Doi: https://doi.org/10.37497/JMRReview.v3i00.67

Journal of Medical Residency Review

CULTIVO IN VIVO DE CISTOS HIDÁTICOS EM COBAIAS: UM ESTUDO SOBRE A EQUINOCOCOSE POLICÍSTICA NEOTROPICAL NA AMAZÔNIA OCIDENTAL

In vivo culture of hydatic cyst in guinea pigs: a study on neotropical polycystic echinococcosis in the western amazon

Mábia de Jesus Lima[1], Viktor Dias Magalhães[2], Maria Caroline da Silva Wiciuk[3], Nilton Ghiotti de Siqueira[4]

[1-4]Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental, Universidade Federal do Acre, Rio Branco – AC.

Resumo

Objetivo: Realizar cultivo in vivo de metacestoides do Echinococcus vogeli em camundongos C57BL/6J. Métodos: Foram utilizados como cobaias, 20 camundongos, 10 fêmeas e 10 machos, com idade de 4 e 7 meses. Para a inoculação intraperitoneal, os camundongos foram anestesiados com sevoflurano. Após a perda da consciência e a bradipneia dava-se início à injeção intraperitoneal do material cístico. Com uma seringa de 3ml e uma agulha de 0,7mm de calibre, foram inoculados 0,5ml de conteúdo cístico na região mediana infra umbilical da cavidade peritoneal de cada animal. Resultados: Dos 20 camundongos inoculados 6 morreram antes da data fixada para a eutanásia, não sendo encontrados cistos em suas necrópsias. Excluídos os óbitos, a porcentagem de sucesso foi de 93%, sendo que 100% dos cistos encontrados possuíam protoscóleces viáveis. Conclusão: É possível realizar, com sucesso, a infecção experimental de camundongos C57BL/6J com cepas de E. vogeli da região da Amazônia Ocidental a partir da inoculação direta, em sua cavidade peritoneal, de material hidático de pacientes humanos infectados, mesmo que estes tenham feito uso de albendazol, já que o uso deste não provocou a perda da vitalidade do metacestoide. Com isso, abre-se a possibilidade de realizar replicações desta pesquisa para que se possa investigar terapias mais eficazes para esta doença endêmica.

Palavras-chave: Echinococcus vogeli, experimentação animal, hidatidose.

Abstract

Aim: To perform in vivo cultivation of Echinococcus vogeli metacestoides in C57BL/6J mice. Methods: were used as laboratory animals, 20 mice, 10 females and 10 males, aged 4 and 7 months. For intraperitoneal inoculation, the mice were anesthetized with sevoflurane. After loss of consciousness and bradypnea, intraperitoneal injection of cystic material was started. With a 3ml syringe and a 0.7mm gauge needle, 0.5ml of cystic content was inoculated into the infra-umbilical median region of the peritoneal cavity of each animal. Results: Of the 20 inoculated mice, 6 died before the deadline for euthanasia, and no cysts were found in their necropsies. Excluding deaths, the percentage of success was 93%, with 100% of the cysts found having viable prostheses. Conclusion: It is possible to successfully carry out experimental infection of C57BL / 6J mice with E. vogeli strains from the Western Amazon region by directly inoculating hydatid material from infected human patients in their peritoneal cavity, even if they have made use of albendazole, as the use of albendazole did not cause the loss of the metacestoid's With this, the possibility of replicating this research opens up so that more effective therapies for this endemic disease can be investigated.

Keywords: Echinococcus vogeli, animal experimentation, hydatidosis

Introdução

A Equinococose Policística Neotropical humana (ou hidatidose policística), representa um grave problema de saúde na América do Sul (D'ALESSANDRO; RAUSCH, 2008). É uma doença parasitária que, assim como o nome sugere, causa lesões policísticas em diversos órgãos do ser humano, podendo, no entanto, ficar assintomática por vários anos (D'ALESSANDRO; RAUSCH, 2008). Seus sintomas são bastante inespecíficos, sendo geralmente identificada durante exames de imagem para avaliação de outras doenças (SIQUEIRA et al., 2013). Seu principal agente na Amazônia Brasileira é o *Echinococcus vogeli*, um parasita da classe Cestoda, família Taeniidae (MALDONADO et al., 2019). A nomenclatura Neotropical se refere ao fato de a ocorrência de contaminação por esta parasitose estar até então

restrita aos países latino-americanos que fazem parte da zona tropical do globo terrestre (D'ALESSANDRO; RAUSCH, 2008).

Os nomes das doenças provocadas pelas diferentes espécies de Echinococcus em seus hospedeiros intermediários, como por exemplo, Equinococose Cística ou Equinococose Policística, correspondem respectivamente à forma de apresentação de seus cistos, pois a análise imaginológica ou anatomopatológica destes, é uma das maneiras de realizar a diferenciação entre as espécies (D'ALESSANDRO; RAUSCH, 2008). Contudo, a forma mais utilizada para diferenciar as espécies é através da análise morfométrica dos ganchos do metacestoide por microscopia óptica e por análise genética, sendo que esta última, por seu alto custo, acaba sendo mais usada em pesquisas científicas (SANTOS et al., 2012). Além disso, há diferença epidemiológica entre as regiões geográficas de ocorrência, e consequentemente, diferença entre as espécies de hospedeiros naturais para cada espécie de Echinococcus (ROMIG et al., 2017).

Em alguns países considerados como zona endêmica de hidatidose, como por exemplo no Chile e na Argentina, ela é classificada como doença de notificação obrigatória, o que não acontece nos estados brasileiros, exceto para o Rio Grande do Sul (BRASIL, 2016). Isto dificulta o entendimento sobre o real estado da doença em nosso país onde ocorrem três dessas espécies (D'ALESSANDRO; RAUSCH, 2008).

O Brasil, por ser um país de proporções continentais, possuindo em seu território regiões de clima tropical e temperado, apresenta a Equinococose Policística Neotropical e a Equinococose Cística, sendo esta última a mais conhecida no Brasil (BRASIL, 2011). O país ainda possui grandes áreas de natureza preservada, como a Amazônia, o Pantanal e a Mata Atlântica, contudo, na medida em que o homem vai estabelecendo moradias nestas áreas e as transformando em zonas de produção rural, traz para o peridomicílio uma doença que até então estaria restrita ao ambiente selvagem (ROMIG et al., 2017).

Os principais dados sobre Equinococose no Brasil são provenientes do sul do país, principalmente do estado do Rio Grande do Sul, devido a notificação obrigatória, local brasileiro de maior índice de casos de Hidatidose por E. granulosus (FARIAS et al., 2004). No estado do Acre e em toda região amazônica, o principal agente etiológico da hidatidose é o Echinococcus vogeli, contudo, há também relatos de casos de infecção autóctone por *E. vogeli* no Sudeste e Centro-Oeste do país (BRASIL, 2011).

Por manifestar-se clinicamente na população economicamente ativa, esta doença é responsável por prejuízos tanto na saúde das pessoas e famílias afetadas, quanto à economia do país, devido ao afastamento do trabalho e gastos com o tratamento (MONTÚFAR-VALER; HUAPAYA-JURADO, 2014; VENEGAS; ESPINOZA; SÁNCHEZ, 2014). Em um estudo feito por Venegas et al. (2014), sobre o impacto econômico da Equinococose Cística no Chile, sugere que é preciso conhecer detalhadamente os fatores regionais e culturais que contribuem para a endemicidade da doença, de forma que esse conhecimento possibilite a criação de programas mais eficientes de prevenção e de controle (VENEGAS; ESPINOZA; SÁNCHEZ, 2014).

Algumas possíveis causas que impedem a erradicação da hidatidose são a existência de diferentes ciclos de transmissão parasitária ainda não elucidada, como por exemplo, a presença de outras espécies de hospedeiros (MOKS et al., 2008; MORO; SCHANTZ, 2009; NAKAO et al., 2006), a persistência de comportamentos de risco nas comunidades locais, a deficiência na detecção de cães infectados, a subnotificação da doença e a insuficiência de campanhas educativas preventivas (MORO; SCHANTZ, 2009).

Apesar de já existirem pesquisas científicas usando Camundongos C57BL/6 para o cultivo intraperitoneal de cistos hidáticos, nenhum deles foi realizado com amostras do *E. vogeli* no Brasil, o que torna este, um estudo pioneiro para o país. A inoculação de material hidático fresco aspirado dos cistos humanos intraperitonealmente em camundongos, como técnica de cultura in vivo promove a possibilidade de fortalecer os estudos sobre a doença na própria região endêmica.

