

ESTUDO MORFOFUNCIONAL DO ESÔFAGO DE CAMUNDONGOS COM ESOFAGITE EOSINOFÍLICA

Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp - Pibic – CNPq
Marcela dos Santos Martins; Edson Antunes; Fabiano Calmasini; Paulo Joazeiro

Introdução

Esofagite Eosinofílica (EoE) é uma doença crônica e imune, mediada por antígenos, caracterizada clinicamente por sintomas relacionados a disfunções esofágicas e histologicamente por uma inflamação predominantemente eosinofílica. Os motivos pelos quais os eosinófilos são recrutados para o esôfago ainda não foram totalmente elucidados. No entanto, as consequências dessa eosinofilia estão relacionadas à inflamação, hiperplasia da zona basal, remodelamento tecidual, angiogênese, fibrose, recrutamento de mastócitos e células dendríticas, produção elevada de citocinas e indução de resposta tipo Th2.

Modelos experimentais de EoE estão sendo desenvolvidos a fim de se obter um estudo mais preciso da doença, uma vez que as amostras obtidas de biópsias de pacientes humanos não proporcionam material suficiente para estudo mais detalhado. O objetivo do presente estudo é induzir esofagite eosinofílica em camundongos usando diferentes linhagens e diferentes concentrações de Ovalbumina (OVA) e verificar qual combinação é a mais eficaz, avaliando a reatividade da musculatura lisa do esôfago e investigando os mecanismos fisiopatológicos que estão envolvidos na disfunção esofágica.

Materiais e Métodos

Utilizou-se camundongos C57BL6 e BalbC machos (8 semanas de idade), pesando entre 25 e 30 g. Estudou-se 3 grupos de 20 camundongos (C57BL6 10 mg OVA, BalbC 10 mg OVA e Balb C 10µg OVA). Em todos os grupos, os animais foram divididos em subgrupos de 10: controle e esofagite. Todos os animais foram sensibilizados via intraperitoneal nos dias 0 e 14 (100 µg de OVA adsorvidos ao veículo: 1,6 mg de hidróxido de alumínio em 26 µL de solução salina PEPSAMAR por camundongo). Os 3 subgrupos esofagite foram desafiados via intraesofágica por agulha de com concentrações de OVA diferentes (10 mg e 10µg) suspensas em 100ml de solução salina. Os subgrupos controle receberam apenas veículo. Todos os camundongos foram sacrificados 24 horas após o último desafio (dia 54), conforme Figura 1.

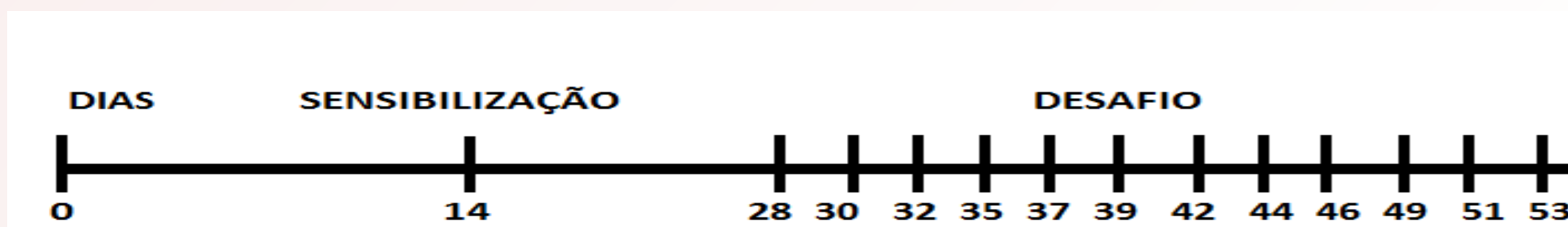


Figura 1: Esquema de sensibilização e desafio

Os esôfagos foram extraídos e montados em miógrafo, preenchidos com solução de Krebs-Henseleit. Foram realizadas curvas concentração-efeito ao agonista carbacol, ao cloreto de potássio, cloreto de cálcio e curvas frequência-resposta a uma voltagem de 50 V, com duração dos pulsos de 1 milissegundo nas frequências de 1, 2, 4, 8, 16 e 32 Hz em esôfago de camundongos controle e com EoE. Foram realizadas também curvas de relaxamento em resposta ao doador de NO, isoproterenol e ao inibidor de fosfodiesterase tipo 5.

