

Histoquímica de polissacarídeos na fasciolose ovina

Histochemistry of polysaccharides in ovine fascioliasis

Edwin A. Pile¹, José Augusto Albuquerque dos Santos¹, Paulo O. Scherer²

Resumo

Na tentativa de registrar a ocorrência de modificações ao nível da matriz extracelular no parênquima hepático de ovinos, foram realizadas análises histoquímicas em 390 amostras do tecido. Os resultados demonstraram diferença entre os grupos, controle e infectado, evidenciando alterações na síntese e/ou na degradação desses mucopolissacarídeos.

Palavras chave: *Fasciola hepatica*; fasciolose; histoquímica; ovinos

As alterações patológicas provocadas por *Fasciola hepatica* vêm sendo analisadas através da patologia clínica e de técnicas histológicas e histoquímicas em animais natural ou experimentalmente infectados. No entanto, as técnicas histoquímicas utilizadas registram análises enzimáticas das alterações nos hepatócitos (Thorpe e Ford, 1969) sem analisar a existência ou não de modificações em outras estruturas celulares no tecido hepático.

Nas células eucariontes, a membrana celular desempenha um papel preponderante na interação intercelular, estando a composição dessa estrutura (glicolipídeos, glicoproteínas e mucopolissacarídeos) relacionada a complexos e sensíveis mecanismos reguladores das atividades metabólicas.

Os polissacarídeos, em particular, desempenham um papel importante no armazenamento energético (mucopolissacarídeos neutros), além de serem componentes funcionais e estruturais (mucopolissacarídeos ácidos) do tecido orgânico, mantendo uma correlação positiva entre as variações, na síntese e na degradação, que se processam normalmente neles, e o aparecimento de múltiplas doenças (Zugibe, 1970).

Baseados nestes dados, decidiu-se analisar e registrar a possibilidade da ocorrência de modificações histoquímicas no tecido hepático em ovinos encontrados com infecção natural provocada por *F. hepatica*.

Foram utilizados 40 ovinos (*Ovis aries* L.), diagnosticados positivamente para *F. hepatica*, através da técnica

de quatro tamises (Girão e Ueno, 1985).

As amostras de tecidos foram retiradas através de punções hepáticas (Scherer, 1995) ou de necrópsias. O material retirado foi fixado em solução a 10% de formalina comercial e processado através de métodos histológicos de rotina. Do material processado, obtiveram-se 390 cortes histológicos que foram submetidos às colorações de hematoxilina-eosina, ferro coloidal de Hale, tricrômico de Masson, alcian blue (pH 1,0 e pH 2,5), método do ácido periódico + fenilhidrazina (PAPS) e método do ácido periódico (PAS) (Behmer et al., 1976) e a reações químicas de bloqueio: hidrólise, acetilação e saponificação (Zugibe, 1970).

No grupo controle, as leituras evidenciaram nos cortes corados com hematoxilina-eosina os lóbulos hepáticos e o espaço porta com organização histológica normal, enquanto no grupo infectado registraram-se desde edemas localizados, fibroses, septações, hiperplasias e hipertrofias dos dutos biliares, perda da organização dos hepatócitos e infiltrado celular, até cirrose em extensas áreas, corroborando os achados de vários autores (Scherer, 1995).

Nos tecidos dos animais infectados, corados com tricrômico de Masson, foi evidente a positividade nas pequenas áreas de fibrose, septações entre os hepatócitos e áreas de cirrose. No grupo controle, o mesmo corante, demonstrou pouca intensidade (\pm), observada no espaço porta e em torno do lóbulo hepático, alterações também evidenciadas por Scherer (1995).

No grupo controle, a reação ao PAS demonstrou uma distribuição homogênea dos grânulos vermelhos em todo o parênquima hepático e epitélio do ducto biliar. Nos animais infectados apresentaram-se também estas características, todavia, com pequenas áreas de concentração dos grânulos.

O bloqueio à reação ao PAS, realizado com a amilase salivar, revelou somente nos animais infectados raros grânulos distribuídos de forma homogênea no parênquima hepático e dutos biliares. Resultado idêntico foi constatado quando realizada a acetilação e a saponificação precedendo o método.

¹Departamento de Biologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

² Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), km 47 da Antiga Rodovia Rio-São Paulo, 23851-970 Seropédica, RJ, Brasil

A hidrólise, precedendo o método PAS, apresentou resultados semelhantes (presença de grânulos) em ambos os grupos. Esses resultados são ratificados quando as técnicas de acetilação, saponificação e hidrólise ácida são aplicadas nesse tecido.

