

**ELABORAÇÃO DE MATERIAL DIDÁTICO PARA A DISCIPLINA DE IMUNOLOGIA:
VISUALIZAÇÃO *IN VIVO* DO PROCESSO DE ROLAMENTO**

Rodrigo Leite da Silva ⁽¹⁾, Larissa Cunha Rodrigues ⁽²⁾,
Alliny Muriel Gonçalves dos santos ⁽²⁾, Juliana Maria dos Santos queiroga ⁽²⁾,
Rafael de Souza Andrade ⁽²⁾, Cristine Hirsch-Monteiro ⁽³⁾,
Sandra Rodrigues Mascarenhas ⁽³⁾

Centro de Ciências da Saúde/Departamento de Fisiologia e Patologia / MONITORIA

RESUMO

Durante um processo inflamatório, diversas linhagens celulares abandonam o compartimento vascular e migram para tecidos não-linfóides onde auxiliam os processos imunológicos. O aumento do diâmetro dos vasos e a redução da velocidade do fluxo sanguíneo permitem maior interação dos leucócitos com o endotélio vascular, que também modifica seu perfil de moléculas de superfície, permitindo a adesão leucocitária. A passagem dos leucócitos através do endotélio, conhecida como transmigração, pode ser dividida didaticamente em etapas, o rolamento é a primeira delas. Neste trabalho, buscou-se produzir um material didático auxiliar nas aulas sobre o processo inflamatório na disciplina de imunologia. O processo inflamatório foi reproduzido na pele de girinos. Foram geradas imagens, fotos e vídeo, que permitem a visualização do rolamento, fase inicial da migração leucocitária em resposta a estímulo inflamatório produzido por micro gotas de éter. A observação das células margeando a parede dos vasos pode ser demonstrada tornando possível *in vivo* a visualização da fase de rolamento do processo de migração celular. Espera-se que o impacto visual destas imagens possa contribuir para melhorar o processo ensino-aprendizagem auxiliando na sedimentação dos conceitos apresentados nas aulas teóricas sobre processo inflamatório.

Palavras-Chave: Material didático, imunologia, migração celular

INTRODUÇÃO

Uma característica central do sistema imune é a mudança constante da localização de suas células¹. Células linfóides e mielóides circulam pelo sangue, entram, movem-se, interagem entre si, e deixam os tecidos linfóides organizados¹. Durante um processo inflamatório, diversas linhagens celulares abandonam o compartimento vascular e migram para tecidos não-linfóides, onde exercem variadas funções biológicas que auxiliam na defesa do hospedeiro¹. As respostas imunológicas, inata e adaptativa, envolvem não apenas a ação destas células individualmente, mas também uma intensa comunicação entre elas, o que requer um contato direto entre suas membranas, bem como a produção de mediadores solúveis capazes de amplificar e coordenar a resposta imune¹. A inflamação exerce três papéis fundamentais no combate à infecção². O primeiro é o de oferecer células e moléculas efetoras ao sítio de infecção. O segundo é o de proporcionar uma barreira física, na forma de

¹⁾ Bolsista, ⁽²⁾ Voluntário/colaborador, ⁽³⁾ Orientador/Coordenador ⁽⁴⁾ Prof. colaborador, ⁽⁵⁾ Técnico colaborador.

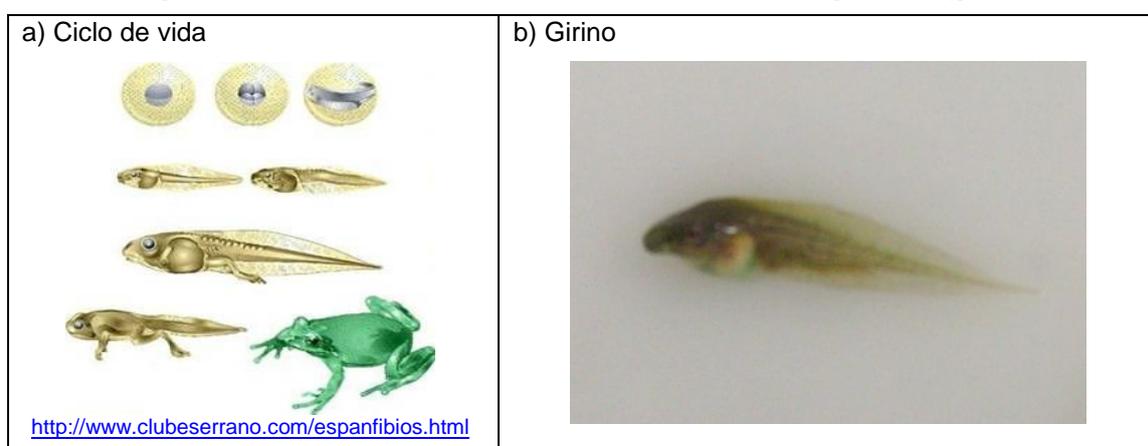
coagulação microvascular, para prevenir a propagação da infecção. E o terceiro é o de promover o reparo dos tecidos danificados².