Além disso, na prática médica, percebe-se que o uso de albendazol (metil 5(propil-tio 1H benzimidazol-2 yl) não é completamente eficaz na eliminação da doença na maioria dos pacientes. Através deste experimente será possível observar a vitalidade e a capacidade reprodutiva do parasita, mesmo após vários anos de uso de Albendazol pelos pacientes. Em futuras reproduções deste experimento, há também a possibilidade de realizar experimentos cirúrgicos, medicamentosos e profiláticos, como a criação de novas vacinas para os animais domésticos e até mesmo para humanos e desta forma, estimular estudos experimentais posteriores sobre a doença.

Objetivo

Realizar cultivo in vivo de metacestoides do Echinococcus vogeli em camundongos C57BL/6J. Ainda, verificar a incidência de infecção hidática nos camundongos, mesmo com o uso de cistos de pacientes tratados previamente com albendazol por vários anos, realizar um estudo detalhado do material hidático amostral, quanto à sua morfologia, macroscópica e microscopicamente, e descrever o modelo experimental para possível replicação do experimento, de forma a facilitar posteriores estudos.

Método

A coleta das amostras foi realizada no Centro Cirúrgico da Fundação Hospitalar Estadual do Acre (FUNDHACRE), na cidade de Rio Branco - AC. O material hidático foi obtido a partir de dois pacientes diagnosticados e tratados cirurgicamente para hidatidose, sendo um paciente operado em maio de 2019 e outro em agosto do mesmo ano.

O primeiro paciente doador de amostras hidáticas era do sexo feminino, 54 anos de idade, natural de Sena Madureira – AC. Paciente sem outras comorbidades, apresentando lesões hidáticas confluentes em segmentos VI e VII e colelitíase, fez uso de albendazol desde fevereiro de 2018, sendo submetida à Segmentectomia do VI e VII e colecistectomia em 17/05/2019.

O segundo paciente, também do sexo feminino, 46 anos, natural de Sena Madureira – AC. Paciente sem outras comorbidades, possuía diagnóstico de Hidatidose desde o ano de 2004. Inicialmente, fez uso de albendazol por 6 meses, ficando assintomática. Em agosto de 2016 voltou a fazer uso de albendazol, por apresentar dor abdominal, sendo a medicação mantida de forma contínua. A tomografia computadorizada (TC) de abdome revelava múltiplos cistos em todo o lobo hepático direito, preservando o tronco portal, sendo submetida à hepatectomia direita em 16/08/2019.

Após a excisão dos cistos, os mesmos foram separados assepticamente e abertos para a retirada do material hidático. Estas amostras frescas foram colocadas em frascos estéreis e transportadas para o Laboratório de Patologia e Parasitologia da Universidade Federal do Acre (UFAC), onde se iniciou outra etapa do experimento.

Os Critérios de inclusão para os pacientes doadores de amostras foram: terem sido tratados cirurgicamente para hidatidose na FUNDHACRE, no período fevereiro a agosto de 2019, terem assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, ser morador do estado do Acre ou de municípios de fronteira, ao qual entram como Hospedeiros acidentais da região Amazônica e terem cistos viáveis. Foram excluídas as amostras dos pacientes cujos cistos não apresentavam protoscóleces viáveis, quando estavam associados a abscessos ou grandes calcificações, ou mesmo quando o paciente possuía alguma comorbidade infecciosa que pudesse prejudicar a imunidade das cobaias, como o HIV (vírus da imunodeficiência humana).

No Laboratório de Patologia e Parasitologia da UFAC, as amostras retiradas dos pacientes, foram analisadas microscopicamente com o intuito de confirmar o diagnóstico através da visualização dos protoscóleces e ganchos hidáticos, sua morfologia e morfometria, e principalmente de confirmar a vitalidade dos protoscóleces.

A confecção das lâminas para a análise diagnóstica foi feita através da técnica de esfregaço, utilizando uma pequena parte da amostra sobre uma lâmina fosca lapidada 26.0 x 76.0mm, espessura ≈ 1.0 a 1.2mm. Foram utilizados para a coloração o dibromato de potássio a 2% e Hematoxilina-eosina 1%. Os critérios utilizados para a confirmação da vitalidade dos protoscóleces foi baseada na integridade de sua morfologia e turgidez destes, assim como descrito por Ingold et al. (1999).

Após confirmada a presença de protoscóleces íntegros, a amostra foi levada ao Laboratório de Experimentação Animal da instituição, onde se iniciou a etapa de infecção intraperitoneal dos camundongos. Foram utilizados como cobaias, 20 camundongos da espécie C57BL/6J, 10 fêmeas e 10 machos, com idade de 4 meses na primeira inoculação e 7 meses na segunda, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp.

A primeira sessão de inoculação, foi realizada em 17 de maio de 2019, em três casais de camundongos e a segunda inoculação foi realizada no dia 16 de agosto de 2019 com sete casais. A segunda inoculação foi necessária, visto que a quantidade de material obtido do primeiro paciente foi insuficiente para a inoculação de todos os camundongos.

A técnica de inoculação utilizada neste trabalho foi baseada na técnica proposta por Hemphill e Croft (1997). Contudo, devido ao pequeno tamanho dos camundongos utilizados neste trabalho,

apenas 0,5ml foram utilizados para a inoculação. Além disso, o material inoculado não foi previamente processado, sendo implantado com amostras retiradas diretamente dos cistos dos pacientes.

Durante o tempo entre a inoculação e a eutanásia, os animais receberam água potável e ração padrão, ad libitum, permanecendo em condições ambientais de temperatura de 22°C, umidade relativa média de 55% e exaustão contínua, obedecendo ao ciclo de claro e escuro na proporção de 12 horas claro e 12 horas escuro, conforme o modelo utilizado pelo Manual de Cuidados e Procedimentos do com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP e pelo Curso de manipulação de animais de laboratório (PAIVA; MAFFILI; SANTOS, 2005; SANTOS et al., 2013).

A realização da eutanásia humanitária obedeceu aos princípios das Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA, sendo o procedimento de escolha, a eutanásia com utilização sevoflurano até a perda da consciência e ausência de respiração e batimentos cardíacos, seguido de deslocamento cervical, para garantir a morte ao animal de forma indolor. A utilização de anestésico intraperitoneal mostrou-se inviável, por ser o local de implantação do cisto, de forma que sua administração poderia prejudicar os resultados da pesquisa. As sessões de eutanásia foram realizadas após os 4 meses da primeira e da segunda inoculação, respectivamente, nos dias 27 de outubro e 7 de dezembro.

Para avaliar se a implantação e cultivo intraperitoneal foram bem-sucedidos, após a eutanásia foi realizada uma incisão abdominal mediana, seguida do inventário da cavidade, sendo verificada a incidência de cistos nos órgãos abdominais. Nos tecidos em que foram identificados cistos, estes foram removidos e mergulhados em formol a 10% para confecção de lâminas microscópicas. Estas foram confeccionadas pelo método de inclusão em parafina, cortes de em 4mm de espessura, e coradas com coloração de hematoxilina-eosina. Além disso, os dados foram colhidos através de anotações da experiência, imagens de câmera fotográfica e imagens de microscopia.

As carcaças, assim como o material descartável utilizado foram encaminhados para incineração. Este estudo foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FUNDHACRE, sob o parecer de número 2.790.354, e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Acre, com Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) de número 91370218.5.0000.5009.

Resultados

Dos seis pacientes internados para tratamento da hidatidose no período de coleta, que se realizou entre fevereiro e agosto de 2019, quatro não puderam participar da amostra. Dentre eles, destaca-se um paciente portador do vírus HIV, que foi excluído para evitar o viés de uma imunossupressão nos camundongos e outro que apresentou abscesso hepático, devido a complicações da doença hidática. Os outros pacientes, não apresentavam cistos viáveis em suas amostras.

A Figura 1 mostra três protoscóleces das amostras humanas utilizadas, em fases progressivas de maturação, sendo possível visualizar em A e B protoscóleces invaginados e em C, um protoscólece evaginado. Ainda em A, pode-se ver a coroa de ganchos e apenas três corpúsculos calcários, enquanto na figura B, também é possível visualizar a coroa de ganchos e vários corpúsculos calcários. Já em C, observa-se o protoscólece evaginado, com rostelo e ventosas. Neles é possível observar turgidez e integridade de sua morfologia, assim como na maior parte dos protoscóleces da lâmina analisada, que foram os critérios utilizados para a definição de viabilidade dos cistos.

