do grupo II, sete do grupo III, oito do grupo IV, oito do grupo V e quatro do grupo VI, os quais foram submetidos à digestão por KOH a 5% para se fazer a contagem dos ovos em placas de Sedgwick-Rafter¹. Dos animais restantes foram utilizados fragmentos de fígado para exame anatomo-patológico.

RESULTADOS

Através dos valores obtidos pela leitura da densidade ótica foi possível observar uma elevação dos níveis de anticorpos a partir da segunda semana da infecção nos grupos I e II, havendo uma queda por volta da quarta semana. Entretanto, na dosagem realizada no 68º dia do experimento, observou-se significativa elevação dos níveis de IgG específica (Figura 1).

Figura 1 - Níveis de IgG anti-*C. hepatica* dos grupos I, II, III e VI nos diversos dias do experimento (ELISA)
Ordenada: Média das percentagens da densidade ótica
Abscissa: Dia do experimento

- O - Grupo I
- - Grupo II
- - Grupo III
- ▲ - Grupo VI



O teste de hipersensibilidade cutânea tardia não evidenciou variação significativa entre os animais dos grupos estudados.

A contagem dos ovos obtidos pela digestão em KOH 5% dos fígados dos animais dos grupos I, II, III e IV não evidenciou variação significativa entre os grupos (Tabela 1).



Figura 2 – *Parênquima hepático com exsudato eosinofílico intenso em torno a restos de vermes adultos e ovos dispersos.*

Ao exame anátomo-patológico dos animais infectados com ovos embrionados os fígados pesaram: no grupo I de 1,26 a 1,65 g ($\bar{x} = 1,46$ g); no grupo II de 0,85 a 1,58 g ($\bar{x} = 1,19$ g); no grupo III de 1,07 a 1,67 g ($\bar{x} = 1,30$ g); no grupo IV de 0,93 a 1,75 g ($\bar{x} = 1,30$ g). A variação não é estatisticamente significativa. A macroscopia os fígados exibiam pontilhado branco-amarelado, por vezes confluyente, distribuído pela superfície. Ao corte observou-se que o pontilhado

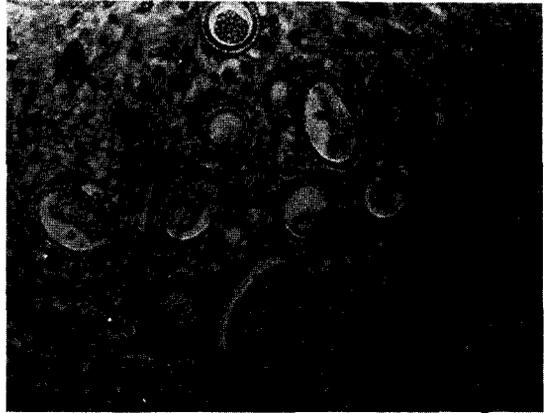


Figura 3 – *Granuloma com intensa fibrose em torno de ovos maduros.*



Figura 4 – *Reação inflamatória discreta em torno de verme aparentemente íntegro.*

Tabela 1 – *Número de ovos de Capillaria hepatica por fígado de camundongo, obtido através de digestão alcalina.*

	GRUPOS			
	I	II	III	IV
	1.056.000	948.000	1.042.000	997.000
	571.500	828.000	448.000	865.500
	1.212.000	348.000	77.500	48.500
	156.500	341.000	172.000	56.500
	375.000	752.000	346.500	634.500
	893.000	1.021.000	125.700	197.000
	679.500	837.000		563.000
		226.000		

M \pm DP* 706.214 \pm 375.012

662.625 \pm 363.834

368.616 \pm 358.511

480.285 \pm 385.632

* Média e Desvio Padrão

correspondia a diminutos nódulos, de consistência firme, cujo diâmetro variava de 0,02 cm, quando isolados, até 0,3 cm nas áreas de confluência. Os animais dos grupos V e VI não apresentaram alterações macroscópicas. O exame histopatológico evidenciou lesões hepáticas em vários estágios de desenvolvimento, não só em animais de diferentes grupos como entre animais de um mesmo grupo. Alguns dos animais exibiam parênquima hepático com exsudato eosinofílico intenso em torno a restos de vermes adultos e pouca ou nenhuma fibrose. Por outro lado, alguns apresentaram o fígado com granulomas bem desenvolvidos, em torno de ovos maduros, com fibrose intensa, não havendo restos de vermes. Em torno de vermes, aparentemente íntegros, a reação inflamatória era discreta ou inexistente com o tecido circundante bem preservado.

