

MAURO BRAGA

EFEITOS DO EXTRATO TOTAL E FRAÇÃO POLISSACARÍ-  
DICA DE *Ascaris lumbricoides* SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO  
TECIDO DE GRANULAÇÃO

Tese apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba, da  
Universidade Estadual de Campi-  
nas, para obtenção do grau de  
Mestre em Biologia e Patologia  
Buco-Dental (Microbiologia e Imu-  
nologia).

PIRACICABA  
Estado de São Paulo - Brasil  
- 1983 -

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

À minha querida esposa SELMA, pela compreensão,  
incentivo e carinho transmitido a todo  
instante;

Aos meus filhos KELLE CRISTINA, MAURO e POLLYA  
NA, que representam para mim um pedaço  
de minha vida

dedico-lhes este trabalho

Aos meus pais MARIO e ESTELA, pelo amor e  
apoio, a minha gratidão.

Aos meus irmãos MARLENE, MARIA APARECIDA, MARISTELA,  
MARLI, JOSÉ HERMES, NATAL, ANTÔNIO, EMA-  
NUEL, MARIO e CÉLIA, pelo amor e compreensão  
que sempre nos uniu.

Ao Professor Doutor MARIO ROBERTO VIZIOLI, orientador e amigo, pela dedicação com que conduziu este trabalho,

o meu respeito e gratidão.

A G R A D E C I M E N T O S

ao Prof. Dr. LUIZ VALDRIGHI, DD. Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pela oportunidade oferecida na execução deste trabalho;

a Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu Magnífico Reitor JOSÉ ARISTODEMO PINOTTI, pela oportunidade oferecida na realização deste trabalho;

ao Prof. Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pelo companheirismo com que me distinguiu;

ao Prof. Dr. ANTONIO CARLOS FERRAZ CORRÊA e ao Prof. Dr. MOUSTAFA MOHAMMAD EL-GUINDY, pelo apoio e incentivo na realização desta pesquisa;

à Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas - EFOA - e ao Plano Institucional de Capacitação de Docentes (PICD), pelo apoio oferecido na execução deste trabalho;

ao DD. Diretor da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, Prof. Dr. VÍNIO BARBOSA TAMBURINI, pelo estímulo e apoio demonstrado na realização desta pesquisa;

ao Prof. Dr. EDUARDO ARAÚJO DOS SANTOS, DD. Chefe do Departamento da Área de Microbiologia e Parasitologia da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, pelo valoroso incentivo que me foi dispensado;

ao Prof. Dr. PEDRO BERTOLINI, responsável pela Área de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pelo incentivo e espírito de solidariedade com que sempre me distinguiu;

ao Prof. Dr. ALCIDES GUIMARÃES, pela amizade e companheirismo e pelo apoio oferecido na realização desta pesquisa;

ao Prof. Dr. LOURENÇO BOZZO, pelo valoroso incentivo na elaboração deste trabalho;

ao Prof. Dr. HÉLIO DE SOUZA, Ex-Diretor da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, pelo apoio científico no início de minha carreira no magistério;

aos Profs. Drs. ANTONIO SILVEIRA, NILO BERNARDES DA SILVA, VINICIO VIGNHOLI, MACIRO MANUEL PEREIRA, JOSÉ RONALDO e ANA MARIA, pelo apoio e estímulo dedicado a minha pessoa;

aos Colegas e Funcionários da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, pelo companheirismo;

aos Professores e Funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pela maneira hospitaleira e amigável com que fui acolhido na realização deste trabalho;

aos prezados colegas do Curso de Pós-Graduação, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, CLEUTON C. LANDRE, OLAVO BILAC DE CASTILHO e SELMO DE ÁVILA LIMA, pelo companheirismo e amizade dispensada;

ao Sr. ANTONIO KERCHES DE CAMPOS, Técnico de Laboratório da disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela colaboração nas partes técnicas;

ã SUELI DUARTE DE OLIVEIRA SOLIANI e MARIA APARECIDA NALIN, pela dedicação no decorrer do curso;

ã MARIA HELENA VASCONCELOS PERON, pelos serviços datilográficos prestados;

ã Sra. IVANY DO CARMO GUIDOLIN GEROLA, pela colaboração na re  
visão bibliográfica;

e a todos aqueles que colaboraram, direta ou indiretamente, na  
concretização deste trabalho,

o meu agradecimento.

## S U M Á R I O

	Pág.
I - INTRODUÇÃO .....	1
II - REVISTA DA LITERATURA .....	6
III - PROPOSIÇÃO .....	15
IV - MATERIAL E MÉTODOS .....	17
V - RESULTADOS .....	23
VI - DISCUSSÃO .....	38
VII - CONCLUSÕES .....	46
RESUMO .....	49
VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53



## I - INTRODUÇÃO

## I - INTRODUÇÃO

Os parasitas helmintos em geral, e os nematódios em particular, tem sido implicados em uma grande variedade de manifestações tóxicas em seres humanos há mais de 80 anos, segundo citado por LINSTOW (1896), GOLDSCHMIDT (1910), SAKAGUCHI (1928) e READ (1931).

O Ascaris lumbricoides, primeiramente descrito por LINNEU em 1758, é um parasita comumente encontrado em quase todos os países do mundo, infestando indivíduos de todas as raças e de todas as idades.

Entre nós, o Ascaris lumbricoides é popularmente conhecido por "lombriga", e causa a doença conhecida por ascaridíase ou ascaridiose. A ascaridíase é uma infecção do homem, caracterizada por uma fase precoce de transição no pulmão, migração larval e uma fase prolongada posterior, durante a qual os vermes adultos habitam a luz intestinal. Via de regra, existem no jejuno e íleo um número variável entre

4 a 10 vermes adultos; alguns relatos, no entanto, mostram que em casos extremos, foram encontradas até 600 larvas do parasita em uma única pessoa.

STOLL, em 1947, calculou que 30% da população mundial era parasitada pelo Ascaris lumbricoides, sendo que, na maioria dos casos, a infecção era leve e benigna, existindo casos outros, porém, em que um único verme podia apresentar graves problemas de natureza obstrutiva. Essa infecção é usualmente acompanhada por febre e leucocitose eosinofílica.

Investigações experimentais e clínicas levadas a efeito, modernamente, sobre o problema do Ascaris referem-se, na sua imensa maioria, aos aspectos imunológicos decorrentes da infecção originada pelas variedades lumbricoides e suum. Em animais de laboratório, estão sendo extensamente pesquisadas as diversas facetas da imunidade celular e da imunidade humoral.

Muitas, embora nem todas as manifestações imunológicas provocadas pelo Ascaris são encaradas hoje em dia, como resultado de uma hipersensibilidade mediada pela IgE, dirigida contra os antígenos do verme. Muitos dos sintomas encontrados durante a infestação pelos nematódios são considerados como consequências diretas da liberação de componentes tóxicos e, portanto, despidos de significância imunológica.

Algumas importantes questões foram levantadas por STREJAN (1978) acerca das consequências da infestação por Ascaris, das quais transcreve-se aqui duas especialmente concernentes a esta pesquisa:

1) As propriedades tóxicas e alergênicas do extrato de Ascaris lumbricoides são conferidas pelo mesmo ou

por componentes diferentes do dito extrato?

2) Qual é a significância biológica dos alérgenos em uma infestação por *Ascaris*?

Extensa revista da bibliografia moderna disponível pouco ou quase nada revelou sobre outros aspectos da infecção pelo *Ascaris*. Os trabalhos relacionados com o antígeno total do *Ascaris*, e com uma fração específica desse antígeno, de natureza polissacarídica, descrevem apenas as modificações hematológicas e séricas, imunológicas ou não, que foram observadas, dando pouco ou nenhum ênfase a outros tipos de experiências.

Dessa maneira, às indagações acima transcritas de STREJAN, pode-se agregar muitas outras. Seria o aspecto do desencadeamento de sintomas tais como irritação de membranas mucosas dos olhos, nariz e garganta, edema da face e dos olhos, tosse, secreções nasais, bronquiais, dores de cabeça, urticária, asma e eosinofilia, segundo descrito por WEINBERG & JULIEN (1911 e 1913) e RAMSON, HARRISON & COUCH (1924), fortemente sugestivas (como mais tarde se verificou) de reações de hipersensibilidade, os únicos efeitos da infestação?

O que ocorre na intimidade do tecido conjuntivo quando os antígenos do *Ascaris lumbricoides* são absorvidos? Haverá um eventual efeito patológico desses antígenos sobre o tecido conjuntivo? Em caso afirmativo, em que condições ele ocorreria?

Os mecanismos que regem a formação do tecido de reparação, no organismo animal, após injúrias teciduais tem sido extensamente estudados, conforme demonstram os trabalhos de MADEEN & PEACOCK (1968); ROSS (1968); Mc MINN &

PRITCHARD (1969); VIZIOLI, BOZZO & VALDRIGHI (1972); VIZIOLI (1973); BAZIN, PELLETIER & DELAUNAY (1973); COHEN, LEWIS & RESNICK (1975); VIZIOLI (1975); DELAUNAY & BAZIN (1975); BAZIN, LE LOUS & DELAUNAY (1976); VIZIOLI, BLUMEN & EL-GUINDY (1976); IM, FRESHWATER & HOOPEES (1976) e muitos outros.

Por outro lado, outros trabalhos procuraram investigar a ação dos mais diversos tipos de substâncias, principalmente medicamentos, sobre o tecido de granulação, entre os quais HEUGHAM & HUNT (1975); COHEN, LEWIS & RESNICK (1975); SCHILLING (1976); ANDRADE (1980) e MAIA (1981).

Com base nessas investigações, ocorre de pronto mais uma indagação que, salvo melhor juízo, até agora ainda não tem resposta: quais seriam as consequências, para um processo de reparação em desenvolvimento, da presença de antígenos do Ascaris lumbricoides? Teria um organismo parasita do por esse nematódio condições de promover um processo de reparação de feridas?

Obviamente, essas indagações necessitam de investigações várias para que se possa chegar às suas respostas. Esta pesquisa foi, portanto, orientada para procurar e lucidar alguns dos aspectos da interação entre Ascaris lumbricoides e processo de reparo.