Diversas alterações morfológicas e funcionais ocorrem na microvasculatura em resposta a um estímulo inflamatório³. O aumento do diâmetro dos vasos e a redução da velocidade do fluxo sanguíneo permitem uma maior interação dos leucócitos circulantes com o endotélio vascular, o qual também modifica seu perfil de moléculas de superfície de modo a permitir a adesão leucocitária³. Uma vez aderidas de forma inespecífica, por meio das selectinas (moléculas presentes, além do endotélio, em plaquetas e linfócitos, as quais se ligam a carboidratos de superfície), as células imunes têm sua velocidade de fluxo reduzida, passam a “rolar” pelas margens dos vasos, e conseguem interagir mais eficientemente com sinalizadores produzidos por macrófagos teciduais ativados, ou pelo próprio endotélio. Entre esses sinalizadores, destacam-se as quimiocinas, pequenas citocinas envolvidas em diversos mecanismos dos processos de ativação, migração e quimiotaxia celular⁴. Os receptores para quimiocinas são seletivamente expressos em determinadas populações de leucócitos, a depender do seu grau de ativação e da fase em que o processo inflamatório se encontra, de forma a permitir uma resposta seqüencial ao estímulo patogênico. Além do grupo das quimiocinas, quatro outras famílias de mediadores plasmáticos estão fundamentalmente envolvidas na regulação da resposta inflamatória: os sistemas do complemento, da coagulação, fibrinolítico e das cininas⁴. Uma vez estimulados, os leucócitos aderem ao endotélio de forma mais firme, através da interação de suas integrinas de membrana com um conjunto de outras moléculas, pertencente à superfamília das imunoglobulinas, conhecido genericamente como CAMs (moléculas de adesão celular), presentes no endotélio vascular (V-CAM), em outros tipos celulares (I-CAM), bem como em componentes da matriz extracelular. A passagem dos leucócitos através do endotélio “permeabilizado”, conhecida como transmigração, marca a última etapa do processo de migração da célula sanguínea para o sítio inflamatório⁴.

Sendo a inflamação um dos eventos mais relevantes da resposta imunológica, dada a riqueza de tipos celulares, moleculares e de interações envolvidas³, torna-se imperativo ao estudante de Imunologia compreender de forma abrangente e sedimentada a cadeia de eventos que se sucedem a um estímulo patogênico. Contudo, a natureza abstrata das aulas expositivas dificulta o processo de consolidação de inúmeros conhecimentos, quando estes são repassados de forma exclusivamente teórica, em sala de aula. Diante da necessidade de oferecer um componente “palpável”, de fácil entendimento, complementar à aula convencional, buscou-se criar um material didático em vídeo mostrando como se processa a fase de migração leucocitária em resposta a um estímulo lesivo aplicado à cauda de um girino. A opção pela produção do material em vídeo deve-se à complexidade técnica e ao tempo demandado na preparação do experimento, o que inviabiliza a sua execução durante uma aula prática.

Estágio larval de anfíbios da ordem anura (sapos, rãs e pererecas), o girino é uma larva de vida aquática (Fig. 1). Neste estágio, os animais realizam respiração predominantemente branquial, que gradativamente vai sendo transferida para pulmões bastante rudimentares, mas também durante toda a vida dos anfíbios ocorre absorção de oxigênio dissolvido na água através da pele. Para tanto, os girinos apresentam um tegumento bastante delgado, sem anexos, facilitando com isso a difusão gasosa⁵. Os vasos sanguíneos e outras estruturas internas são facilmente visualizados através da sua pele, o que justifica a sua utilização para a observação dos fenômenos vasculares característicos da resposta inflamatória.

Fig. 1 Ciclo de vida dos anuros e desenvolvimento do estágio larval (girino).