DISCUSSÃO

Como diversos autores demonstraram^{13 16 22}, o camundongo é muito suscetível à infecção por *Capillaria hepatica*. Mesmo com a utilização de apenas vinte ovos embrionados para a infecção todos os animais inoculados desenvolveram a doença.

A elevação dos níveis de IgG específica a partir da segunda semana de infecção, como ficou demonstrado, através do teste imunoenzimático, corresponde ao descrito por Solomon e colaboradores^{17 21} que utilizaram hemaglutinação indireta e por Galvão⁹ e Juliano¹⁰ que fizeram imunofluorescência indireta.

A não elevação dos níveis de IgG nos animais nos quais se fez infecções semanais com ovos não embrionados (grupo III) sugere que estas infecções repetidas possam levar a uma supressão temporária da resposta imune humoral neste grupo.

A queda do nível de anticorpos específicos do grupo I e II a partir da 4ª semana de infecção pode ser explicado da seguinte maneira: no caso do grupo II infectado com apenas uma dose de ovos não embrionados essa época correspondendo ao fim do estímulo antigênico; no caso do grupo I parece-nos ter ocorrido um aumento do consumo de anticorpos com diminuição dos níveis de IgG sérica, pois, neste caso, que é de infecção verdadeira, a quarta semana cursa com a necrose da maioria dos vermes, liberação de grande número de ovos e exacerbação da reação inflamatória tecidual.

É fácil observar-se que quarenta dias após a reinfecção houve uma retomada dos altos níveis de anticorpos nos grupos reinoculados com ovos embrionados.

O fato de não haver variação significativa entre o número de ovos recuperados dos fígados dos animais dos grupos I, II, III e IV mostra que as infecções espúrias não foram capazes de despertar uma resposta

imune a ponto de tornar os animais resistentes à infecção verdadeira. Por outro lado, o fato de animais do grupo I, que foram infectados duas vezes com ovos embrionados, não apresentarem uma maior quantidade de ovos no fígado, sugere que uma infecção verdadeira protege, pelo menos parcialmente contra uma infecção verdadeira posterior, o que está de acordo com os achados de Zahner e colaboradores²³.

As variações histopatológicas dos fígados infectados nos diversos animais, são semelhantes às encontradas no homem¹⁵.

A grande susceptibilidade do camundongo à capillariase o torna um bom modelo experimental para o estudo do desenvolvimento da patologia em si, mas não para a compreensão dos mecanismos de resistência à mesma, que, certamente, estão presentes na espécie humana.

Parece-nos que o homem possui uma resistência natural a esta doença que acometeria basicamente roedores, e que os casos relatados na espécie humana decorreriam de uma contaminação durante períodos de queda de imunidade. Para corroborar esta hipótese existe o fato de que quase todos os casos graves ocorreram em crianças com menos de cinco anos de idade^{3 4 14}, vivendo em péssimas condições sócio-econômicas ou em pacientes com alguma condição patológica concomitante como foi o caso relatado por Otto e colaboradores¹⁵.

É interessante notar que, nos casos apresentados por Slais¹⁹, os granulomas foram achados de necrópsia em indivíduos de meia-idade ou idosos que foram ao óbito por outras causas, e nos quais a *C. hepatica* estava limitada a nódulos únicos, geralmente calcificadas, observando-se apenas restos de vermes adultos, sem que houvesse desenvolvimento da doença.

SUMMARY

In order to evaluate a potential protective role of spurious infection on the development of capillaria, mice were infected with non-embryonated eggs (spurious infection) followed by inoculation with embryonated eggs (true infection). The humoral immune response was evaluated through enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that revealed a raise in anti-Capillaria hepatica IgG antibody two weeks after the first infection. Delayed type hypersensitivity test was consistently negative. Histopathologic examination and the C. hepatica egg burden from different groups didn't show any significant variation. The humoral immune response induced by spurious infection do not protect mice against a true infection.

