

CÉLULAS DE DEFESA NO INTESTINO DELGADO DE DIDELFÍDEOS (MAMMALIA: DIDELPHIDAE)

Gláucia Marques Freitas Ribeiro¹; Alan Loures-Ribeiro²

¹ UFPB/CCEN – Departamento de Biologia Molecular, glauciamfr@yahoo.com.br

² UFPB/CCEN – Departamento de Sistemática e Ecologia, loures@dse.com.br

Introdução

As células granulares na base das criptas intestinais ou células de Paneth foram descritas primeiramente por Gustav Albert Schwalbe e depois caracterizadas pelo pesquisador Joseph Paneth. Tais células estão presentes nas criptas do intestino delgado do homem, local grande atividade mitótica. Quando observadas à microscopia de luz, tais células apresentam formato piramidal, e seus grânulos estão voltados para o lado luminal da célula (CREAMER et al., 1967). Análises em microscopia eletrônica estabeleceram o porquê da disposição luminal dos grânulos, revelando que na parte basal da célula existe um retículo endoplasmático coberto por ribossomos e logo acima o complexo de Golgi, que é onde ocorre a síntese dos grânulos (CREAMER et al., 1967).

O conteúdo e estrutura dos grânulos variam entre espécies, mas os principais produtos contidos são o fator- α de necrose tumoral, lisozima, α -defensinas-5, HD6, fosfolipase secretória A2, DNase, angiogina 4, IgA e IgG (SATOH et al., 1990, OUELLETTE, 2006). Os grânulos das células de Paneth são acidófilos, facilmente visíveis com hematoxilina. Entretanto, um elevado teor de zinco, fixadores a base de ácido pícrico e outros ácidos podem danificar os grânulos, prejudicando a sua visualização (BANCROFT; STEVENS, 1996).

Os linfócitos intraepiteliais, conhecidos também como células $\gamma \delta$ T, são uma subpopulação de linfócitos T que estão em contato direto com as células epiteliais. Já os linfócitos T circulatórios são células do tipo $\alpha \beta$ T. Os linfócitos intraepiteliais presentes no intestino foram descritos pela primeira vez por Weber, E. H. em 1849. Weber acreditava que estas células realizavam funções de absorção de nutrientes, porém alguns anos depois, Eberth, C. J reconheceu essas células como leucócitos. Antes do final do século XIX, houve várias publicações detalhadas sobre os linfócitos transitórios no epitélio intestinal (FERGUSON, 1977).

Trabalhos com análise descritiva das células epiteliais e transitórias na parede intestinal de marsupiais são muito antigos e raros (PATZELT, 1936, WHEELER, 1964). Assim, o presente trabalho teve como objetivo quantificar os tipos celulares envolvidos na defesa entérica contra a invasão de agentes patogênicos. Assim, as células de Paneth e linfócitos intraepiteliais foram quantificados nos três segmentos do intestino delgado: duodeno, jejuno e íleo.

Metodologia

Fragmentos de vários órgãos de gambás adultos da espécie *D. aurita* coletados no município de Viçosa/MG foram utilizados para a produção das lâminas permanentes. Fragmentos de 1cm² coletados do duodeno, jejuno e íleo foram fixados por 24 h em formol a 10% tamponado. Parte deste material foi armazenado em álcool a 70% e outra parte incluída em parafina. Os fragmentos foram desidratados, diafanizados, incluídos em parafina e seccionados na espessura de 5 μ m em micrótomo rotativo manual (Leica, RM2155). O intervalo entre os cortes foi de aproximadamente 50 μ m (10 cortes foram descartados). No laboratório de Microorganismos (DBM-UFPB) as lâminas foram desparafinizadas e as seções histológicas hidratadas e coradas.

As lâminas foram imersas em xilol e hidratadas em diferentes concentrações de etanol (100%; 95%; 80% e 70%) e água corrente.

Para coloração das células de Paneth, as lâminas foram imersas em uma solução de Floxina (0,1 L de água destilada; Floxina B – 0,5 g; Cloreto de Cálcio – 0,5g) por 30 min e, posteriormente, com o contra corante Tartrazina (0,1 L de polietilenoglicol com tartrazina saturada) por 30 min.