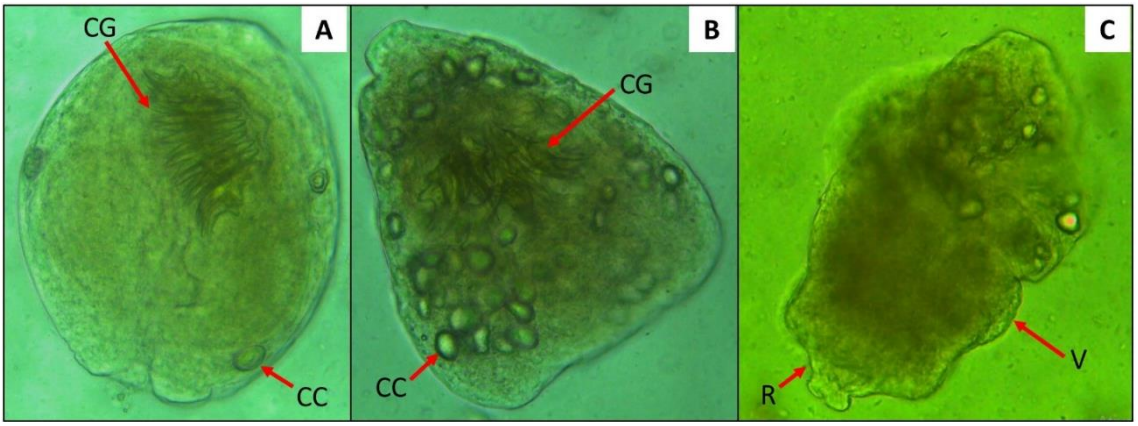

Figura 1 - Protoscóleces íntegros das amostras humanas, vistos no aumento de 1000x com coloração de Dibromato de Potássio a 2%. (A) Protoscólece invaginado (PSC-I) com coroa de ganchos (CG) e alguns corpúsculos calcários (CC). (B). Protoscólece invaginado (PSC-I) com grande quantidade de corpúsculos calcários (CC). (C). Protoscólece evaginado (PSC-E) com rostelo (R) e ventosas (V) claramente visíveis.
Fonte: Acervo dos autores.

Após a segunda sessão de inoculação, morreram quatro fêmeas e dois machos. Três fêmeas morreram no dia 31 de agosto (15º dia após a inoculação) e outra no dia 7 de setembro (22º dia), um macho dia 28 de setembro (43º dia) e um dia 14 de outubro (59º dia). Estes foram conservados em solução de formol a 10% para necrópsia nos dias 27 de outubro, quando foram sacrificados os primeiros casais inoculados, contudo, não foram encontrados cistos em suas necrópsias.

Dia 7 de dezembro foi realizado a eutanásia dos camundongos sobreviventes da segunda inoculação, e dos 14 camundongos que permaneceram vivos até o final do experimento, em 13 foram encontrados Cistos Hidáticos contendo PSC íntegros, sendo cinco fêmeas e oito machos (Quadro 1). A partir da amostra inicial de 20 camundongos, houve uma mortalidade de 30%, e nos sobreviventes, 93% com o desfecho esperado.

Quadro 1 - Inventário da cavidade abdominal dos camundongos.

Identificação (*)	Cistos visualizados macroscopicamente	Local dos cistos	Visualização Histológica de protoscóleces viáveis
F0.1	Sim	Peritônio Parietal	Presente
F0.2	Sim	Peritônio Parietal	Presente
F0.3	Não	---	---
F1.1	Sim	Peritônio Parietal e Mesentério	Presente
F1.2	Sim	Mesentério	Presente
F1.3	Sim	Cavidade	Presente
F1.4	Não (óbito)	---	---
F1.5	Não (óbito)	---	---
F1.6	Não (óbito)	---	---
F1.7	Não (óbito)	---	---
M0.1	Sim	Cavidade Abdominal	Presente
M0.2	Sim	Cavidade Abdominal	Presente
M0.3	Sim	Cavidade Abdominal	Presente
M1.1	Sim	Cavidade Abdominal	Presente
M1.2	Sim	Cavidade Abdominal	Presente
M1.3	Sim	Mesentério	Presente
M1.4	Sim	Cavidade Abdominal, Peritônio Parietal, Mesentério e Fígado	Presente
M1.5	Sim	Cavidade Abdominal	Presente
M1.6	Não (óbito)	---	---
M1.7	Não (óbito)	---	---

*A nomenclatura usada para identificação de cada camundongo usa letras e números. F: fêmea; M: macho; 0: camundongos da primeira inoculação; 1.: camundongos da segunda inoculação; os últimos números à direita correspondem à sequência em que foram sacrificados.
Fonte: Dados coletados pelos autores.

A localização dos cistos se deu da seguinte forma: em sete estavam dispersos na cavidade abdominal, quatro no peritônio parietal, quatro no mesentério e um na superfície hepática, sendo que desses, um camundongo possuía concomitantemente cistos no peritônio parietal e mesentério e outro camundongo, na cavidade abdominal, peritônio parietal, mesentério e fígado (Figuras 2 e 3).

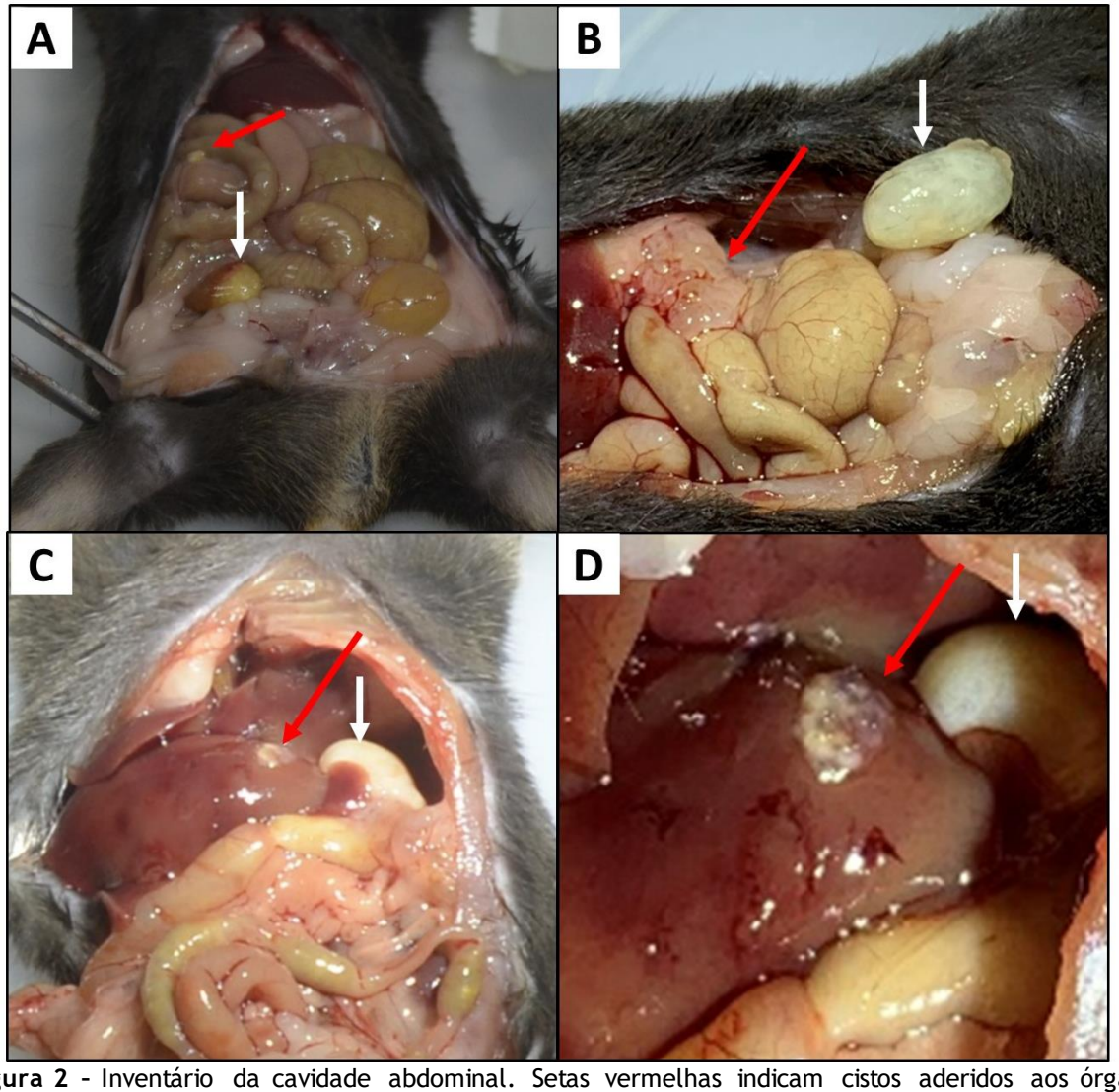

Figura 2 - Inventário da cavidade abdominal. Setas vermelhas indicam cistos aderidos aos órgãos adjacentes; Setas brancas mostram a presença de cistos encapsulados e livres na cavidade. (A). Cisto adjacente ao mesentério e encapsulado de coloração amarela/acastanhada e opaca em abdome inferior. (B). Cistos na cavidade abdominal adjacentes aos órgãos do quadrante superior esquerdo. (C) e (D). Cistos aderidos fracamente à capsula hepática.
Fonte: Acervo dos autores.