## II - REVISTA DA LITERATURA

## II - REVISTA DA LITERATURA

Conforme já salientada na introdução deste trabalho, as pesquisas relativas ao Ascaris lumbricoides, modernamente, são em sua quase totalidade dedicadas aos aspectos imunológicos provocados pelo parasita (ou suas toxinas) no organismo dos seres vivos, seja por infestação direta, seja por procedimentos experimentais.

Procurou-se portanto, nesta compilação de trabalhos relativos ao Ascaris, dar-se ênfase aos aspectos que concernem aos efeitos dos seus antígenos.

Os fenômenos tóxicos que se seguem à administração de antígenos de Ascaris em animais de experiência foram estudados por SAKAGUCHI (1928) e READ (1931), que concluíram que esses fenômenos lembram muito de perto o choque anafilático.

BRUNNER (1934) utilizou vários tipos de antígenos, em seres humanos, e afirmou que apenas o antígeno to-

tal do Ascaris lumbricoides sensibilizou os indivíduos por administração parenteral, e induziu o aparecimento de anticorpos tipo IgE em pouco tempo.

CAMPBELL (1936) procurou fracionar o extrato cru de Ascaris e obteve uma fração altamente purificada de polissacarídeo livre de nitrogênio, e relatou que essa fração poderia sensibilizar animais de laboratório (cobaias) e até mesmo provocar um choque anafilático.

KERR (1938) realizou experimentos usando cobaias como hospedeiro, administrando ovos de Ascaris aos animais, com a finalidade de estudar uma possível imunidade adquirida. Verificou que doses únicas ou múltiplas, subletais, de ovos de Ascaris induziram uma certa resistência suficiente para permitir a sobrevivência da cobaia à infecção. A única indicação da presença de anticorpos humorais nas cobaias resistentes foi a inibição do crescimento das larvas e talvez a imobilização das mesmas. Refere o autor que o mecanismo da imunidade seria a estimulação da resposta celular nas cobaias resistentes devido a um anticorpo formado como resultado de infecção prévia.

Estudando os efeitos de um polissacarídeo isolado de Ascaris suum, OLIVER-GONZALES (1944), verificou que o mesmo tinha a propriedade de inibir a aglutinação de eritrócitos por soros humanos. Sugeriu que o polissacarídeo do Ascaris era idêntico ou intimamente relacionado a um antígeno comum a substâncias específicas dos grupos "A" e "B" do sangue humano. Sugeriu também que este ou algum outro polissacarídeo, que possa ser obtido em quantidade comparativamente grande possa ser usado para reduzir o conteúdo de aglutininas do sangue do grupo "O" de modo que este possa ser usa-



do mais seguramente em transfusões.

Em 1946, OLIVER-GONZALES, estudou os efeitos antigênicos dos helmintos em coelhos carentes de substâncias específicas do grupo "A" em seus eritrócitos. Alimentando es ses animais com ovos embrionados de A. lumbricoides, testou-se, posteriormente, os soros dos mesmos quanto ao seu conteúdo de isoaglutininas alfa 1, alfa 2, Beta, Anti "O" e também crioaglutininas. As isoaglutininas alfa 1, alfa 2, puderam ser absorvidas de soros por tratamento com cutícula seca pulverizada. As crioaglutininas para as células "A", "B" e "O" foram absorvidas tratando o soro com vários tecidos de Ascaris. A sensibilização ativa das cobaias, da forma descrita ou passiva com soro de coelho imunizado com material do verme adulto leva-os ao choque anafilático quando injetados intravenosamente com líquido celâmico, de intestino de Ascaris. Os extratos de outros tecidos não determinam o referido choque.

Estudando os sintomas clínicos de infecção por Ascaris lumbricoides em cobaias alimentadas com milhares de ovos, FALLIS (1948) verificou que tal infecção causou uma perda temporária no peso e uma severa congestão dos pulmões, mas não foi observada a elevação da temperatura. Uma eosinofilia foi associada com infecção e ela alcançou altos níveis após repetidas infecções. Injeções de antígenos causaram um aumento temporário no número de eosinófilos. As cobaias desenvolveram uma resistência como resultado da infecção. Uma resistência foi conservada pelo menos 15 semanas após a infecção. Uma leve resistência passiva resultou da infecção de grandes quantidades do soro e de extratos de fígado dos animais resistentes. A resistência foi aparente pela congestão e ainda

pelo número e peso das larvas encontradas nos pulmões. A eosinofilia por si só foi responsável pela resistência observada. Isso sugere que as defesas do corpo, nos animais resistentes, agem contra os parasitas antes que eles alcancem o fígado e mais especificamente antes que eles alcancem os pulmões.

KAILIN (1950), sensibilizou 243 seres humanos adultos com antígeno total de Ascaris lumbricoides, e sugeriu que anticorpos sensibilizantes tendem a aparecer mais rapidamente em homens do que em mulheres. A sensibilidade ao antígenos de Ascaris lumbricoides induzida artificialmente desapareceu em 79% de 33 pessoas testadas 2 anos após a sensibilização.

Fracionando quimicamente o extrato cru de Ascaris, SPRENT (1950) testou as frações proteica e polissacarídea resultantes, e relatou que, desde que os animais de experiência fossem previamente infeccionados com os vermes, ou sensibilizados com extrato solúvel, ambas as frações poderiam produzir um choque anafilático.

SOULSBY (1957) imunizou cobaias contra o Ascaris lumbricoides e verificou que a imunidade produzida em quase todos os casos era muito inferior àquela provocada pela infecção ativa. Referiu ainda, que a imunidade induzida experimentalmente, comparável àquela produzida pela infecção normal pode ser determinada se o tempo e o trajeto da fase migratória das larvas fossem alterados. Subseqüentes experimentos com vários antígenos mostraram que um extrato com solução salina de ovos desintegrados não infectantes e de excreção de larvas são as preparações mais potentes para estimular mecanismos imunitários de proteção.

HÖGBERG, THUFVESSON & ÖVNAS (1957) fracionaram o antígeno total (extrato cru) de *Ascaris* e obtiveram uma fração livre de proteínas que demonstrou ser capaz de degranular mastócitos do tecido conjuntivo, liberando portanto, histamina no local.

KENT (1960), analisando pela eletroforese o extrato aquoso de *Ascaris lumbricoides*, assinalou que existem pelo menos 6 grupos distintos de proteínas antigênicas, com comportamento imunológico distinto. Alguns desses antígenos têm elevado potencial para determinar a formação de anticorpos sensibilizantes e precipitantes.

A indução de reatividade cutânea imediata a um antígeno de *Ascaris* em indivíduos cancerosos e não cancerosos foi estudada por FISHERMAN (1962). Verificou o autor que essa reação, realmente pode ser determinada em pacientes atópicos em 2 a 4 semanas e em períodos mais longos em não cancerosos e não atópicos. Em pacientes cancerosos não sensíveis ao *Ascaris*, o aparecimento de reação cutânea imediata é lenta, podendo ser induzida depois de 8 a 24 semanas de imunização, segundo conclusões do autor.

Em 1974, BRADBURY infectou ratos com ovos embrionados de *Ascaris* e demonstrou que, após 7 dias, embora houvesse a presença de anticorpos no sangue dos animais, havia alterações patológicas significativas no fígado e nos pulmões dos animais. Estava assim demonstrado que a infecção com *Ascaris* pode causar mudanças patológicas nos tecidos.

Estudos imunológicos foram realizados em 6 pacientes que sofriam de migração de *Ascaris* para dentro da árvore biliar (TORISU, 1975). Esses estudos foram realizados antes e depois de exploração cirúrgica da árvore biliar, usando

do-se testes cutâneos, fixação do complemento e testes de hemaglutinação. Usando antígeno de Ascaris purificado, o teste cutâneo foi mais sensível: O nível de IgE do soro aumentou antes da operação em todos os 6 casos. Após a remoção do Ascaris migrado na cirurgia, o nível sérico de IgE desceu para a faixa normal dentro de um mês.

HERZIG (1974) descreveu a purificação e as propriedades de um antígeno de Ascaris suum que, segundo ele, causou um tipo de hipersensibilidade imediata em animais previamente sensibilizados com um outro tipo de nematóide, o Toxocara canis.

Trabalhando com o propósito de identificar os anticorpos produzidos em animais de laboratório pela administração de antígenos total de Ascaris, BRADBURY, PERCY & STREJAN (1974) identificaram como sendo constituídos de Imunoglobulina E.

A suspensão da resposta imune na infecção experimental de camundongos com ovos de Ascaris suum foi estudada em 1976, por CRANDALL & CRANDALL. Verificaram os autores que a introdução por intubação de 10 mil ovos de Ascaris e subsequente imunização com glóbulos vermelhos de carneiro determinavam uma redução maior de anticorpos hemaglutinantes do tipo IgE medidos após 4 dias da imunização e redução menor de IgE após 9 dias da imunização. A hipersensibilidade retardada foi inibida nos camundongos sensibilizados 10 dias após a infecção por Ascaris mas não nos sensibilizados depois de 21 ou 32 dias.

JANES (1977), através de testes de hemaglutinação, usando antígeno de Ascaris suum, realizados com soro de 810 habitantes Papua da Nova Guiné e Timor, verificou que,

nessas áreas, as crianças infectadas com elevado número de parasitas e ovos, tinham títulos sorológicos altos, assim permanecendo durante toda a vida.

Infeções secundárias de cobaias imunizadas com ovos de Ascaris suum permitiram que KHOURY & SOULSBY, em 1977, relatassem uma série de observações. Enfatizaram esses autores a natureza local da resposta imune na ascaridíase experimental, uma vez que a transformação de linfócitos e formação de rosetas ocorreram nos nódulos mesentéricos, hepáticos e mediastínicos quando a parasita estava localizada no intestino, fígado e pulmão, respectivamente. Os linfócitos dos nódulos mesentéricos, hepáticos e mediastínicos dos animais do grupo I, expressaram e/ou secretaram IgM, IgE, IgG<sub>2</sub>, ou IgA, antígenos específicos. As respostas IgM foram relativamente baixas ao passo que foram mais acentuadas com referência a IgG<sub>2</sub> e IgE nos nódulos hepáticos e mediastínicos, respectivamente. Respostas significativas em IgA foram detectadas apenas nos nódulos mesentéricos e mediastínicos. A resposta do baço foi predominantemente característica de IgG<sub>2</sub>; entretanto, células produtoras de IgE foram detectadas no 129 dia após a infecção.