Os tecidos que não foram usados em miógrafos foram fixados em solução de formalina tamponada (10%) durante 24h para análise histológica. Foram cortados e desidratados em álcool 70% e diafanizados em xileno. O meio de inclusão empregado foi parafina. Foram feitas secções transversais com espessura de 4µm e as mesmas foram fixadas com hematoxilina e eosina (H&E) e Sirius Red em pH 10,5.

Resultados.

A Figura 2 mostra a resposta do músculo liso esofágico a diferentes drogas: carbacol (1nM a 300µM) e isoproterenol (1nM a 100µM) e análise histológica do tecido.

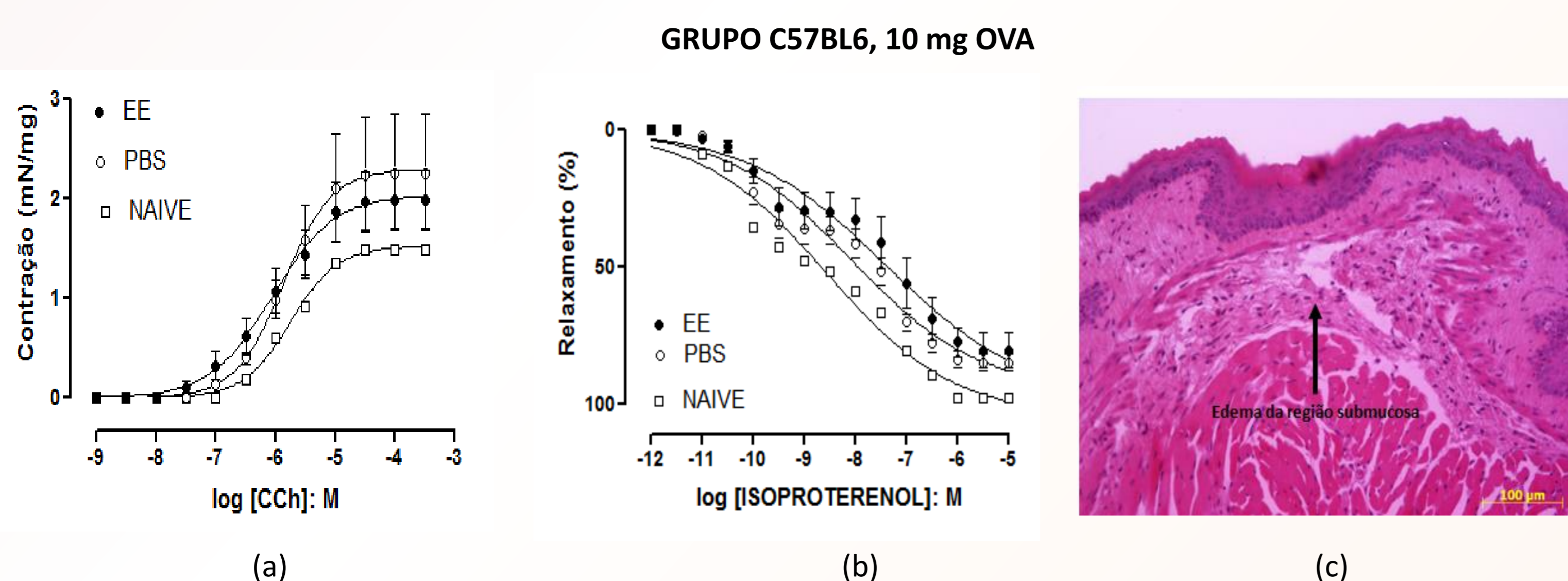


Figura 2: (a) Contração ao estímulo carbacol, (b) Relaxamento ao estímulo isoproterenol, (c) análise histológica.

Pela análise da Figura 2, observa-se que não houve diferença significativa na resposta dos subgrupos esofagite e controle às drogas Carbacol e Isoproterenol. Além disso, pela análise histológica, não foi encontrado infiltrado eosinofílico.

A Figura 3 mostra a resposta do músculo liso esofágico ao carbacol (1nM a 300µM), a estímulo elétrico (1 – 32 Hz) e análise histológica do tecido.