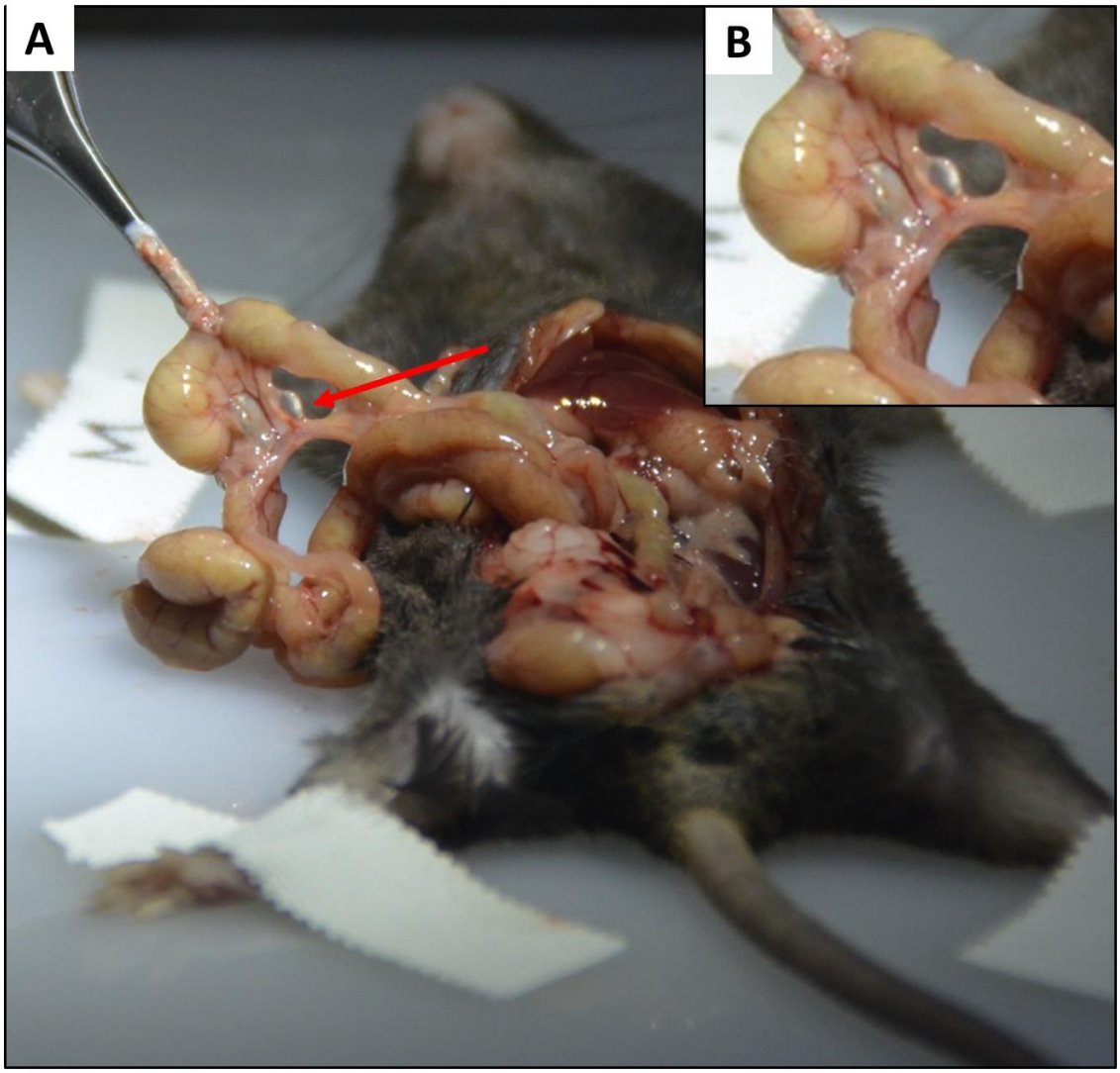

Figura 3 - Cistos hidáticos aderidos ao mesentério. (A). Seta vermelha indica vesículas transparente aderidas a vasos mesentéricos. (B) Imagem ampliada dos cistos.
Fonte: Acervo dos autores.

A única manifestação física observada pelos pesquisadores nos camundongos, durante o período entre a inoculação e a eutanásia, foi a presença de nódulo endurecido associado à perda de pelos localizado na parede abdominal de duas fêmeas, F01 e F02 (Figura 4). Após a necrópsia, foi verificado que neste local encontravam-se cistos aderidos ao peritônio parietal, não sendo encontrados outros cistos na cavidade abdominal. Após a análise microscópica, foi confirmado serem cistos hidáticos viáveis (Figura 5, letra F). Os outros camundongos, apesar de terem desenvolvido cistos hidáticos, não apresentaram sinais físicos ou comportamentais de doença, seguindo suas atividades diárias normalmente.

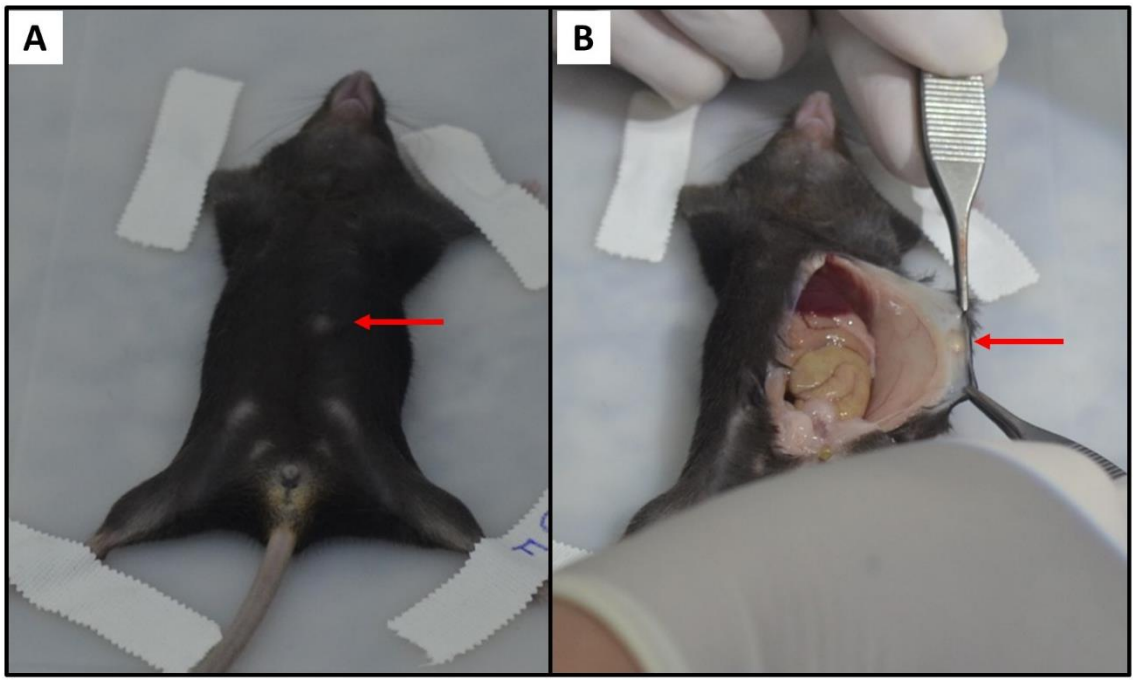

Figura 4 – Cisto Hidático no peritônio parietal. (A). Nódulo palpável na parede abdominal associado à perda de pelos na região simulando tumor de parede abdominal. (B). Visão intra-abdominal durante a necrópsia demonstrando cisto hidático em peritônio parietal.
Fonte: Acervo dos autores.