Em 1977, KHOURY, STROMBERG & SOULSBY estudaram os mecanismos de imunidade em cobaias consanguíneas infectadas com injeções subcutâneas de ovos de Ascaris suum.

Observaram que preparações celulares e soro colhido desses animais foram capazes de transferir imunidade protetora em vários graus aos receptores. Proteção significativa com preparado de soro foi conseguida com IgG<sub>2</sub>, IgE mais IgG<sub>1</sub> e também soro imune.

A capacidade de extratos ou produtos de excre

ção e secreção de larvas adultas de Ascaris suum para produzir imunidade protetora, foi avaliada em trabalho realizado por STROMBERG & SOULSBY (1977). O extrato de larvas do 2º, 3º e 4º estágios foram incapazes de induzir proteção significativa ao passo que essa proteção foi induzida com extratos dos vermes adultos. Os produtos de excreção e secreção dos estágios larvares adultos não induzem proteção contra uma infecção provocada. Entretanto, larvas cultivadas do 3º para o 4º estágio produziram uma substância que foi capaz de induzir um significativo nível de proteção.

STREJAN (1978), em um extenso capítulo no livro "Immediate Hypersensitivity", estudou os alergen<sup>os</sup> do Ascaris e de outros nemat<sup>ó</sup>dios, e relatou detalhadamente as manifestações t<sup>ó</sup>xicas, as propriedades de degranulação de mast<sup>ó</sup>citos e a produção e detecção dos anticorpos tipo IgE.

Como se pode notar, apesar de extensamente pesquisados, os ant<sup>í</sup>genos de Ascaris não foram ainda relacionados à biologia do tecido de granulação e, consequentemente, ao processo de reparo.

III - PROPOSIÇÃO

### III - PROPOSIÇÃO

Até o presente, pelo que se depreende da observação da literatura disponível, em que pesem os muitos trabalhos realizados com o Ascaris lumbricoides, restam ainda diversos aspectos a serem investigados, entre eles a ação do citado nematódio, ou seus antígenos, sobre a biologia dos processos de reparo do organismo animal.

Com base nessa constatação, esta pesquisa foi orientada para a investigação dos seguintes pontos:

a) Estudar a ação direta do antígeno total e da fração antigênica polissacarídica do Ascaris lumbricoides sobre o desenvolvimento do tecido de granulação de rato provocado pela implantação sub-cutânea de esponja de policloro-vinil (PVC);

b) Estudar a ação sistêmica do antígeno total e da fração antigênica polissacarídica do Ascaris lumbricoides sobre o desenvolvimento do tecido de granulação de rato, nas mesmas condições de indução acima descritas.



#### IV - MATERIAL E MÉTODOS

#### IV - MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento desta pesquisa, foram selecionados 36 ratos machos, adultos (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar), com 120 dias de idade e pesando cerca de 190 g, em média. Durante todo o período experimental, os ratos foram alimentados com ração balanceada padrão e água "Ad Libitum".

##### 1. DIVISÃO EM GRUPOS

Os animais foram distribuídos ao acaso em 6 grupos, (Tab. I), da seguinte maneira:

GRUPO I - constituído de 6 animais que receberam diariamente 0,2 ml de solução salina (0,9%) intraperitonealmente. (Controle).

GRUPO II - constituído de 6 animais que receberam diariamente 0,2 ml de solução salina (0,9%) subcu-

tâneamente (controle), na periferia do implante.

GRUPO III - constituído de 6 animais que receberam diariamente 0,2 ml de solução de polissacarídeo extraído do antígeno total de Ascaris lumbricoides, intraperitonalmente.

GRUPO IV - constituído de 6 animais que receberam diariamente 0,2 ml de solução de polissacarídeo extraído do antígeno total de Ascaris lumbricoides, subcutâneamente, na periferia do implante.

GRUPO V - constituído de 6 animais que receberam diariamente 0,2 ml de solução de antígeno total de Ascaris lumbricoides, intraperitonalmente.

GRUPO VI - constituído de 6 animais que receberam diariamente 0,2 ml de solução de antígeno total de Ascaris lumbricoides, subcutâneamente, na periferia do implante.

TABELA I - Distribuição dos animais nos grupos experimentais e drogas que foram administradas.

GRUPO	Nº DE ANIMAIS	DROGA INJETADA INJEÇÃO DIÁRIA (0,2 ml)	LOCAL
I	06	Sol. fisiológica 0,9%	Intraperitonal
II	06	Sol. fisiológica 0,9%	Subcutânea
III	06	Sol.polis. Asc.lumb. 0,1%	Intraperitonal
IV	06	Sol.polis. Asc.lumb. 0,1%	Subcutânea
V	06	Sol.Ag.Total Asc.lumb. 0,1%	Intraperitonal
VI	06	Sol.Ag.Total Asc.lumb. 0,1%	Subcutânea

2. PREPARO DA SOLUÇÃO DE ANTÍGENO TOTAL DE Ascaris lumbricoides, SEGUNDO KAGAN e Cols. (1958)

- a) Obter as larvas ou vermes adultos de Ascaris lumbricoides, lavá-las em água corrente e em água destilada e triturá-las em gral com igual volume de NaCl a 0,85%;
- b) Autoclavar a mistura em 120 libras, durante 15 minutos, centrifugar e conservar o sobrenadante.

3. PREPARO DO POLISSACARÍDEO DE Ascaris lumbricoides, SEGUNDO KAGAN e Cols. (1958)

- 1) Autoclavar 156 cm<sup>3</sup> do homogeinizado de verme adulto em NaCl 0,90%, autoclavar a 120 libras por 15 minutos, centrifugar e obter o sobrenadante (55 cm<sup>3</sup>);
- 2) Ajustar o extrato para a concentração de 0,5 por cento de NaCl, adicionar cinco (5) volumes de etanol a 95% e deixar no refrigerador até o dia seguinte, ou seja, 55 ml do extrato mais 45 ml de água destilada mais 500 ml de etanol a 95%;
- 3) No dia seguinte centrifugar a dissolver o precipitado em NaCl a 0,90%, pH 6,8, centrifugar e colher o sobrenadante, precipitar novamente com cinco volumes de etanol a 95%;
- 4) Para dissolver usar 30 ml de NaCl a 0,90%, centrifugar a 2.000 r.p.m. 10' antes de acertar o pH 6,8 com KOH;
- 5) Repetir a precipitação do polissacarídeo como em (3) até que ele seja totalmente solúvel em NaCl 0,5% (cinco precipitações). Dissolver o polissacarídeo em água e liofilizar.

#### 4. IMPLANTAÇÃO DAS ESPONJAS

O material implantado foi esponja de policloro-  
rovinil (PVC). Fragmentos medindo 0,7 cm X 0,7 cm X 0,7 cm,  
devidamente esterilizados, foram implantados subcutâneamente  
nos animais, conforme técnica a seguir:

Após anestesia com éter etílico, e utilizando-  
se campânula de vidro, depilou-se a região dorsal mediana  
traseira dos lados direito e esquerdo dos animais. Praticou-  
se duas incisões de aproximadamente 2cm de comprimento, de  
cada lado ao longo eixo da coluna vertebral.

Em seguida, procedeu-se à divulsão dos teci-  
dos subcutâneos, por meio de uma tesoura de ponta romba, para  
favorecer a introdução da esponja tão longe quanto possível  
das incisões, evitando-se com esse procedimento que o proces-  
so de cicatrização das incisões atingisse o tecido de granu-  
lação em desenvolvimento.

Após acomodados os fragmentos de esponja, as  
incisões foram suturadas com fio de seda comum.

Toda a fase de implantação das esponjas foi  
conduzida dentro de adequado padrão de assepsia.

Nos animais dos grupos II, VI e IV, que rece-  
beram respectivamente, injeções subcutâneas de soro fisiolô-  
gico, solução de antígeno total de Ascaris lumbricoides e so-  
lução de polissacarídeo extraído de Ascaris lumbricoides, a  
aplicação foi feita a uma distância aproximada de 0,5cm da  
esponja implantada, a fim de se evitar traumatismo no local,  
o que também poderia interferir com a evolução do tecido de  
granulação.

## 5. SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Os animais de todos os grupos foram sacrificados pela inalação de éter etílico em dias previamente estabelecidos conforme Tabela II, abaixo.

TABELA II - Dias do sacrifício dos animais

DIAS GRUPOS	SACRIFÍCIO					
	3	6	9	12	15	18
I	1	1	1	1	1	1
II	1	1	1	1	1	1
III	1	1	1	1	1	1
IV	1	1	1	1	1	1
V	1	1	1	1	1	1
VI	1	1	1	1	1	1

Foram retirados os tecidos de granulação, lavados rapidamente em solução fisiológica, fixados em formol neutro a 10% durante 24 horas, à temperatura ambiente e incluídos em Parafina.

Em seguida foram obtidos cortes histológicos de 7  $\mu$ m de espessura e corados pelo método hematoxilina-eosina.

## 6. ANÁLISE HISTOLÓGICA

O exame histo-morfológico foi realizado em fotomicroscópio "ZEISS-POL", que também forneceu as fotomicrografias utilizadas para a documentação dos resultados.

V - RESULTADOS

## V - RESULTADOS

### I - TECIDO DE GRANULAÇÃO DE 3 DIAS

#### A) GRUPO CONTROLE

GRUPO I - Solução salina injetada no peritônio: aos 3 dias, notou-se apenas a formação de uma delgada cápsula fibrosa ao redor da esponja, contendo no seu interior espessa rêde de fibrina e esparsas células inflamatórias. Na face interna superior dessa cápsula fibrosa, alguns fibroblastos em proliferação, iniciando a formação de um tecido ainda bastante incipiente.

GRUPO II - Solução salina injetada na periferia do implante: não houve nenhuma modificação do aspecto tecidual, em tudo semelhante ao Grupo I (Fig. 1).

#### B) GRUPO POLISSACARÍDEO

GRUPO III - Polissacarídeo injetado no peritônio: sem



modificações em relação ao grupo controle.