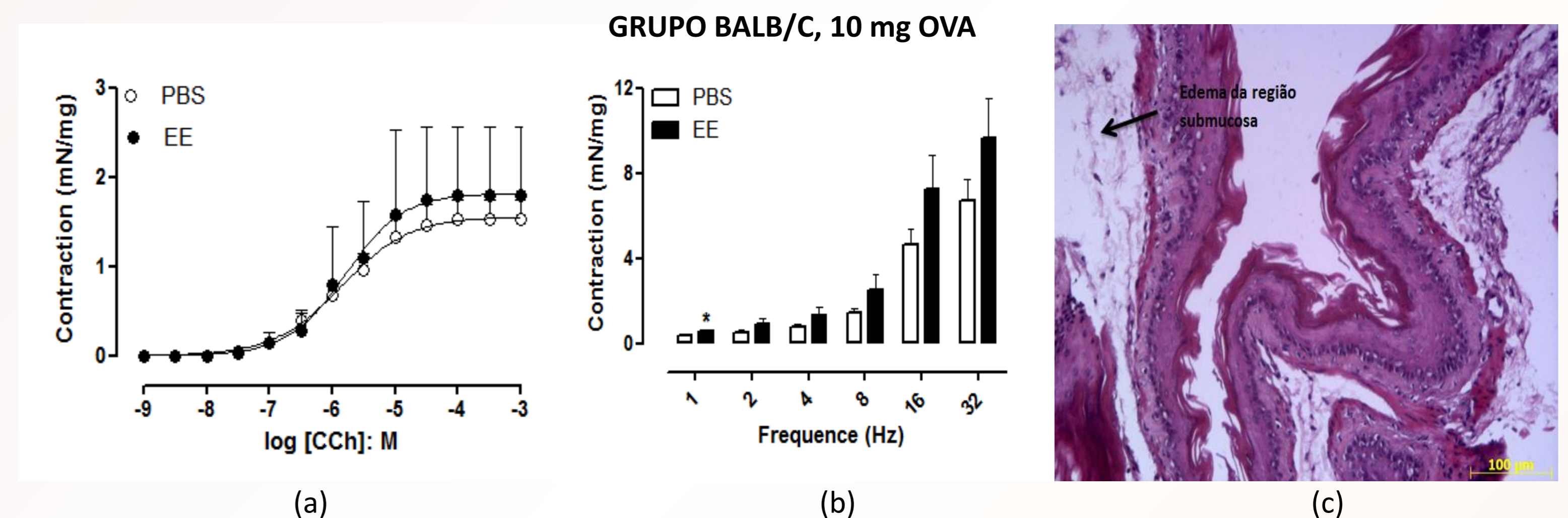


Figura 3: (a) Contração ao estímulo carbacol, (b) Contração ao estímulo elétrico, (c) análise histológica.

Pela análise da Figura 3, exceto na frequência de 1 Hz, observa-se que não houve diferença significativa na resposta dos subgrupos esofagite e controle ao Carbacol e Estímulo elétrico. Na análise histológica, não foi encontrado infiltrado eosinofílico, mas houve edema colágeno-lítico na região submucosa.

A Figura 4 mostra a análise histológica do músculo liso esofágico do subgrupo esofagite em Sirius Red pH 10,5.