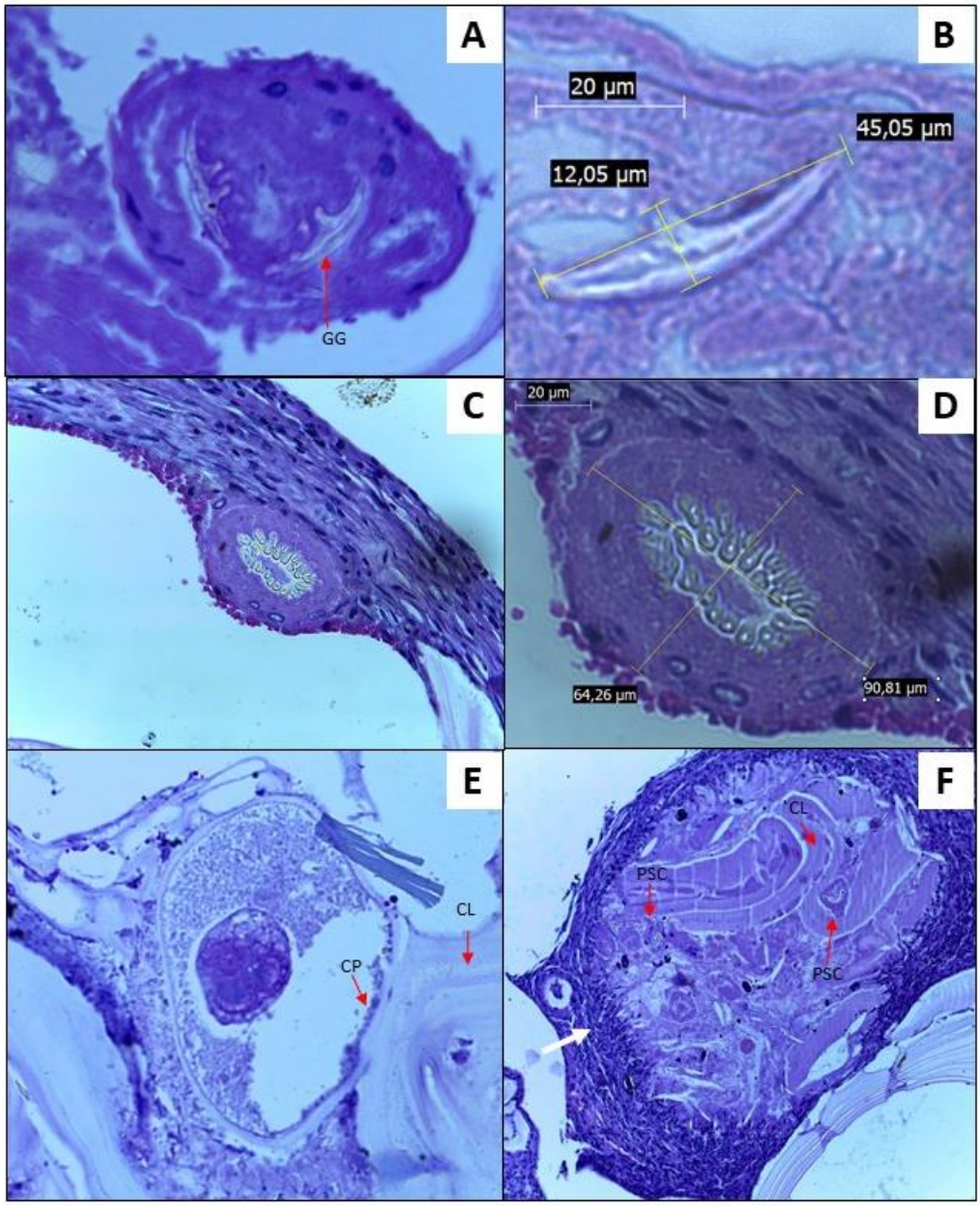

Figura 5 - Caracterização histopatológica dos cistos hidáticos de *E. vogeli* através de lâminas em bloco de parafina coradas com HE. (A). Protoscólece invaginado (PSC-I) em corte coronal em aumento de 1000x. (B). Grande gancho medido em micrômetros no aumento de 1000x. (C). Protoscólece (PSC) aderido a um tecido fibroso, sem presença de membrana germinativa ou laminada. Há também presença de hemácias aderidas ao protoscólece (PSC) e ao tecido fibroso. (D). Protoscólece (PSC) em corte transversal medido em micrômetros no aumento de 400x; nota-se a dupla coroa de ganchos. (E). Cápsula Prolígera (CP) com um Protoscólece (PSC). (F). Cisto Hidático composto pela camada laminada ou cuticular externa (CL), camada germinativa (CG), cápsula prolígera (CP) e por protoscólece (PSC); nota-se também presença de tecido fibroso com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (seta branca).
Fonte: Acervo dos autores.

A Figura 6 demonstra a forma de apresentação dos cistos encontrados durante o inventário da cavidade abdominal, também descrito na Quadro 1. Assim, durante a necrópsia, foi possível identificar cistos encapsulados e livres na cavidade abdominal (setas brancas), apresentando

coloração que variaram entre transparente, esbranquiçada e amarelo/acastanhada. Também haviam cistos fracamente aderidos aos órgãos adjacentes, como no fígado (C e D) e no mesentério (A).