Ao realizar-se o método PAPS, os grupos reagiram demonstrando raros grânulos vermelhos com concentração maior no grupo controle. Com a hidrólise ácida, precedendo o método PAPS, a intensidade dos grânulos diminuiu, mas foi mais evidente no grupo controle. Neste, a coloração realizada com alcian blue (pH 2,5) demonstrou distribuição homogênea e intensidade fraca (+), resultados comprovados pelo método do ferro coloidal de Hale. No parênquima dos tecidos de animais infectados, a distribuição homogênea da coloração ocorreu com maior intensidade (++) e foi fortemente positiva (+++) em áreas de cicatrização, espaço porta, área peridutal e dutos biliares. No grupo controle, a coloração realizada em pH 1,0 demonstrou pouca intensidade (+) em algumas áreas, o mesmo acontecendo nos indivíduos infectados embora com intensidade maior (++) . A reação de bloqueio pela metilação ácida esboçou resposta (\pm) somente nos tecidos dos animais infectados; a reação de bloqueio pela saponificação, fez retornar a positividade nos dois grupos, com coloração de intensidade maior (++) nos animais infectados. No grupo controle, os mucopolissacarídeos não sulfatados tiveram distribuição homogênea. Nos animais infectados esses mucopolissacarídeos encontravam-se mais evidentes no parênquima hepático, mostrando-se mais intensos nas áreas lesadas e nas contíguas às lesões, enquanto os mucopolissacarídeos sulfatados (em menor distribuição) eram observados somente em determinadas áreas do tecido.

A hidrólise ácida, precedendo o método alcian blue (pH 2,5), demonstrou resultados negativos no grupo controle e fortemente positivos (+++) nas áreas lesadas do tecido nos animais infectados.

Ao realizarem-se os métodos alcian blue (pH 1,0) e PAS de forma conjunta, as reações resultaram nas colorações púrpura (indicando formações estruturais a partir de mucopolissacarídeos ácidos sulfatados) e vermelho (formações estruturais a partir de mucopolissacarídeos não sulfatados e armazenamento de mucopolissacarídeos neutros e ácidos graxos insaturados). Quando a técnica foi executada empregando-se o método alcian blue em pH 2,5, além das colorações vermelha (indicando mucopolissacarídeos neutros e ácidos graxos não insaturados) e púrpura (mucopolissacarídeos que reagem ao mesmo tempo ao método alcian blue e ao PAS), a coloração azul (mucopolissacarídeos ácidos) também foi detectada. Em ambas as técnicas a intensidade de coloração sempre variou, com a tonalidade púrpura presente em áreas onde o método alcian blue apresentava-se intenso.

Os resultados demonstram que há diferença na distri-

buição dos diversos componentes estruturais do arcabouço hepático nos animais infectados, evidenciando alterações na síntese e/ou na degradação desses mucopolissacarídeos. Segundo a literatura, a matriz extracelular é, em parte, responsável pela grande diversidade morfológica, funcional e patológica dos diversos tecidos (Junqueira e Carneiro, 1997), pelo que se sugere a possibilidade dessas alterações (na síntese e/ou na degradação) desencadearem ou influenciarem no desencadeamento de alterações clínico-patológicas nos animais afetados.

Com base nesses achados, aconselha-se a realização de trabalhos mais apurados identificando e quantificando a composição química das estruturas observadas nessas alterações e, se possível, seu correlacionamento com os achados clínico-patológicos.

Tabela - Resultado das reações histoquímicas em fígados de ovinos infectados e não infectados com *Fasciola hepatica*

Método	Intensidade de coloração	
	Grupo infectado	Grupo controle
Ácido Periódico de Schiff (PAS)	+++	++
Amilase + PAS	\pm	-
Acetilação + PAS	+	-
Acetilação + saponificação + PAS	\pm	+
Hidrólise + PAS	\pm	\pm
PAS + Fenilhidrazina (PAPS)	+	++
Hidrólise + PAS + PAPS	\pm	+
Alcian blue 2,5	+++	+
Ferro coloidal de Hale	+++	+
Alcian blue 1,0	++	+
Metilação + alcian blue 2,5	\pm	-
Hidrólise + saponificação + alcian blue 2,5	++	+
Hidrólise + alcian blue 2,5	+++	-
Alcian blue 1,0 + PAS	Púrpura/ Vermelho	Púrpura/ Vermelho
Alcian blue 2,5 + PAS	Vermelho/ Púrpura/Azul	Vermelho/ Púrpura/Azul

Abstract

Histochemistry of polysaccharides in ovine fascioliasis

While trying to record the occurrence of changes in the extracellular matrix in the ovine hepatic parenchyma, histochemistry analysis were done in 390 tissues samples. The results showed difference in the groups, control and infected, indicating alteration in the synthesis and/or degradation of this mucopolissacarides.

Key words: *Fasciola hepatica*; fascioliasis; histochemistry; ovine

Referências bibliográficas

- Behmer OA, De Tolosa EMC, De Freitas Neto AG 1976. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. Ed. Edart, São Paulo, 257 pp.
- Girão ES, Ueno H 1985. Técnica de quatro tamises para diagnóstico coprológico quantitativo da fasciolose dos ruminantes. *Pesq Agrop Bras* 20: 905-912.
- Junqueira LC, Carneiro J 1997. *Biologia Celular e Molecular*. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 299 pp.
- Scherer PO 1995. *Técnica de punção-biópsia de ovinos, para estudo da fasciolose hepática*. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 58 pp.
- Thorpe E, Ford EJH 1969. Serum enzyme and hepatic changes in sheep infected with *Fasciola hepatica*. *J Pathol* 97: 619.
- Zugibe FT 1970. *Diagnostic Histochemistry*. Ed. C.V. Mosby Co., Saint Louis, 366 pp.