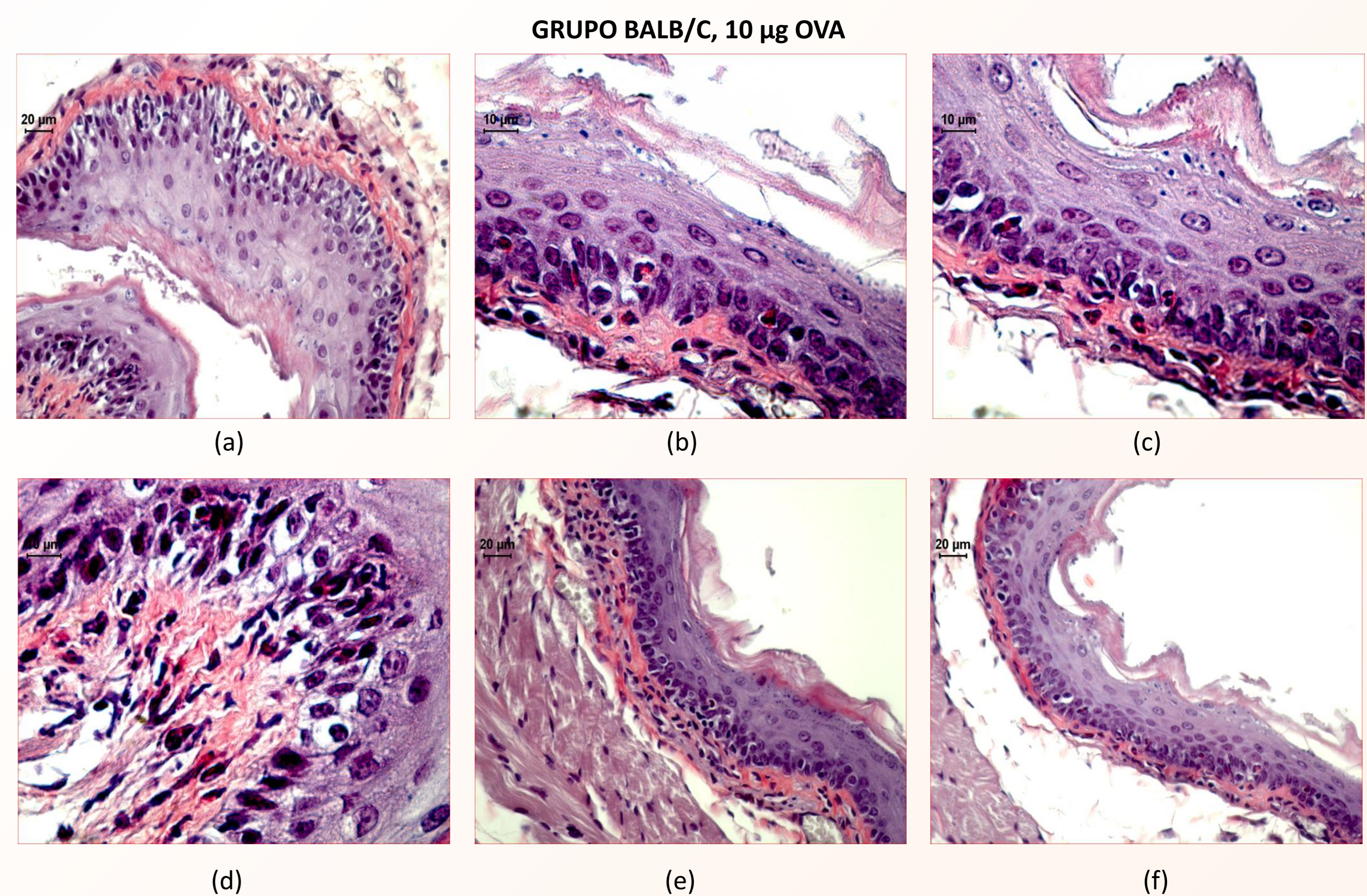


Figura 4: Análise histológica por meio de microscopia óptica.

Na figura 4 pode-se identificar intenso infiltrado eosinofílico, com mais de 10 eosinófilos por campo de grande aumento.

Análise dos resultados obtidos

De acordo com os resultados histológicos e funcionais, chega-se à conclusão de que o protocolo utilizado nos grupos C57BL6, 10 mg OVA e BALB/C, 10 mg OVA foi capaz de induzir esofagite eosinofílica em camundongos, mas com infiltrado inflamatório muito aquém do esperado. Uma das hipóteses para explicar isso seria a do desenvolvimento espontâneo de tolerância imunológica. Altas doses de antígenos podem levar ao desenvolvimento de células T-reguladoras no tecido linfóide gastrointestinal que inibem hipersensibilidade por supressão da produção de IgE.

Estudos mostram que a administração oral de doses elevadas de Ovalbumina em camundongos promove a deleção, mediada por apoptose, de células T-efetoras específicas para esse antígeno. Em contrapartida, pequenas doses induzem expansão clonal dessas células, resultando em resposta alérgica.

Dessa forma, o achado de eosinófilos muito menor do que o esperado poderia ser explicado pela administração de doses de Ovalbumina muito acima da necessária.

O grupo BALB/C, 10 µg OVA foi o único que apresentou resultados significativos, compatíveis com a esofagite eosinofílica.