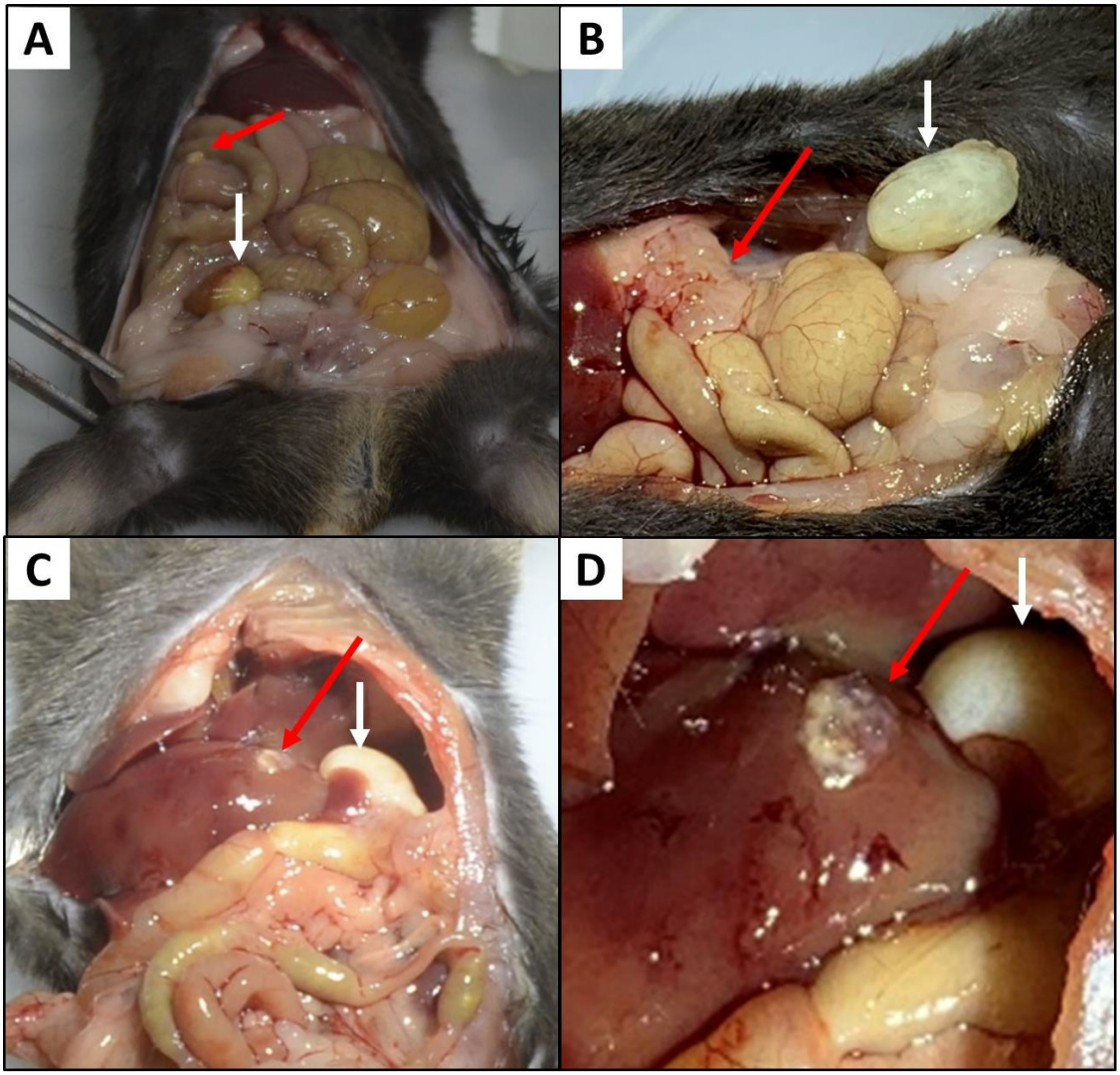

Figura 6 - Inventário da cavidade abdominal. Setas vermelhas indicam cistos aderidos aos órgãos adjacentes; Setas brancas mostram a presença de cistos encapsulados e livres na cavidade. (A). Cisto adjacente ao mesentério e encapsulado de coloração amarela/acastanhada e opaca em abdome inferior. (B). Cistos na cavidade abdominal adjacentes aos órgãos do quadrante superior esquerdo. (C) e (D). Cistos aderidos fracamente à capsula hepática.
Fonte: Acervo dos autores.

A Figura 7 demonstra a forma de crescimento dos cistos hidáticos encontrados no mesentério de um dos quatro camundongos que apresentaram desenvolvimento de cistos nesta localização (Quadro 1). Os cistos apresentavam-se translúcidos, sem calcificações aparentes e intimamente aderidos aos vasos mesentéricos. Estes tipos de cistos possuíam ainda uma membrana frágil, que se rompia facilmente, ao contrário das formas encapsuladas.

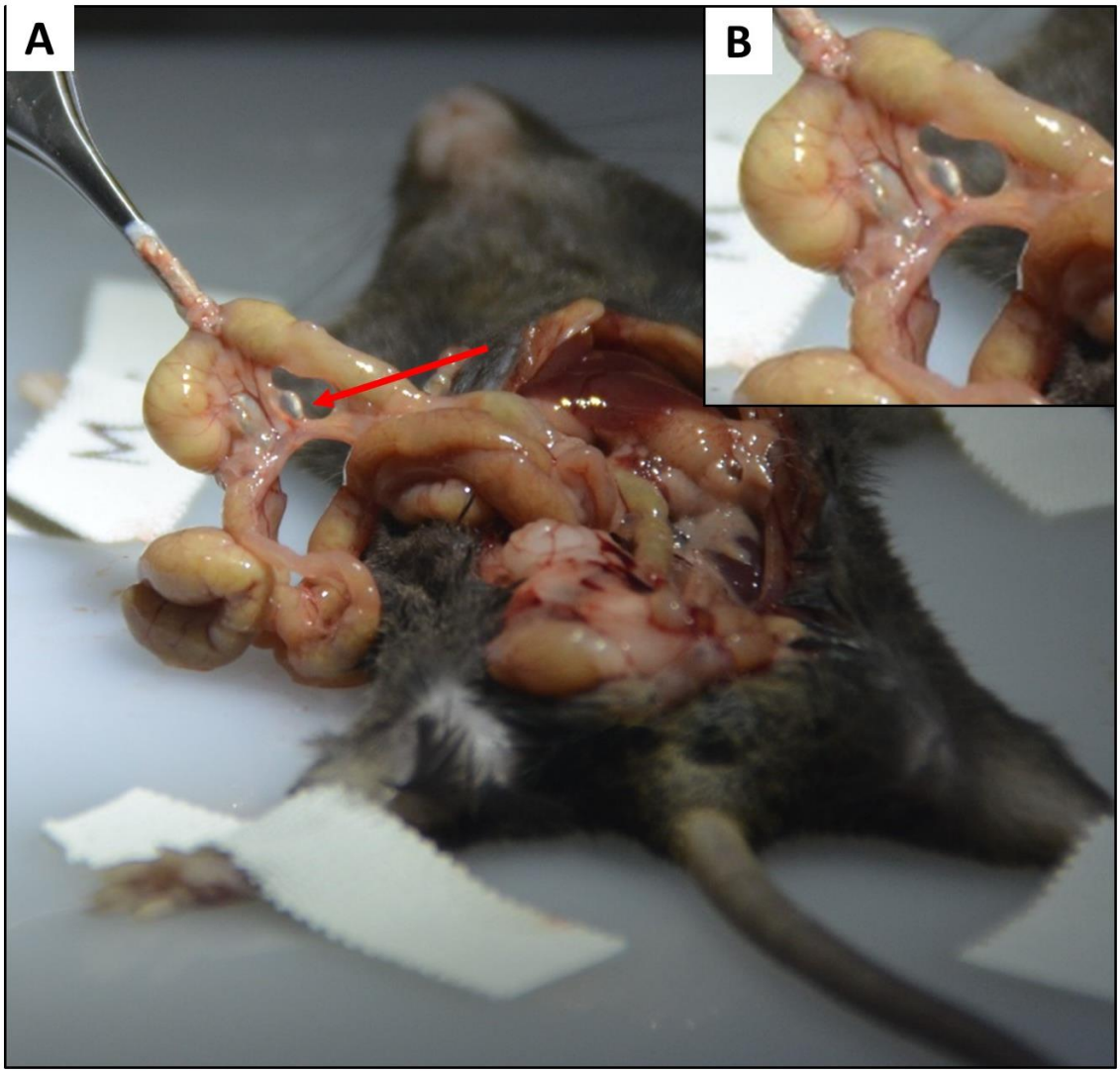

Figura 7 - Cistos hidáticos aderidos ao mesentério. (A). Seta vermelha indica vesículas transparente aderidas a vasos mesentéricos. (B) Imagem ampliada dos cistos.
Fonte: Acervo dos autores.

Nas imagens A e B da Figura 8 é possível observar os cistos bastante aderidos à gordura pré-peritoneal e ao próprio peritônio visceral e parietal. Observa-se na imagem B, o peritônio parietal e as vísceras adjacentes aos cistos, apresentando espessamento, edema e vasos dilatados, típicos de processos inflamatórios. Nos cistos já excisados, visualizados na mesma figura, pode-se verificar a heterogeneidade de tamanho, formas e cores, além de sua intrincada adesão ao tecido gorduroso do animal.

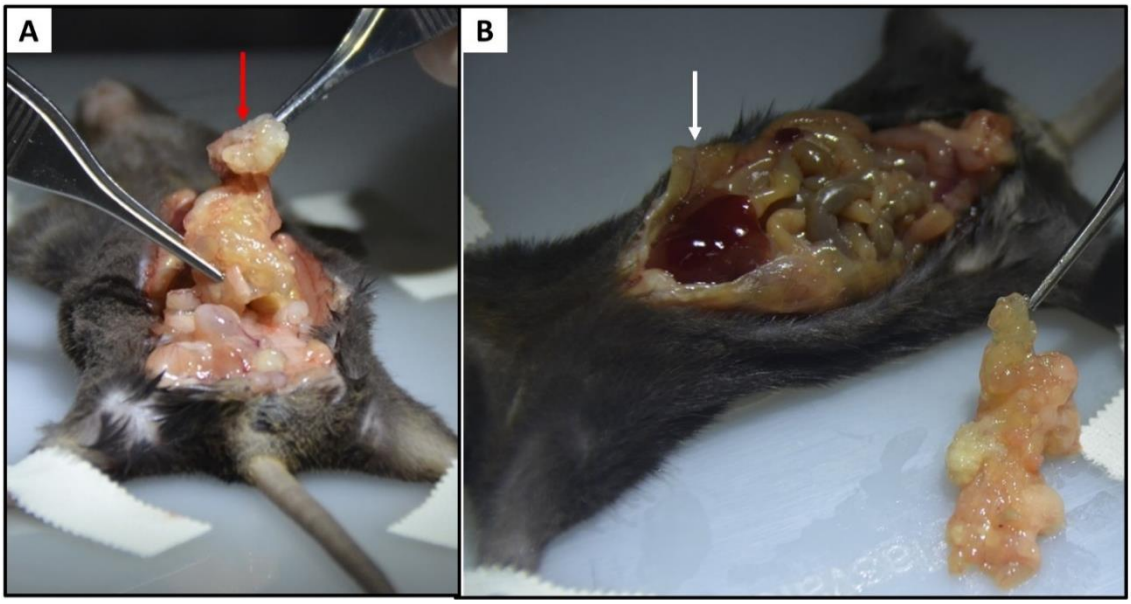

Figura 8 - Aderência e reação inflamatória causada pelos cistos hidáticos. (A) Seta vermelha indica cistos fortemente aderidos ao tecido gorduroso extra peritoneal e ao peritônio. (B). Seta branca indicando sinais inflamatórios no tecido pericístico e pinça indicando o tecido excisado em bloco, contendo cistos hidáticos e tecido adiposo.
Fonte: Acervo dos autores.