Para a contagem das células de Paneth e de linfócitos intraepiteliais foram mensurados três campos de 2µm de extensão, escolhidos aleatoriamente e com distância de 2 µm entre eles. Para tal, utilizou-se microscópio Olympus CX21 e objetiva de 40x. Imagens representativas das regiões analisadas foram fotografadas em microscópio Olympus BX41(câmera acoplada Sony Cyber-Shot H3 e lentes Carl Zeiss).

Com o objetivo de realizar comparações entre os segmentos do intestino delgado em relação ao número de células, o teste de Kolmogorov-Smirnov foi empregado para testar a normalidade dos dados ($P < 0,05$). Observado a rejeição de normalidade para os grupos comparados, foram empregados testes não-paramétricos de análise de medidas de tendência central. O teste de Kruskal-Wallis (H) foi utilizado para verificar possíveis diferenças entre as medianas nos três segmentos do intestino delgado ($P < 0,05$).

A coleta dos animais foi autorizada pelo IBAMA (licença nº 10168-1) e os procedimentos experimentais envolvendo os animais seguiram as determinações da Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da UFV, sendo aprovado sob protocolo nº 56/2007.

Resultados e discussão

As células de Paneth coradas pela floxina-tartrazina foram observadas nas criptas de Lieberkühn do intestino delgado. O número de células de Paneth entre os segmentos do intestino diferiu apenas entre o duodeno e o íleo ($p < 0,05$). O duodeno apresentou uma redução de 89,65% no número de células de Paneth em relação ao íleo ($p < 0,05$).

Os linfócitos intraepiteliais apresentaram-se corados pela hematoxilina, sendo facilmente identificados entre os enterócitos. O número de linfócitos intraepiteliais apresentou distribuição numérica desigual entre todos os segmentos. O duodeno foi o segmento com menor número de linfócitos intraepiteliais (19,22%), o íleo com maior número (48,62%) e o jejuno ficou na posição intermediária, com 32,14% de linfócitos intraepiteliais.

O número médio de células de Paneth e linfócitos intraepiteliais aumentou no sentido cranial-caudal. CACHAY et al. (2014) obteve resultados semelhantes ao investigar a distribuição de células de Paneth entre os segmentos do intestino delgado de porcos da espécie *Cavia porcellus*, que por sua vez também apresenta um hábito alimentar onívoro.

Conclusões

A distribuição numérica das células de Paneth ao longo do intestino delgado de *D. aurita* aumenta no sentido cranial-caudal por possível correlação com o maior número de patógenos na região final do intestino delgado. Como a microbiota intestinal é vasta no íleo terminal, acredita-se que a regulação do crescimento desta microbiota, assim como o controle de organismos patogênicos, seja realizada pela atividade citotóxica dos linfócitos intraepiteliais e também pela ação de defensinas dos grânulos das células de Paneth.

Palavras-Chave: Células Paneth, linfócitos, marsupial, Didelphidae.

Referências

- BANCROFT, J.D.; STEVENS, A. **Theory and practice of histological techniques**. New York: Churchill Livingstone, 1996.
- CACHAY, M.E.V.; GOMEZ E.P.; GUTIERREZ, J.L.R.; MEJIA, B.L.; PEREZ, N.F.; ZANUZZI, C.N.; BARBEITO, C. Paneth cell identification in the small intestine of Guinea Pig Offsprings (*Cavia porcellus*). **The Anatomical Record**, v. 297, p. 856-863, 2014.
- CREAMER, B. Paneth-cell function. **The Lancet**, v. 289, n. 7485, p. 314-316, 1967.

FERGUSON, A. Intraepithelial lymphocytes of the small intestine. **Gut**, v. 18: p. 921–37, 1977.

OUELLETTE, J.A. Defensin-mediated innate immunity in the small intestine. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, n. 2, p. 405-419, 2006.

PATZELT, V. **Die Oxyphilen Panethschen Kornchenzellen**. In Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, edited by W. von Mollendorff, v. 5, n. 3, p. 120-137, 1936.

SATOH, Y; YAMANO, M; MATSUDO, M; ONO, K. Ultrastructure of Paneth cells in the intestine of various mammals. **Journal of Electron Microscopy Technique**, v. 16, n. 1, p. 69-80, 1990.

WHEELER, E. J; WHEELER, J. K. Comparative study of Paneth cells in vertebrates **The Anatomical Record**, v. 148, 350, 1964.