Key words: *Capillaria hepatica. Capillariasis. ELISA in capillariasis.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cheever AW. A quantitative post-mortem study of schistosomiasis mansoni in man. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 17:38-64, 1968.
2. Chitwood BG. *Capillaria hepatica* from liver of *Castor canadensis canadensis*. Proceedings of the Helminthological Society of Washington 1:10, 1934.
3. Cochrane JC, Sagorin Z, Wilcocks MG. *Capillaria hepatica* infection in man. South African Medical Journal 31:751-755, 1957.
4. Ewing GM, Tilden IL. *Capillaria hepatica*: Report of fourth case of true human infestation. Journal of Pediatrics 48:341-348, 1956.
5. Farhang-Azad A. Ecology of *Capillaria hepatica* (Bancroft, 1893) (Nematoda). I. Dynamics of infection among norway rat population of the Baltimore zoo, Baltimore, Maryland. Journal of Parasitology, 63:117-122, 1977.
6. Foster AO, Johnson, CM. An explanation for the occurrence of *Capillaria hepatica* in human faeces suggested by the finding of three new hosts used as food. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 32: 639-644, 1939.
7. Freeman RS, Wright KA. Factors concerned with the epizootiology of *Capillaria hepatica* (Bancroft, 1893) (Nematoda) in a population of *Peromyscus maniculabes* in Algonquim Park, Canada. Journal of Parasitology 46: 373-382, 1960.
8. Galvão VA. *Capillaria hepatica*, estudo da incidência em ratos de Salvador, Bahia e dados imunopatológicos preliminares. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 10:333-338, 1976.
9. Galvão VA. Tentativa para detectar infecção por *Capillaria hepatica* no homem. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 21:231-236, 1979.
10. Juliano RV. Patologia geral dos granulomas. Um modelo de granuloma pulmonar produzido por ovos de *Capillaria hepatica* em camundongos. Tese de Mestrado. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 1980.
11. Lim BL, Yap LF, Krismansamy M. *Capillaria hepatica* infection of wild rodents in peninsular Malaysia. Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 8:354-358, 1977.
12. Lubinsky G, Jacobsen BR, Baron RN. Wildlife foci of *Capillaria hepatica* infections in Manitoba. Canadian Journal of Zoology 49: 1201-1202, 1971.
13. Luttermoser GW. An experimental study of *Capillaria hepatica* in the rat and the mouse. American Journal of Hygiene 27: 321-340, 1938.
14. MacQwown AL. *Capillaria hepatica*: report of genuine and spurious cases. American Journal of Tropical Medicine 30: 761-767, 1950.
15. Otto GF, Berthrong M, Appleby RE, Rawlins JC, Wilbur O. Eosinophilia and hepatomegaly due to *Capillaria hepatica* infection. Bulletin of the Johns Hopkins Hospital 94:319-336, 1954.
16. Raybourne RB, Solomon GB, Lousby EJJ. *Capillaria hepatica* granuloma formation to eggs. II. Peripheral immunological responses. Experimental Parasitology 36:244-253, 1974.
17. Raybourne RB, Solomon GB. *Capillaria hepatica*, granuloma formation to eggs. III. Anti-immunoglobulin augmentation and reagin activity in mice. Experimental Parasitology 38:87-95, 1975.
18. Santos MN, Barros CSL. *Capillaria hepatica*: parasitismo do cão e do gato no Estado do Rio Grande do Sul. Revista de Medicina Veterinária 9: 133-140, 1973.
19. Slais J. The finding and identification of solitary *Capillaria hepatica* (Bancroft, 1893) in man from Europe. Folia Parasitologica (Praha) 20: 149-161, 1973.
20. Solomon GB, Handley Jr. CO. *Capillaria hepatica* (Bancroft, 1893) in Appalachian mammals. Journal of Parasitology 57: 142-144, 1971.
21. Solomon GB, Raybourne RB, Soulsby EJJ. Serological studies on rodents infected with *Capillaria hepatica*. Journal of Parasitology 60:732-734, 1974.
22. Solomon GB, Soulsby EJJ. Granuloma formation to *Capillaria hepatica* eggs. I. Descriptive definition. Experimental Parasitology 33:458-467, 1973.
23. Zahner H, Geyer E., Schmidt H, Lammler G. Immunisierung gegen *Capillaria hepatica*. Die Wirkung von Erstinfektionen, roentgenattenuierten stadien, nicht embryonierten Eiern und loslichen Eixtrakten Zeitschrift für Parasitenkunde 64:17-28, 1980.