A Figura 5 traz os principais achados de todas as lâminas analisadas confeccionadas com as amostras de cistos colhidas após as necrópsias dos camundongos. Na lâmina A é possível visualizar um protoscólece invaginado (PSC-I) em corte coronal, aderido à membrana germinativa. É possível também visualizar a coroa de ganchos invaginada e alguns corpúsculos calcários. A foto da lâmina B, tirada no aumento de 1000x, demonstra a forma como são medidos os ganchos do parasita, sendo a medida do comprimento total desde grande gancho igual 45,5µm e a largura igual a 12,05µm.

A lâmina C da Figura 5, também mostra um PSC-I aderido a um tecido fibroso proveniente de reação inflamatória crônica, sem a presença de membrana germinativa ou laminada. Há também presença de hemácias aderidas ao PSC e ao tecido fibroso. A lâmina D demonstra as medidas do mesmo PSC visualizado em C. O PSC-I foi medido em corte transversal no aumento de 400x, apresentando 90,81µm em seu maior eixo e 64,26 µm no menor eixo. Ainda neste corte é possível visualizar a dupla coroa de ganchos, ou seja, a coroa interna e a externa.

Na lâmina E, identifica-se uma Cápsula Prolígera contendo um PSC e grande quantidade de areia hidática. Em F, está em um aumento de 100x, de forma a evidenciar todas as estruturas típicas de um Cisto Hidático, ou seja, a Camada Laminada (CL) de aspecto "cerebroide", a Camada Germinativa (CG), a Capsula Prolígera (CP) e Protoscóleces (PSC). Além dessas camadas pertencentes ao parasita, nota-se também presença de tecido fibroso com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (seta branca), representativo da camada adventícia, pertencente ao hospedeiro.

Discussão

A presença de cistos hialinos disseminados na cavidade peritoneal dos camundongos, somada à visualização de protoscóleces íntegros nas lâminas histológicas, mesmo após os 4 meses da inoculação da amostra de cistos humanos, confirma a eficácia da técnica de cultivo in vivo realizada neste trabalho.

Assim como no experimento realizado por Rausch e D'Alessandro (1999), a despeito de terem sido injetados na cavidade peritoneal inferior dos camundongos, durante as necrópsias, foi possível confirmar a disseminação dos cistos para outras regiões do abdome, como por exemplo, na cavidade superior. A ausência de contiguidade entre os cistos, que foram encontrados dispersos na cavidade peritoneal das cobaias, demonstra a vitalidade e a capacidade proliferativa e metastática do parasita. A formação de metástases é explicada através do brotamento exógeno de pequenas vesículas a partir de vesículas progenitoras maiores, com invasão dos tecidos vizinhos (RAUSCH; D'ALESSANDRO, 1999).

Essa proliferação depende de fatores de crescimento inerentes ao parasita e da quantidade de insumos metabólicos ofertados pelo corpo do hospedeiro (HEMPHILL; CROFT, 1997). Além da metástase por contiguidade, pode ocorrer metástases à distância, em casos de longa duração da doença (RAUSCH; D'ALESSANDRO, 1999).

As duas amostras de cistos colhidas das pacientes possuíam as características macro e microscópicas da Equinococose Policística, ou seja, múltiplos cistos agrupados compostos por uma camada laminada externa espessa e com múltiplas dobras em si mesma, uma camada germinativa e algumas capsulas prolígeras, assim como também descrita por Díaz et al. (2011). Nas amostras dos camundongos também foi possível observar todas as camadas que compõem os cistos, e assim como nas pacientes, foi possível visualizar protoscóleces viáveis em seus vários estágios larvais, comprovando assim o sucesso da infecção. Sua apresentação bastante variada, em geral, fracamente aderido ao tecido conjuntivo de algum órgão abdominal, seja o peritônio parietal ou visceral, ou no mesentério, pode sugerir uma preferência do parasita, por infectar tecidos conjuntivos. Porém, algumas vesículas também foram encontradas livres na cavidade, crescendo em pequenos grupos separados ou encapsulados. Estes achados, condizem com as características morfológicas e de crescimento descritas por Ingold et al. (2001), na qual, observaram fraca associação entre os cistos e o tecido do hospedeiro.

Macroscopicamente, os cistos hidáticos encontrados nos camundongos, apresentavam vários tamanhos e formas bastante variados, predominando um aglomerado de pequenas vesículas com aproximadamente um milímetro cada, aderidas umas às outras, sendo algumas recobertas por uma membrana hialina e moldada de acordo com o espaço em que ocupavam. Apesar das diferentes apresentações dos cistos, isto não interferiu na vitalidade dos cistos, pois em todas as amostras de cistos colhidos das cobaias, foram encontrados protoscóleces viáveis.

As cores dos cistos variaram entre translúcidos à escurecidos, ou brancos e calcificados. É importante ressaltar que as cores dos cistos estão relacionadas com sua composição (SHANSHAN et al., 2018). Os cistos translúcidos são aqueles que apresentam maior quantidade de protoscóleces viáveis, visto que ainda não sofreram calcificação ou encapsulamento por reação imune do hospedeiro, como é o caso dos cistos mais esbranquiçados. É provável que os cistos que se apresentavam escurecidos, tenham sofrido alguma reação com fluidos do hospedeiro, adquirindo uma coloração acastanhada (SHANSHAN et al., 2018).

Além disso, através da análise histopatológica dos cistos encontrados nos camundongos, também foi possível identificar várias estruturas típicas do E. vogeli, como a membrana laminada de aspecto "cerebroide", capsulas prolígeras, grandes ganchos com medidas equivalentes aos da espécie e protoscóleces íntegros. A maior parte dos protoscóleces visualizados nas lâminas estavam localizados na camada germinativa interna e não dentro de cápsulas prolígeras. Este achado corrobora com a pesquisa realizada por Ingold et al. (2001), no qual os protoscóleces foram vistos surgindo diretamente da camada germinativa, que é interna à camada laminada.

Além de terem sido observadas, nas lâminas analisadas, a proliferação endógena e as várias dobras da membrana laminada, na qual encontravam-se vários protoscóleces isolados em seu interior, também foi possível visualizar a presença da camada laminada tanto interna quanto externamente ao tecido fibroso inflamatório produzido pelo hospedeiro. Isso sugere a transposição desta barreira imune, visto que a camada laminada visualizada possuía áreas espessas e áreas bastante adelgaçadas e protrusas.

O fato de ser comumente uma doença que leva muitos anos para provocar sintomas, em geral inespecíficos, sugere a prevalência de uma imunidade inata não citotóxica (INGOLD et al., 2001). Com exceção do camundongo F1.2, os órgãos adjacentes aos cistos dos outros camundongos, não apresentaram sinais inflamatórios aparentes à visualização macroscópica, como vasodilatação e edema. Apesar da não visualização macroscópica, na avaliação histológica das lâminas, nota-se a presença de reações inflamatórias crônicas, com infiltrados linfoplasmocitários, sugerindo uma reação da imunidade celular nos tecidos afetados pela doença.

O tempo de espera de 4 meses entre a inoculação e a eutanásia foi suficiente para o desenvolvimento de uma resposta imune pelos camundongos, já que em média estes levam 2 semanas para geração de resposta imune específica contra o cestoide (INGOLD et al., 2001). A observação de tecido inflamatório linfoplasmocitário, confirma a presença de resposta da imunidade celular dos camundongos C57BL/6.