GRUPO IV - Polissacarídeo injetado na periferia do implante: o tecido de granulação em desenvolvimento mostrou-se mais incipiente que o grupo de controle, mostrando ainda maior grau de inflamação (Fig. 2).

### C) GRUPO ANTÍGENO TOTAL

GRUPO V - Antígeno total injetado no peritônio: mesmo aspecto dos grupos-controle anteriores, sem modificações.

GRUPO VI - Antígeno total injetado na periferia do implante: também neste grupo o tecido de 3 dias tem aspecto igual aos demais grupos-controle.

## II - TECIDOS DE GRANULAÇÃO DE 6 DIAS

### A) GRUPO CONTROLE

GRUPO I - Solução salina injetada no peritônio: o tecido de granulação em desenvolvimento no interior da esponja, a partir das paredes da cápsula fibrosa, exibe uma grande população de fibroblastos jovens, bem como ativa neoformação de capilares. A esta altura, o tecido se expande da periferia para o centro da esponja. Permanece nos espaços ainda ocupados pela esponja, a rede de fibrina, com quase total desaparecimento dos polimorfonucleares.

GRUPO II - Solução salina injetada na periferia do implante: não houve modificações do quadro histopatológico neste subgrupo em comparação com o anterior (Fig. 3).

## B) GRUPO POLISSACARÍDEO

GRUPO III - Polissacarídeo injetado no peritônio: o tecido de granulação em desenvolvimento mostrou aspecto semelhante ao subgrupo controle, não havendo nenhuma modificação digna de nota.

GRUPO IV - Polissacarídeo injetado na periferia do implante: o tecido de granulação mostrou-se menos desenvolvido, comparado ao subgrupo controle, com menor n<sup>o</sup> de fibroblastos e capilares neo-formados. Notou-se também a persistência de infiltrado inflamatório, tanto na intimidade do tecido quanto nos espaços entre os poros da esponja. No todo, o volume do tecido é menor que o subgrupo padrão (Fig. 4).

## C) GRUPO ANTÍGENO TOTAL

GRUPO V - Antígeno total injetado no peritônio: também neste subgrupo, o padrão de desenvolvimento do tecido de granulação não mostrou alterações em relação ao controle.

GRUPO VI - Antígeno total injetado na periferia do implante: aspecto tecidual semelhante ao subgrupo controle.

## III - TECIDOS DE GRANULAÇÃO DE 9 DIAS

### A) GRUPO CONTROLE

GRUPO I - Solução salina injetada no peritônio: o tecido de granulação, em ativo desenvolvimento, apresenta ainda muitos fibroblastos em proliferação, vasos neo-formados em franca atividade, e evidências de fibrosamento organizado. O tecido avançou sensivelmente

para o centro da esponja.

GRUPO II - Solução salina injetada na periferia do implante: o aspecto do tecido de granulação em desenvolvimento, neste subgrupo, segue o mesmo padrão de desenvolvimento do subgrupo anterior, apresentando as mesmas características (Fig. 5 ).

#### B) GRUPO POLISSACARÍDEO

GRUPO III - Polissacarídeo injetado no peritônio: o tecido de granulação, neste subgrupo, mostrou-se semelhante ao tecido do controle correspondente.

GRUPO IV - Polissacarídeo injetado na periferia do implante: o desenvolvimento do tecido de granulação deste subgrupo mostrou-se bastante atrasado em relação ao correspondente do grupo controle, tanto em qualidade (tecido mais celular, menos fibrosado, contendo ainda polimorfonucleares em número considerável), como em quantidade (menor volume de tecido). Estes aspectos podem ser observados na figura 6.

#### C) GRUPO ANTÍGENO TOTAL

GRUPO V - Antígeno total injetado no peritônio: também neste subgrupo, o aspecto do tecido de granulação foi semelhante ao padrão do controle correspondente.

GRUPO VI - Antígeno total injetado na periferia do implante: não houve nenhuma diferença, no padrão de desenvolvimento, em relação ao controle correspondente.

#### IV - TECIDOS DE GRANULAÇÃO DE 12 DIAS

##### A) GRUPO CONTROLE

GRUPO I - Solução salina injetada no peritônio: o tecido de granulação, aos 12 dias de desenvolvimento, mostrou-se bem fibrosado, com o número de fibroblastos diminuindo bastante. Existiu um preenchimento quase total dos espaços da esponja pelo tecido de granulação.

GRUPO II - Solução salina injetada na periferia do implante: o tecido em desenvolvimento seguiu o mesmo padrão apresentado pelo subgrupo anterior (Fig. 7).

##### B) GRUPO POLISSACARÍDEO

GRUPO III - Polissacarídeo injetado no peritônio: neste subgrupo, o aspecto do tecido de granulação foi semelhante ao subgrupo controle correspondente.

GRUPO IV - Polissacarídeo injetado na periferia do implante: o tecido de granulação, neste subgrupo, exibiu um padrão bastante atrasado, tanto qualitativa quanto quantitativamente, em relação ao subgrupo controle correspondente. O tecido está longe de preencher os espaços da esponja, como se nota pela figura 8.

##### C) GRUPO ANTÍGENO TOTAL

GRUPO V - Antígeno total injetado no peritônio: também semelhante ao controle.

GRUPO VI - Antígeno total injetado na periferia do implante: nenhuma alteração no aspecto do te-

cido de granulação, semelhante ao subgrupo controle correspondente.

## V - TECIDOS DE GRANULAÇÃO DE 15 DIAS

### A) GRUPO CONTROLE

GRUPO I - Solução salina injetada no peritônio: o tecido de granulação de 15 dias mostrou evidente fibrosamento, com a conseqüente redução do número de fibroblastos, e ativa rede de capilares; estes aspectos indicam um estágio de organização e maturação do tecido próximo de se completar. Este tecido preencheu quase totalmente os espaços da esponja.

GRUPO II - Solução salina injetada na periferia do implante: mesmo aspecto descrito para o subgrupo anterior (Fig. 9).

### B) GRUPO POLISSACARÍDEO

GRUPO III - Polissacarídeo injetado no peritônio: neste subgrupo, o aspecto exibido pelo tecido de granulação é semelhante ao subgrupo controle.

GRUPO IV - Polissacarídeo injetado na periferia do implante: o tecido de granulação deste subgrupo manteve-se atrasado em seu desenvolvimento, quando comparado ao subgrupo controle correspondente, mostrando-se menos fibrosado, e exibindo células polimorfonucleares em vários locais do tecido. Também o volume do tecido é menor que o controle (Fig. 10).

### C) GRUPO ANTÍGENO TOTAL

GRUPO V - Antígeno total injetado no peritônio: mesmo aspecto do tecido do subgrupo controle.

GRUPO VI - Antígeno total injetado na periferia do implante: tecido de granulação semelhante ao tecido do subgrupo controle.

## VI - TECIDOS DE GRANULAÇÃO DE 18 DIAS

### A) GRUPO CONTROLE

GRUPO I - Solução salina injetada no peritônio: o tecido de granulação exibiu aspecto bem fibrosado, maduro, preenchendo totalmente os espaços da esponja.

GRUPO II - Solução salina injetada na periferia do implante: o tecido de granulação deste subgrupo exibiu o mesmo padrão do subgrupo anterior (Fig. 11).

### B) GRUPO POLISSACARÍDEO

GRUPO III - Polissacarídeo injetado no peritônio: o tecido de granulação seguiu o mesmo padrão do tecido de controle correspondente.

GRUPO IV - Polissacarídeo injetado na periferia do implante: o tecido de granulação, neste subgrupo, mostrou-se menos fibroso que o controle correspondente, com aspecto ainda imaturo, sem preencher totalmente os espaços da esponja. Notou-se ainda restos inflamatórios no interior do tecido (Fig. 12).

### C) GRUPO ANTÍGENO TOTAL

GRUPO V - Antígeno total injetado no peritônio: o te-

cido de granulação mostrou desenvolvimento semelhante ao exibido pelo subgrupo de controle correspondente.

GRUPO VI - Antígeno total injetado na periferia do implante: o padrão de desenvolvimento do tecido de granulação deste subgrupo foi idêntico ao do subgrupo de controle correspondente.

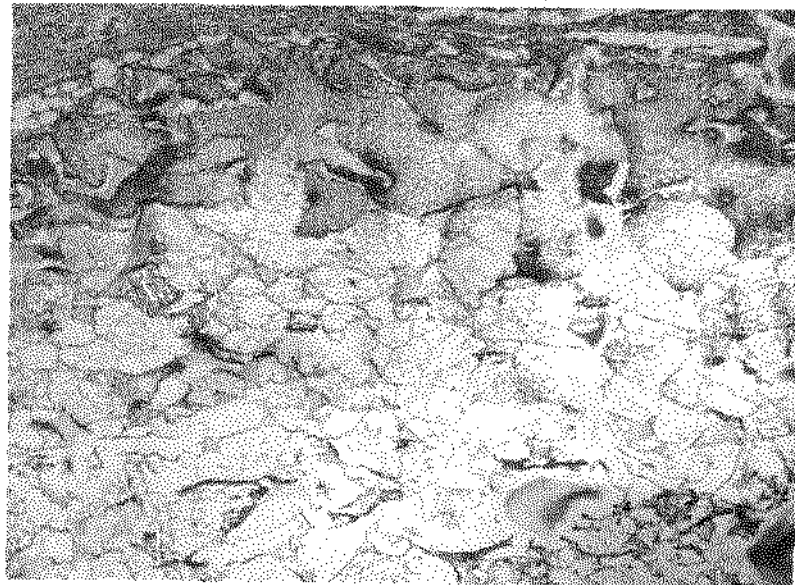


FIG. 1 - Grupo controle, 3 dias, solução salina injetada na periferia do implante: tecido de granulação em formação, ainda incipiente, formando-se a partir da cápsula fibrosa envolvente. HE., aumento original 12X.