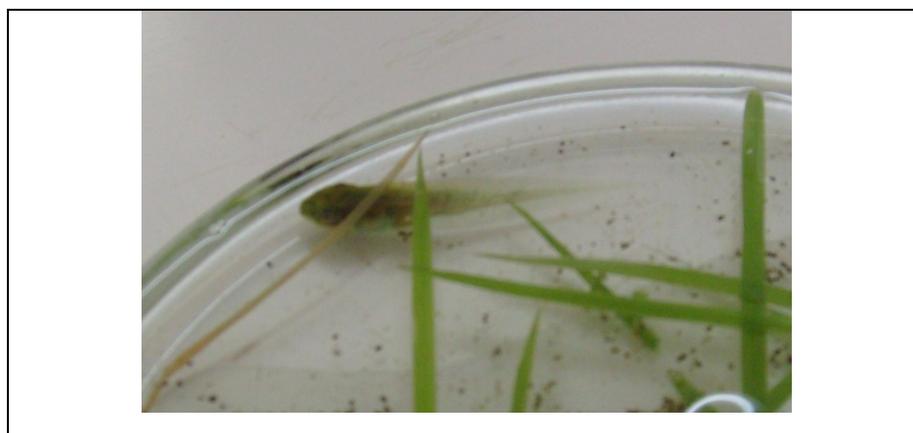


DESCRIÇÃO METODOLÓGICA

1. Coleta dos animais

Girinos (Fig. 1b) invasores nos aquários de piscicultura artesanal foram gentilmente cedidos pelo Sr. Juvenildo Soares dos Santos, proprietário de tanques de criação de peixes ornamentais. Os animais foram mantidos no laboratório a temperatura ambiente em água do próprio local onde foram coletados.

Fig. 2 Girino no 'aquário' no laboratório



2. Preparação do girino

Dentre os animais, foi escolhido o girino que possuía a cauda mais delgada e transparente para ser visualizada ao microscópio óptico comum. O animal foi colocado em uma Placa de Petri contendo água enquanto preparava-se a lâmina. O animal foi delicadamente fixado a uma lâmina de vidro de microscopia usando barbante, conforme a figura X. Gaze umedecida em água foi posta sobre o corpo animal mantendo-o hidratado durante os procedimentos. O conjunto foi então levado ao microscópio óptico comum e observado em vários aumentos.

Fig. 3 Imobilização do Girino para montagem e visualização ao MO



3. Indução da inflamação

Para induzir uma inflamação local no animal, foi feita uma pequena lesão na borda da sua cauda usando micro gotas de éter sobre a pele, mantendo o animal fixado à lâmina e acoplado ao MO.

4. Registro de imagens

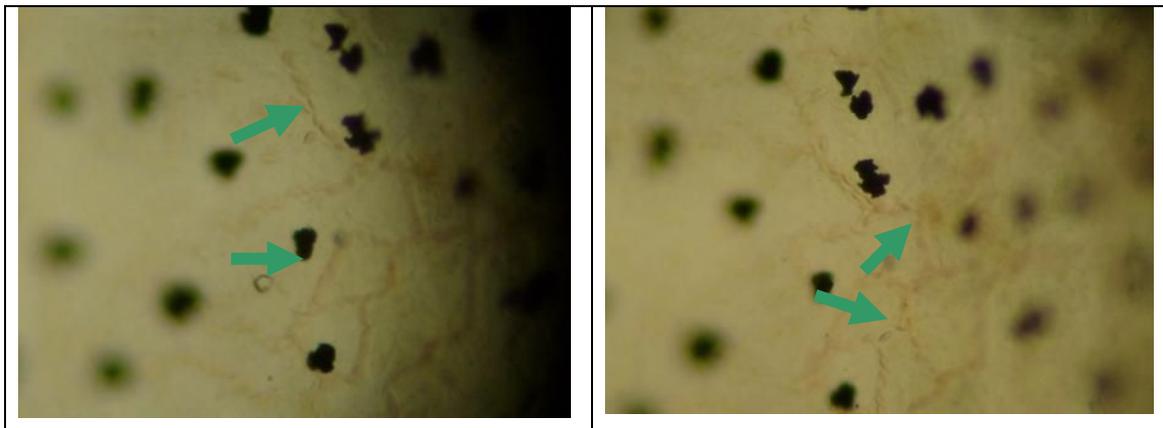
Utilizando câmera digital, foram feitos os registros das imagens (fotografias e vídeos).