É importante lembrar que camada laminada é uma estrutura acelular produzida pelo parasita e que está envolvida na interação física entre o parasita e o hospedeiro e suas reações imunológicas,

tanto no sentido de oferecer moléculas de reconhecimento antigênico aos anticorpos do hospedeiro, como na proteção física do metacestoide (HEMPHILL; CROFT, 1997; INGOLD et al., 2001). O hospedeiro produz a camada adventícia, uma camada fibrosa, proveniente de processos inflamatórios crônicos, como forma de isolar o agente infeccioso e reduzir a progressão da infecção (D'ALESSANDRO, 1997).

A membrana laminada encontrada nos cistos retirados das cobaias, em geral possuía várias dobras em torno de si própria, como se essa membrana estivesse em contínuo crescimento, porém confinada a um espaço restrito, formando assim, com essas dobras, caminhos como "labirintos", os quais entre essas dobras, eram encontrados protoscóleces isolados e fora da capsula prolígera. Essas dobras da camada laminada são características do E. vogeli, e são conhecidas como apresentando aspecto "cerebroide" (SOARES et al., 2004).

A presença de cistos viáveis nas amostras analisadas dos pacientes, demonstra que mesmo após vários anos do uso de albendazol, este não foi capaz de matar o parasita e consequentemente proporcionar a cura da doença. Isso reforça a importância de se buscar aprimorar os estudos sobre este assunto, de forma a aumentar o conhecimento e o embasamento científico para uma maior segurança e eficácia no tratamento dessa doença, de forma a auxiliar na melhoria do cuidado à saúde dessa população (BRASIL, 2011).

Entre os anos de 1999 e 2019, foram atendidos no ambulatório de Cirurgia Geral do FUNDACRE 217 casos consecutivos dessa doença, com média anual de 11 casos (dados não publicados). Devido à relativa baixa incidência, comparado a outras doenças, poucos recursos são disponibilizados para o estudo da Equinococose, fazendo jus a sua participação na lista das Doenças Tropicais Negligenciadas (OPAS, 2017). Dessa forma, a busca por novos conhecimentos sobre a Equinococose Policística beneficia principalmente a população da Região Amazônica, onde essa doença encontra maior prevalência (BRASIL, 2011).

Além disso, por não ser uma doença de notificação compulsória nos estados da região amazônica, os registros ficam restritos aos prontuários dos pacientes, dificultando sua análise quantitativa, diminuindo ainda mais a visibilidade da doença pelo sistema de saúde, secundário à falta de dados estatísticos confiáveis. Essa escassez de dados quantitativos sobre a prevalência da doença hidática em nosso país não nos permite compreender sua real importância para o serviço de saúde, no que diz respeito aos aspectos socioeconômicos. Dessa forma, seria importante que a hidatidose policística passasse a ser classificada como doença de notificação obrigatória, para que se possa fazer uma análise da real situação da doença no território nacional.

Conclusão

É possível realizar, com sucesso, a infecção experimental de camundongos C57BL/6J com cepas de E. vogeli da região da Amazônia Ocidental a partir da inoculação direta em sua cavidade peritoneal de material hidático de pacientes humanos infectados, mesmo que estes tenham feito uso de albendazol, já que o uso deste não provocou a perda da vitalidade do metacestoide. Com isso, abre-se a possibilidade de realizar replicações desta pesquisa para que se possa investigar terapias mais eficazes para esta doença endêmica.

Referências

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. **Hidatidose humana no Brasil:** manual de procedimentos técnicos para o diagnóstico parasitológico e imunológico / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde; Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Helmintos Parasitos de Vertebrados. Serviço de Referência Nacional em Hidatidose – Brasília: Ministério da Saúde. 63 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos). , 2011.

BRASIL. **Portaria nº 204**, de 17 de fevereiro de 2016. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências. Diário Oficial da União, n. 32. , 2016.

D'ALESSANDRO, A. **Polycystic echinococcosis in tropical America:** Echinococcus vogeli and E. oligarthrus. Acta tropica, v. 67, n. 1–2, p. 43–65, 1997.

D'ALESSANDRO, A.; RAUSCH, R. L. **New Aspects of Neotropical Polycystic (*Echinococcus vogeli*) and Unicystic (*Echinococcus oligarthrus*) Echinococcosis.** Clinical Microbiology Reviews, v. 21, n. 2, p. 380–401, abr. 2008.

DÍAZ, A. et al. **Understanding the laminated layer of larval Echinococcus I: structure.** Trends in Parasitology, v. 27, n. 5, p. 204–213, 2011.

FARIAS, L. N. et al. **Echinococcosis in southern Brazil: efforts toward implementation of a control program in Santana do Livramento, Rio Grande do Sul.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 46, p. 153–156, 2004.

HEMPHILL, A.; CROFT, S. L. **Electron Microscopy in Parasitology.** Em: ROGAN, M. T. (Ed.). Analytical Parasitology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1997. p. 227–268.

INGOLD, K. et al. **Efficacies of Albendazole Sulfoxide and Albendazole Sulfone against In Vitro-Cultivated *Echinococcus multilocularis* Metacestodes.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 43, n. 5, p. 1052–1061, maio 1999.

INGOLD, K. et al. **Characterization of the laminated layer of in vitro cultivated Echinococcus vogeli metacestodes.** Journal of parasitology, v. 87, n. 1, p. 55–64, 2001.

MALDONADO, L. L. et al. **Revisiting the Phylogenetic History of Helminths Through Genomics, the Case of the New Echinococcus oligarthrus Genome.** Frontiers in Genetics, v. 10, 2019.

MOKS, E. et al. **First report of Echinococcus granulosus G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of 'genotypes' G5-G10.** Parasitology, v. 135, n. 5, p. 647–654, 2008.

MONTÚFAR-VALER, A.; HUAPAYA-JURADO, F. L. **Características clínicas, radiológicas y laboratoriales de pacientes con hidatidosis hepática en un hospital de referencia nacional, Lima 1997-2010.** Revista de Gastroenterología del Perú, v. 34, n. 3, p. 203–209, 2014.

MORO, P.; SCHANTZ, P. M. **Echinococcosis:** a review. International journal of Infectious diseases, v. 13, n. 2, p. 125–133, 2009.

NAKAO, M. et al. **A molecular phylogeny of the genus Echinococcus inferred from complete mitochondrial genomes.** Parasitology, v. 134, n. 5, p. 713–722, 2006.

OPAS. **Organização Pan-Americana da Saúde.** Relatório da OMS informa progressos sem precedentes contra doenças tropicais negligenciadas. Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5401:relatorio-da-oms-informa-progressos-sem-precedentes-contra-doencas-tropicais-negligenciadas&Itemid=812> Acessado em: 22 de dezembro de 2017. , 2017.

PAIVA, F.; MAFFILI, V.; SANTOS, A. **Curso de manipulação de animais de laboratório.** Fundação Osvaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz,. , 2005.

RAUSCH, R. L.; D'ALESSANDRO, A. **Histogenesis in the metacestode of Echinococcus vogeli and mechanism of pathogenesis in polycystic hydatid disease.** The Journal of parasitology, p. 410–418, 1999.

ROMIG, T. et al. **Ecology and life cycle patterns of Echinococcus species.** Advances in parasitology, v. 95, p. 213–314, 2017.

SANTOS, G. B. et al. **Mitochondrial and nuclear sequence polymorphisms reveal geographic structuring in Amazonian populations of Echinococcus vogeli (Cestoda: Taeniidae).** International journal for parasitology, v. 42, n. 13–14, p. 1115–1118, 2012.

SANTOS, G. B. et al. **Rapid detection of Echinococcus species by a high-resolution melting (HRM) approach.** Parasites & Vectors, v. 6, n. 1, p. 327, dez. 2013.

SHANSHAN, W. et al. **The study of biochemical profile of cyst fluid and diffusion-weighted magnetic resonance imaging in differentiating hepatic hydatid cysts from liver simple cysts.** Journal of Clinical Laboratory Analysis, v. 32, n. 1, p. e22192, jan. 2018.

SIQUEIRA, N. G. DE et al. **Polycystic echinococcosis in the state of Acre, Brazil: contribution to patient diagnosis, treatment and prognosis.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 108, p. 533–540, 2013.

SOARES, M. DO C. P. et al. **Equinococose policística na Amazônia oriental brasileira:** atualização da casuística. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 37, p. 75–83, 2004.

VENEGAS, J.; ESPINOZA, S.; SÁNCHEZ, G. **Estimación del impacto económico de la equinococosis quística en Chile y análisis de las posibles causas que han dificultado su erradicación**. Revista médica de Chile, v. 142, n. 8, p. 1023–1033, 2014.