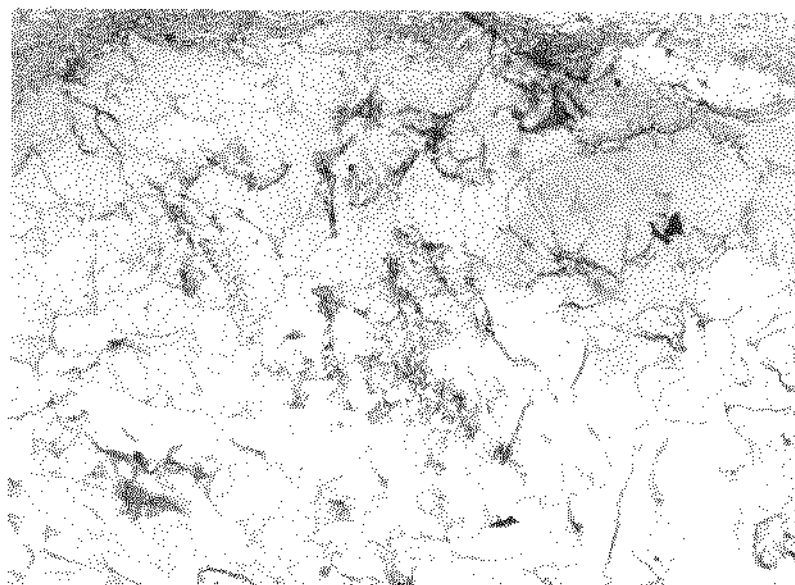


FIG. 2 - Grupo polissacarídeo, 3 dias, polissacarídeo injetado na periferia do implante: tecido de granulação em evidente atraso de desenvolvimento em relação ao grupo controle, observando-se a quase completa falta de proliferação do tecido. HE., aumento original 12X.



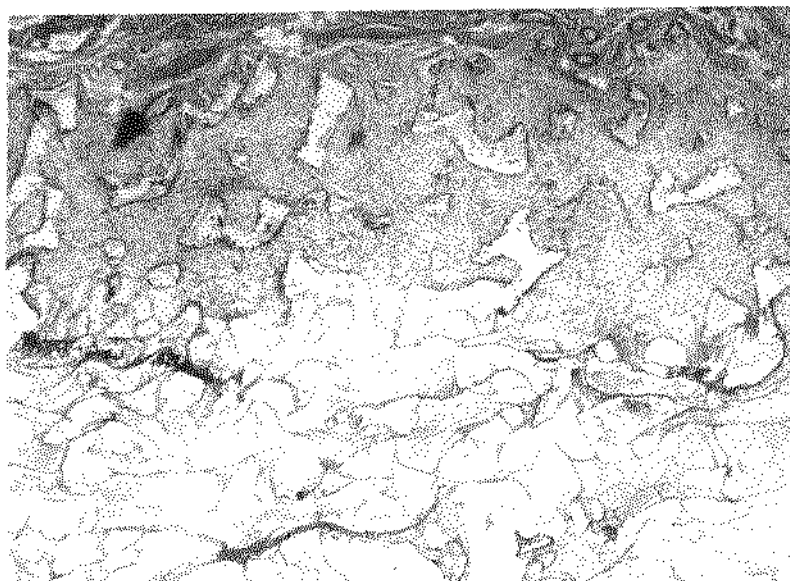


FIG. 3 - Grupo controle, 6 dias, solução salina injetada na periferia do implante: o tecido de granulação evolui normalmente através dos poros, caminhando para o centro da esponja. HE , aumento original 12X.

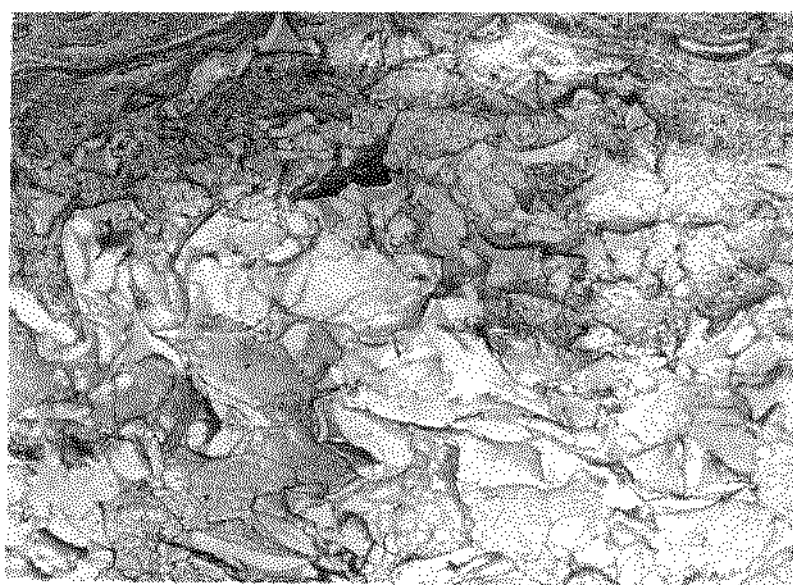


FIG. 4 - Grupo polissacarídeo, 6 dias, polissacarídeo injetado na periferia do implante: tecido em formação bastante retardada, inferior até mesmo ao desenvolvimento do grupo controle aos 3 dias. HE, aumento original 12X.

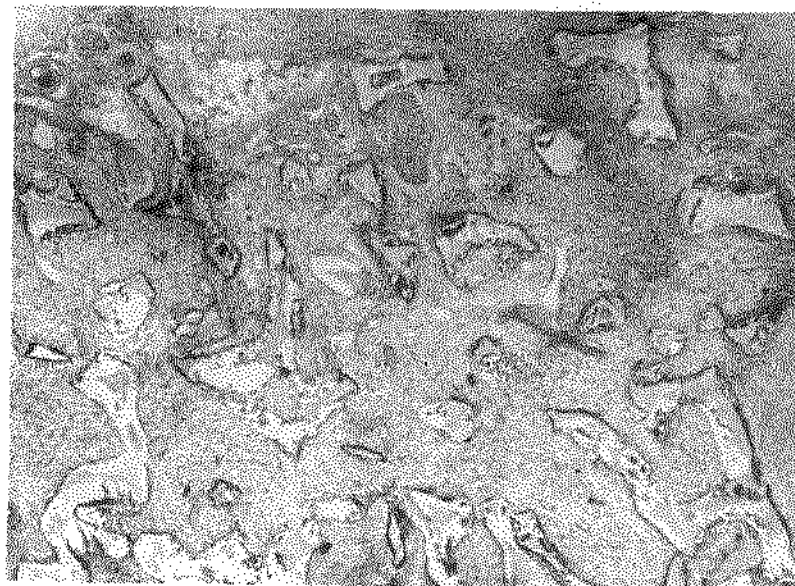


FIG. 5 - Grupo controle, 9 dias, solução salina injetada na periferia do implante: o tecido, em franco desenvolvimento, ocupa quase completamente os espaços da esponja. HE., aumento original 12X.

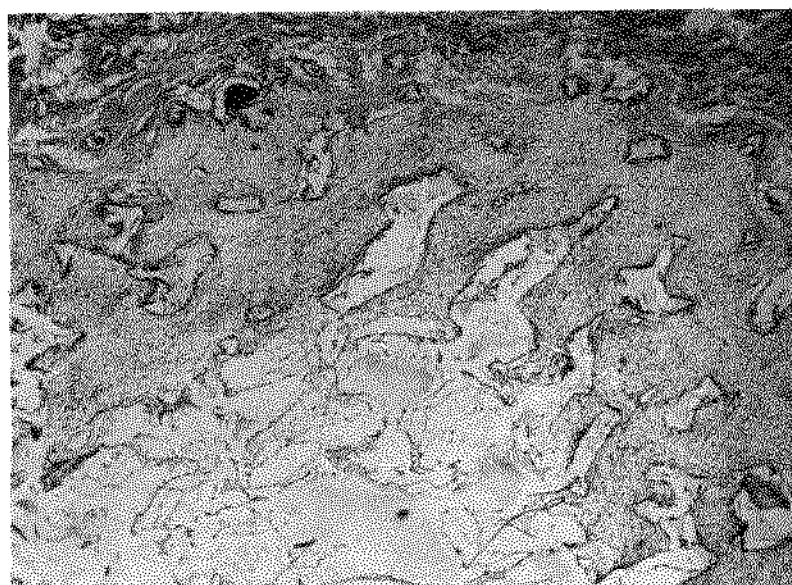


FIG. 6 - Grupo polissacarídeo, 9 dias, injetado na periferia do implante: continua evidente o atraso da evolução do tecido, observando-se ainda sinais evidentes de inflamação na cápsula fibrosa e também no tecido. HE., aumento original 12X.

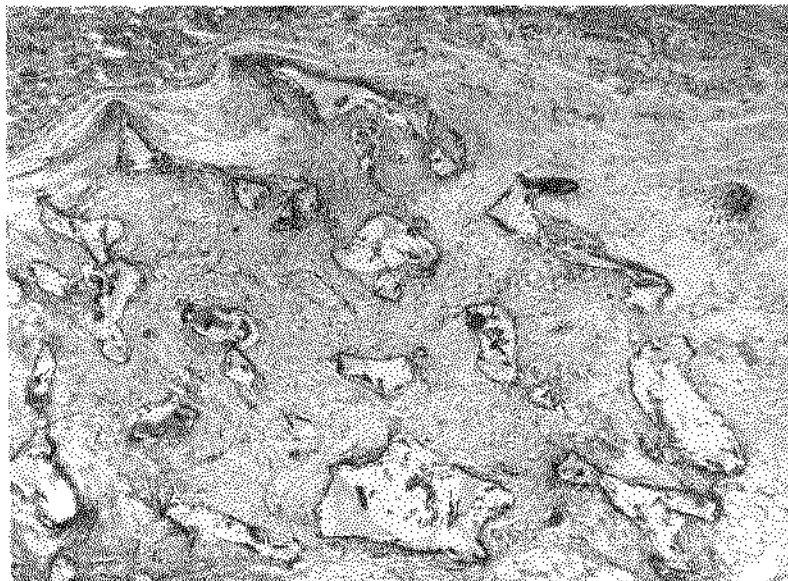


FIG. 7 - Grupo controle, 12 dias, solução salina injetada na periferia do implante: tecido de granulação em fase de fibrosamento, com diminuição do número de células. Todos os espaços de esponja se encontram preenchidos. HE., aumento original 12X.