RESULTADOS

1. Visualização do fluxo sanguíneo pré-inflamação:

A epiderme extremamente fina e transparente nos permitiu visualizar os vasos sanguíneos e as células em seu trânsito fisiológico (Fig. 4).

Fig. 4 Aspecto norma da circulação subcutânea do girino



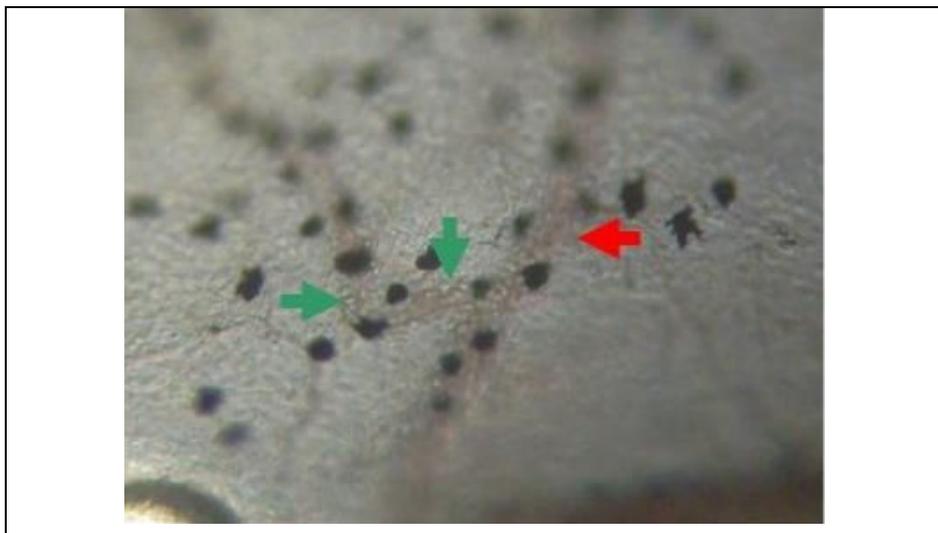
Setas verdes destacam identificação de hemácias dentro dos vasos sanguíneos.

2. Visualização do fluxo sanguíneo após a indução de inflamação.

Cerca de quinze minutos após a aplicação tópica de éter sob a epiderme do girino, observou-se nos vasos de maior calibre a presença de algumas células margeando a parede dos vasos de maneira mais lenta que as demais. Não foi possível, porém, visualizar a diapedese destas células através da parede do vaso, transmigração, ou pelo tecido extravascular.

A etapa de rolamento, também chamada retardamento, foi filmada usando câmera fotográfica digital. O Vídeo gerado (Fig. 5), com 60 segundos de duração, passará a ser usado nas aulas teóricas sobre inflamação para os diversos cursos da área de saúde.

Fig. 5 Imagem inicial do vídeo mostrando a marginação de células brancas lentificadas (seta verde) e fluxo ininterrupto de hemácias (seta vermelha)



Obs.: As regiões da pele mostrada antes e depois da inflamação não são as mesmas.

CONCLUSÃO

O material didático sobre inflamação confeccionado e aqui apresentado permitirá facilitar o processo ensino-aprendizagem uma vez que a imagem em movimento, mais próxima da realidade, ajudará os graduandos a transporem a barreira da teoria associando-a à prática.

Espera-se que o impacto visual do vídeo contribua para aumentar o interesse dos estudantes pelos temas em Imunologia, bem como auxilie na sedimentação dos conceitos apresentados em sala de aula.

REFERÊNCIAS

GERMAIN RN, BAJÉNOFF M, CASTELLINO F, CHIEPPA M, EGEN JG, HUANG AY, ISHII M, KOO LY, QI H. Making friends in out-of-the-way places: how cells of the immune system get together and how they conduct their business as revealed by intravital imaging. **Immunology Review**. Feb; 221:163-81. 2008.

JANEWAY. **Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença**. 6 ed. Artmed, pp. 37-83, 2007.

KOBAYASHI Y. The role of chemokines in neutrophil biology. **Front Biosci**. Jan 1; 13: 2400-7. 2008.

ROITT, I. BROSTOFF, MALE. **Imunologia**. 6 ed. Manole, pp. 47-54. 2003.

RAN – Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios. **Sobre a Classe Amphibia**. Disponível em: http://www.ibama.gov.br/ran/index.php?id_menu=123. Acesso em 13 de março de 2008.