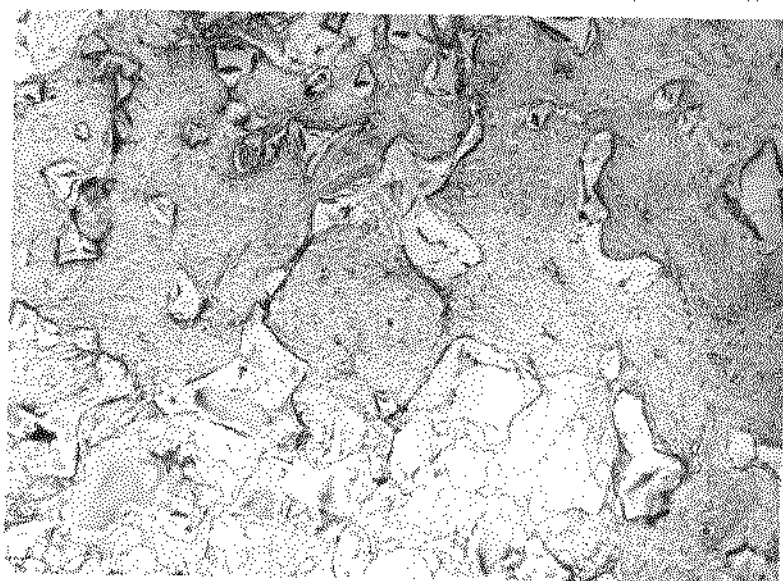


FIG. 8 - Grupo polissacarídeo, 12 dias, injetado na periferia do implante: padrão tecidual retardado, tanto qualitativa quanto quantitativamente, em relação ao grupo controle correspondente. Resta ainda muito espaço da esponja a ser preenchido. HE., aumento original 12X.

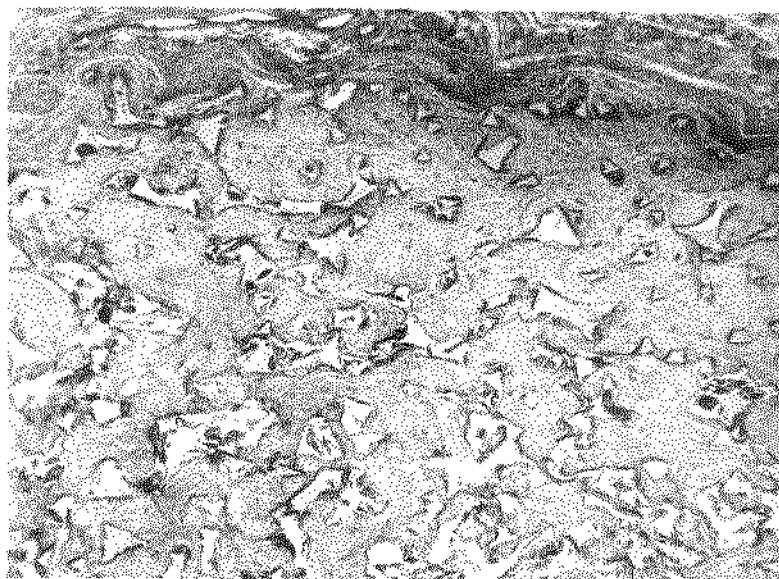


FIG. 9 - Grupo controle, 15 dias, solução salina injetada na periferia da esponja: tecido de granulação totalmente desenvolvido, fibrosado, em fase final de maturação. HE., aumento original 12X.

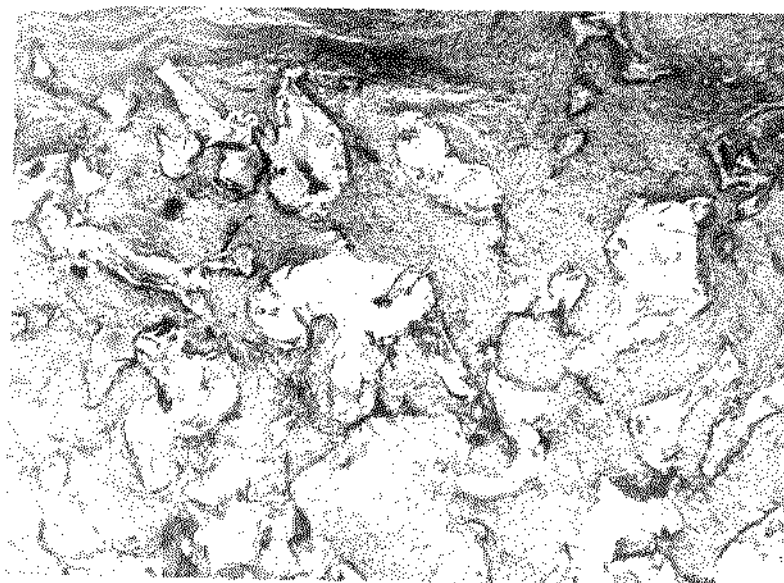


FIG. 10 - Grupo polissacarídeo, 15 dias, injetado na periferia da esponja: padrão atrasado em relação ao controle, com espaços ainda a preencher, espaços esses ainda ocupado por células inflamatórias. HE., aumento original 12X.

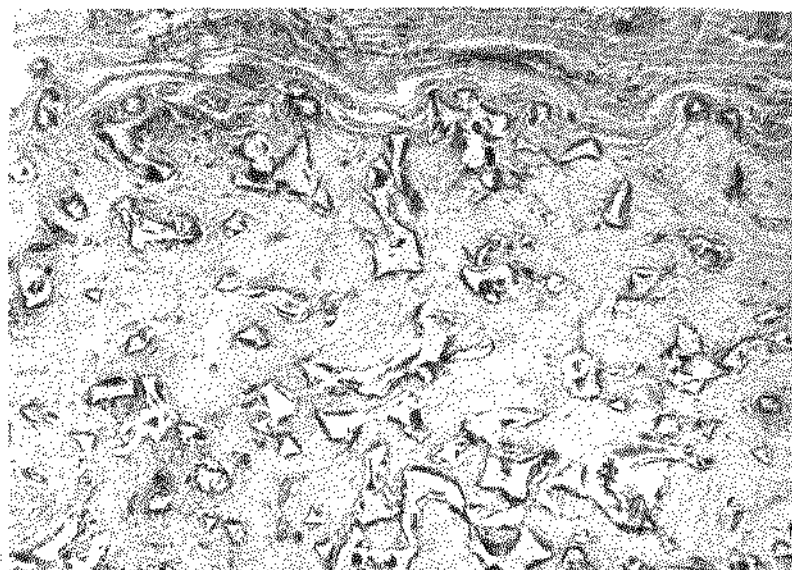


FIG. 11 - Grupo controle, 18 dias, solução salina injetada na periferia da esponja: tecido de granulação organizado, bem fibrosado, com todos os espaços de esponja preenchidos. HE., aumento original 12X.

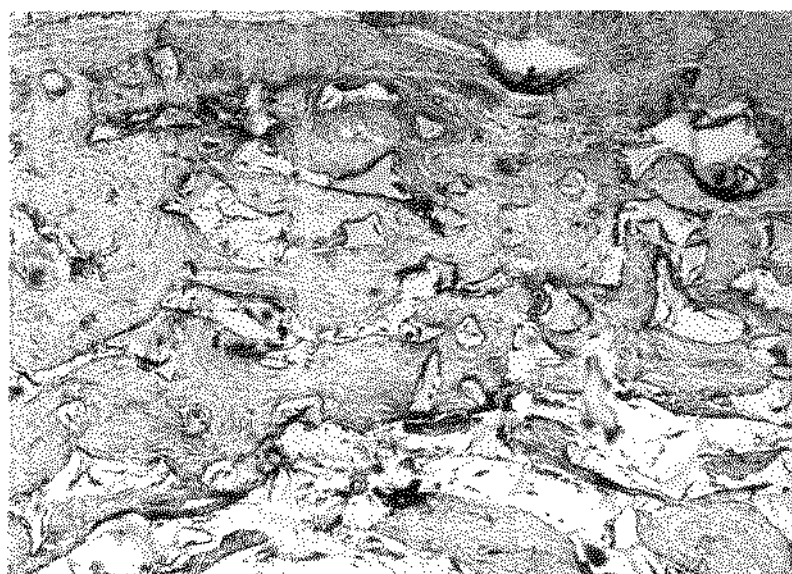


FIG. 12 - Grupo polissacarídeo, 18 dias, injetado na periferia da esponja: tecido de granulação em evolução retardada, quando comparado ao controle. Restam ainda espaços a preencher, e persistem neles, ainda, discreto infiltrado inflamatório. HE., aumento original 12X.

## VI - DISCUSSÃO



## VI - DISCUSSÃO

Muitos autores descreveram fenômenos tóxicos que se seguem à administração de extratos de *Ascaris* em animais de experiência e mesmo em seres humanos, e, na maioria das vezes, os efeitos tóxicos se assemelham ao choque anafilático.

Em alguns casos, entretanto, essas manifestações tiveram lugar em animais que nunca haviam sido infectados (SAKAGUCHI, 1928; READ, 1931), o que não sucedeu na presente pesquisa, pois nenhum animal dos diferentes grupos estudados demonstrou características indicativas de ter sofrido algum problema sistêmico. Isso pode, talvez, dever-se ao fato de que, o tipo de infecção provocado pelos autores acima citados, foi conseguido através de altas quantidades de vermes vivos e ativos, fato que não ocorreu nesta pesquisa.

Uma observação cuidadosa dos resultados obtidos através do exame microscópico dos tecidos de granulação do grupo considerado controle apenas confirmou aquilo que já

era de se esperar, ou seja, a progressiva formação dos tecidos de granulação segundo um padrão anteriormente estabelecido através dos trabalhos de ROSS (1968); Mc MINN & PRITCHARD (1969); VIZIOLI (1975); DELAUNAY & BAZIN (1975); IM, FRESH-WATER & HOOPES (1976), entre outros. O tecido de granulação, nestas condições, atinge sua maturidade num espaço de tempo variável entre 18 e 21 dias (VIZIOLI, 1973), o que foi plenamente confirmado nesta pesquisa. Conforme se pode observar, o tecido de granulação não foi afetado pela solução fisiológica usada no grupo controle, nem mesmo quando esta solução salina foi injetada diretamente no local de desenvolvimento do tecido.

Entretanto, a ação do polissacarídeo isolado do antígeno total de Ascaris lumbricoides mostrou possuir efeito de retardamento sobre a evolução do tecido de granulação, fato comprovado desde as primeiras observações aos 3 dias de desenvolvimento, quando injetado diretamente na periferia da esponja. Além disso, as células inflamatórias, principalmente polimorfonucleares em grande número, indicaram claramente que o polissacarídeo agiu sobre o tecido como um poderoso agente irritante, o que deve também ser levado em consideração quando se considera o efeito observado nestas condições.

É interessante observar-se que a ação do polissacarídeo injetado diretamente na periferia da esponja continuou, nos demais dias, a interferir na evolução do tecido de granulação, em relação ao grupo controle, de uma maneira bem acentuada, além de contribuir para a permanência de um infiltrado de células polimorfonucleares indicativas de uma inflamação aguda, infiltrado esse observado entre os po-



ros da esponja, que é um local de circulação de exsudatos do tecido, além de persistir no tecido em desenvolvimento. Este quadro faz supor que o polissacarídeo seja realmente o responsável por tais reações.

Uma das primeiras referências encontradas na literatura sobre a ação experimental de um polissacarídeo an tigênico de Ascaris é aquela de OLIVER-GONZALES (1944); no entanto, neste trabalho, o autor afirma que o polissacarídeo tem a propriedade de inibir a aglutinação de eritrócitos do sangue, não fazendo referência a outros efeitos quaisquer. Desta maneira, não se pode, evidentemente, comparar tais resultados.

No entanto, alguns anos mais tarde, novas pesquisas vieram lançar alguma luz sobre o problema. HÖGBERG, THUFVESSON & ÜVNAS (1957), em um estudo sobre substâncias capazes de liberar histamina dos tecidos, fracionaram o extrato cru de Ascaris, e obtiveram uma fração livre de proteínas, bastante semelhante ao polissacarídeo, que demonstrou ter grande capacidade de degranular mastócitos (por volta de 90% de células degranuladas), liberando, portanto, grande quantidade de histamina para os tecidos, o que, como é sabido, produz a fase exsudativo-vascular ou aguda da inflamação, cuja característica principal é o acúmulo de polimorfonucleares, além de edema e destruição tecidual. Essa ação poderia explicar convenientemente o efeito inflamatório e de retardamento da evolução do tecido provocados pelo polissacarídeo injetado no local do implante.

Desta maneira, o polissacarídeo teria um efeito irritante local, degranulando grande quantidade de mastócitos, produzindo o quadro de inflamação aguda e retardando,

porisso mesmo, o desenvolvimento do tecido.

Outra hipótese que se poderia aventar seria a quela de se presumir que o polissacarídeo injetado localmente interferiria, de algum modo, com a síntese de proteínas no tecido de granulação, retardando a sua proliferação e maturidade, como agem, por exemplo, os corticosteróides no tecido de granulação, conforme comprovado por ANDRADE (1980). No entanto, por falta absoluta de elementos de comprovação, esta hipótese permanece como simples e remota possibilidade, a ser investigada futuramente.

Para finalizar a discussão sobre este grupo, é importante ressaltar que é comum, neste tipo de experiência, que uma substância estranha injetada pela primeira vez no tecido subcutâneo de animais de laboratório sensibilize o organismo deste animal de tal modo que, na injeção subsequente, dependendo do grau de sensibilização do animal, ocorra uma reação hiperimune conhecida como "fenômeno de Arthus", um tipo de anafilaxia local. Um trabalho relativamente recente de HERZIG (1974) descreveu a purificação e as propriedades de um alérgeno de Ascaris suum que causa um tipo de hipersensibilidade imediata, com este tipo de reação, em animais previamente sensibilizados com um nematóide relacionado ao Ascaris (*Toxocara canis*).

Como não houve nenhuma reação de hipersensibilidade local nos animais do grupo em discussão, poder-se-ia inferir que o polissacarídeo injetado localmente não sensibilizou o organismo dos animais a ponto de provocar uma reação hiperérgica. Isto reforçaria a hipótese de que o polissacarídeo agiu apenas como um agente irritante local, e não como um alérgeno, pelo menos nas condições da presente pesquisa.

Em relação ao grupo de animais que recebeu injeções do polissacarídeo por via intraperitonal, conforme se viu, não houve nenhuma modificação na evolução do tecido de granulação durante todo o período experimental, desenvolvendo-se o tecido de maneira semelhante ao grupo controle.

Também não se observou nenhum tipo de choque anafilático nos animais em experiência, conforme se poderia esperar, levando-se em conta que CAMPBELL (1936) obteve uma fração altamente purificada de polissacarídeo livre de nitrogênio de extrato cru de *Ascaris*, a qual, em doses de 10 microgramas, poderia sensibilizar cobaias e provocar um choque anafilático. Entretanto, como ponderou STREJAN (1978), em razão da natureza extremamente complexa da fração de polissacarídeo isolada, e do modelo animal usado por CAMPBELL, a significância dos resultados com respeito à hipersensibilidade relatada é extremamente questionável.

SPRENT (1950), fracionando quimicamente extrato cru de *Ascaris*, testou as frações proteica e polissacarídica resultantes, e chegou à conclusão que ambas as frações poderiam estar envolvidas na produção de choque anafilático. No entanto, uma condição para que isso sucedesse, seria a de que os animais fossem previamente infestados com nematódios ou sensibilizados com vários extratos solúveis, o que não foi feito na presente pesquisa.

Quanto ao antígeno total, os resultados indicaram que não houve nenhuma interferência desta substância com o desenvolvimento do tecido de granulação, em nenhum período de tempo observado e em ambos os tipos de administração, tanto localmente quanto por via intraperitonal.

Segundo STREJAN (1978), é óbvio que o antíge-

no total, ou extrato cru de *Ascaris*, é uma mistura complexa de componentes altamente heterogêneos, com um espectro muito amplo de propriedades físico-químicas. Isto foi demonstrado por experiências em coelhos que, quando imunizados com antígeno total em CFA (adjuvante completo de Freund) produziram anticorpos (precipitinas) que foram usados em imunoeletroforese contra o antígeno total. Tornou-se evidente nesta experiência, e em outras semelhantes, que um número bastante grande de componentes antigênicos são detectados pelo antisoro do animal, e que os antígenos ocupam totalmente o espectro eletroforético.

BRUNNER (1934), trabalhando com seres humanos, utilizou vários tipos de antígenos, tais como epitélio de coelho, proteínas de soro de gato, ovos de *Ascaris* e antígeno total de *Ascaris*. A sensibilização a todas as proteínas - com exceção do antígeno total - não foi conseguida por administração parenteral. Por outro lado, o antígeno total de *Ascaris* induziu ao aparecimento de anticorpos tipo IgE em pouco tempo.

Resultados que comprovam a produção de anticorpos tipo IgE contra o antígeno total de *Ascaris* foram também obtidos por SOULSBY (1957), e BRADBURY, PERCY & STREJAN (1974).

Assim, é possível que a administração do antígeno total de *Ascaris* não tenha causado maiores problemas ao desenvolvimento do tecido de granulação, tanto local quanto intraperitonealmente, porque o antígeno pode ter tido sua ação (qualquer que fosse ela) bloqueada pelos anticorpos reativos produzidos pelos animais.

No entanto, uma hipótese mais provável, basea

da em conceitos já estabelecidos em Imunologia, levaria à suposição de que, como a dosagem do antígeno total aplicado aos animais da experiência não foi muito grande, e a concêntração do antígeno total foi comparativamente pequena, seria muito lógico que a administração diária do antígeno total tivesse provocado uma reação de tolerância no organismo dos ratos, não havendo, portanto, maiores problemas quanto ao desenvolvimento do tecido de granulação. Nestas condições, pode-se sugerir que esta pesquisa tenha continuidade com doses crescentes de antígenos, a fim de se obter maiores subsídios sobre o problema.

## VII - CONCLUSÕES

## VII - CONCLUSÕES

Tendo em vista a discussão dos resultados obtidos, e dentro das condições experimentais da presente pesquisa, pode-se concluir que:

1) A presença do polissacarídeo extraído do antígeno total de Ascaris lumbricoides no local de desenvolvimento do tecido de granulação agiu como irritante local, produzindo um processo inflamatório e atrasando o desenvolvimento do tecido de granulação;

2) Esse efeito de interferência com a evolução normal do tecido de granulação produzido pelo polissacarídeo injetado localmente, provavelmente foi devido a uma de granulação de mastócitos da área do implante, com o consequente desencadeamento de um processo inflamatório;

3) O polissacarídeo extraído do antígeno total de Ascaris lumbricoides, quando administrado por via in-

traperitoneal não teve nenhuma interferência com o desenvolvimento do tecido de granulação;

4) O antígeno total do Ascaris lumbricoides não produziu nenhum efeito sobre o desenvolvimento do tecido de granulação, tanto por via local quanto por via sistêmica, provavelmente por ter provocado uma reação de tolerância nos animais, em virtude da baixa concentração utilizada nas experiências.



RESUMO

## RESUMO

O presente trabalho teve como finalidade investigar os efeitos do antígeno total e de sua fração polisacarídica, obtidos a partir do Ascaris lumbricoides, sobre o desenvolvimento do tecido de granulação, a fim de relacionar o citado parasita e uma eventual ação de suas toxinas sobre o processo de reparação do organismo animal.

Em ratos albinos da raça Wistar foram implantados subcutâneamente esponjas de policlorovinil (PVC), sendo estes posteriormente divididos em 6 grupos, como segue:

GRUPO I - 6 animais que receberam 0,2 ml de solução salina fisiológica por dia, através da via intraperitoneal;

GRUPO II - 6 animais que receberam 0,2 ml de solução salina fisiológica subcutâneamente, na periferia do implante, também diariamente;

Bc/5047

GRUPO III - 6 ratos que receberam diariamente 0,2 ml de solução de polissacarídeo extraído do antígeno total de *Ascaris*, por via intraperitoneal;

GRUPO IV - 6 animais que receberam diariamente 0,2 ml de solução de polissacarídeo extraído do antígeno total de *Ascaris*, por via subcutânea, na periferia do implante;

GRUPO V - 6 ratos que receberam 0,2 ml de solução de antígeno total de *Ascaris* por dia, através da via intraperitoneal;

GRUPO VI - 6 ratos que receberam diariamente 0,2 ml de solução de antígeno total de *Ascaris* subcutaneamente, na periferia do implante.

Os animais dos Grupos I e II foram considerados como controle. Os ratos de todos os grupos foram sacrificados aos 3, 6, 9, 12, 15 e 18 dias após o implante, e os tecidos de granulação retirados e processados histologicamente, sendo corados com Hematoxilina-eosina.

Os resultados demonstraram que, de todos os grupos estudados, apenas os tecidos de granulação dos animais do Grupo IV, que receberam injeções de solução de polissacarídeo foram alterados, havendo um evidente atraso na maturação dos tecidos de granulação, em relação ao grupo controle. Os animais dos demais grupos experimentais não mostraram nenhuma alteração dos tecidos, quando comparados com os controles correspondentes.

Foi sugerido que o atraso na evolução dos tecidos de granulação dos animais do Grupo IV foi provocado pela ação irritante da solução de polissacarídeo injetada localmente, ação essa que não se manifestou pela via intraperi

toneal. A solução de antígeno total de Ascaris, provavelmente, não provocou nenhuma alteração na evolução dos tecidos de granulação por ter desenvolvido um fenômeno de tolerância imunológica nos animais, em virtude da baixa concentração da solução antigênica utilizada.

## VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ANDRADE, E.D. Estudo histológico e histofotométrico do tecido de granulação de ratos em condições normais e sob ação de drogas antiinflamatórias. Piracicaba, 1980. 48p. [Tese (Mestrado)- FOP-UNICAMP].
02. BAZIN, S.; LE LOUS, M.; DELAUNAY, A. Collagen in granulation tissues. Agents Actions, 6: 272-6, 1976.
03. \_\_\_\_\_; PELLETIER, M.; \_\_\_\_\_. The influence of chemical mediators of acute inflammation on the cells of a subacute inflammation. Agents Actions, 3: 317-21, 1973.
04. BRADBURY, S.M.; PERCY, D.H.; STREJAN, G.H. Immunology of *Ascaris suum* infection. I- Production of reaginic antibodies to worm components in rats. Int. Archs. Allergy appl. Immun., 46: 498-511, 1974.
05. BRUNNER, M. Active sensitization in human beings. J. Allergy, 5: 527-32, 1934.

06. CAMPBELL, D.H. Antigenic polysaccharide fraction of *Ascaris lumbricoides* (from hog). J. infect. Dis., 59: 266-72, 1936.
07. COHEN, B.H.; LEWIS, L.A.; RESNIK, S.S. Wound healing: a brief review. Int. J. Derm., 14: 722-6, 1975.
08. CRANDALL, C.A. & CRANDALL, R.B. *Ascaris suum*: immunosuppression in mice during acute infection. Exp. Parasit., 40(3): 363-72, Dec. 1976.
09. DELAUNAY, A. & BAZIN, S. Reparation du tissue conjonctif. Archs Ophthal., 35: 115-26, 1975.
10. FALLIS, A.M. *Ascaris lumbricoides* infection in guinea pigs with special reference to eosinophilia and resistance. Can. J. dent. Res., 26: 307-27, 1948.
11. FISHERMAN, E.W. Induction of immediate cutaneous reactivity to an antigen (*Ascaris*) in cancerous and noncancerous individuals. J. Allergy, 33: 12-17, 1962.
12. GOLDSCHMIDT, R. Die ascaris vergiftung. München. Med. Wochenschr., 1910. Apud BACH, M.K., ed. Immediate hypersensitivity. New York, Marcel Dekker, 1978. v.7.
13. HERZIG, D. *Ascaris* sensitivity in the dog. I- Isolation and characterization of an antigen. J. Immun. Meth., 5: 219-27, 1974.
14. HEUGHAN, C. & HUNT, T.K. Some aspects of wound healing research: a review. Can. J. Surg., 18: 118-25, 1975.
15. HÖGBERG, B.; THUFVESSON, G.; ÖVNAS, B. Histamine liberation produced in the perfused paw of the cat by 48/80 and extracts from jelly fish (*Cyanea capillata*) and eelworm (*Ascaris lumbricoides*) from swine. Acta Physiol. Scand., 70: 269-79, 1957.

16. IM, M.J.C.; FRESHWATER, M.F.; HOOPES, J.E. Enzyme activities in granulation tissue: energy for collagen synthesis. J. surg. Res., 20: 121-5, 1976.
17. JANES, H.I. Hemagglutination tests in the study of *Ascaris* epidemiology. Ann. trop. Med. Parasit., 71(2) : 219-26, 1977.
18. KAILIN, E.W.; ROSSBACH, E.A.; WAB, W. Experimental human sensitization to *Ascaris lumbricoides* antigen. IV- The influence previous sensitization on rate of sensitization. J. Allergy, 21: 225-31, 1950.
19. KASUYA, S.; OHTOMO, H.; ISHIZAKI, T. Suppressing effects of purified eosinophils derived from guinea sensitized with *Ascaris* antigen on lymphocyte-blastformation. Japan. J. med. Sci. Biol., 30(6): 297-307, Dec. 1977.
20. KENT, H.N. Isolation of specific antigens from *Ascaris lumbricoides* (var. suum). Expl Parasit., 10: 313-23, 1960.
21. KERR, K.B. The cellular response in acquired resistance in guinea pigs to an infection with pig *Ascaris*. An.-J. Hyg., 27: 28-51, 1938.
22. KHOURY, P.B. & SOULSBY, E.J.L. *Ascaris suum*: lymphoid cell responses during secondary infections in the guinea pig. Expl Parasit., 41(2): 432-45, Apr. 1977.
23. \_\_\_\_\_; STROMBERG, B.E.; SOULSBY, E.J.L. Immune mechanisms to *Ascaris suum* in bred guinea-pigs. I- Passive transfer of immunity by cells or serum. Immunology, 32(4): 405-41, Apr. 1977.
24. LINSTOW, J. "Über den giftengehalt der helminten. Int. - Monats chr. Anatomic., 1896. Apud BACH, M.K., ed. -



- Immediate hypersensitivity. New York, Marcel Dekker , 1978. v.7.
25. MADDEN, J.W. & PEACOCK Jr., E.E. Studies on the biology of collagen during wound healing. I- Rate of collagen synthesis and deposition in cutaneous wounds of the rat. Surgery, 64: 288-94, 1968.
26. MAIA, A.S. Efeitos do 2,4-Dinitrofenol, carnosina e tirosina sobre o desenvolvimento do tecido de granulação . Piracicaba, 1981. 76p. [Tese (Mestrado)- FOP-UNICAMP].
27. Mc MINN, R.M.H. & PRITCHARD, J.J. Tissue repair. London, Academic, 1969. p. 14-40.
28. OLIVER-GONZÁLES, J. The inhibition of human isoagglutinis by polysaccharide from *Ascaris suum*. J. infect. Dis., 74: 81-4, 1944.
29. \_\_\_\_\_. Functional antigens in helminths. J. infect. Dis., 78: 232-37, 1946.
30. RAMSON, B.H.; HARRISON, W.T.; COUCH, J.P. *Ascaris* sensitization. J. Agric. Res., 28: 577-83, 1924.
31. READ, H. Untersuchungen über ascaris toxine. Arch. Schiffs Tropen Hyg., 1931. Apud BACH, M.K., ed. Immediate hypersensitivity. New York, Marcel Dekker, 1978 . v.7.
32. ROSS, R. The fibroblast and wound repair. Biol. Rev. , 43: 51-96, 1968.
33. SAKAGUCHI, T. Untersuchungen über die giftwirkung von *ascaris*. Arch. Schiffs Tropen Hyg., 1928. Apud BACH, M. K., ed. Immediate hypersensitivity. New York, Marcel Dekker, 1978. v.7.

34. SCHILLING, J.A. Wound healing. Surg. Clins N. Am., 56: 859-73, 1976.
35. SOULSBY, E.J.L. Immunization against *Ascaris lumbricoi* - des in the guinea pig. Nature, 179: 783-4, Apr. 1957.
36. SPRENT, J.F. On the toxic and allergic manifestations - caused by the tissues and fluids of *Ascaris*. II- Effect of different chemical fractions worm-free, infected - and sensitized guinea pigs. J. infect. Dis., 86: 146-53, 1950.
37. STREJAN, G.H. Allergens of Ascaris and other nematodes. Apud BACH, M.K., ed. Immediate hypersensitivity. New York, Marcel Dekker, 1978. p. 693-735.
38. STROMBERG, B.E. & SOULSBY, E.J.L. *Ascaris suum*: immuniza - tion with soluble antigens in the guinea pig. Int. J. Parasit., 7(4): 287-91, Aug. 1977.
39. VIZIOLI, M.R. Dynamics of fibrillar components in rat sponge induced granulation tissue. Acta anat., 85: - 368-77, 1973.
40. \_\_\_\_\_. Relação entre fosfomonoesterases e a síntese - de colágeno e mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação. Piracicaba, 1975. 65p. [Tese (Mestrado) FOP-UNICAMP].
41. \_\_\_\_\_; BLUMEN, G.; EL-GUINDY, M.M. Granulation tis - sue: histophotometric and radioautographic observati - ons on glycosaminoglycans and collagen synthesis and their relation with alkaline phosphatase. Ann. Histo - chem., 21: 237-45, 1976.
42. \_\_\_\_\_; BOZZO, L.; VALDRIGHI, L. Alkaline phosphatase activity and the development of rat sponge-induced gra - nulation tissue. Acta anat., 83: 60-9, 1972.

43. WEINBERG, M. & JULIEN, A. Recherches sur la toxine ascaridienne. Hyg. Viande et Lait, 7: 225-9, 1911.
44. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Accidents mortels observés chez la cheval à la suite de l'instillation de toxine ascaridienne. C.R. Soc. Biol., 72: 1162-7, 1913.