

**ANDRESSA KARINE NODARI**

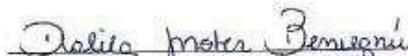
**EVIDÊNCIAS BIOQUÍMICAS E PATOLÓGICAS DA EURITREMATOSE COMO CAUSA  
PRIMÁRIA DE DIABETES MELLITUS TIPO I.**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Nutrição da Universidade Federal da Fronteira Sul.

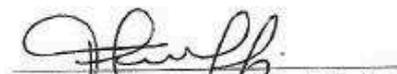
Orientador (a): Prof. Dr Fagner Luiz da Costa Freitas

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 08/12/2016.

**BANCA EXAMINADORA**

  
Profª Dra Dália Moter Benvegnú

  
Prof Dr Clovis Piovezan

  
Prof Dr Fagner Luiz da Costa Freitas

## **Evidências Bioquímicas E Patológicas Da Euritrematose Como Causa Primária De Diabetes Mellitus Tipo I.**

### **Biochemical And Pathological Evidence Of Euritrematosis As A Primary Cause Of Diabetes Mellitus Type I.**

Andressa Karine Nodari<sup>1</sup>; Fagner Luiz da Costa Freitas<sup>2</sup>;

#### **RESUMO**

A Euritrematose é uma doença helmíntica causada por trematódeos pertencentes ao gênero *Eurytrema* que parasitam o pâncreas de diversos animais domésticos e seres humanos. Essa parasitose causa pancreatite fibrosante crônica, infiltração de gordura no parênquima pancreático, além do comprometimento do pâncreas exócrino, com destruição progressiva das ilhotas de Langherans, sendo esse quadro semelhante ao encontrado em pacientes com Diabetes Mellitus Tipo I. Deste modo, o presente trabalho objetivou avaliar o uso de pâncreas bovino como modelo animal para o estudo da fisiopatogenia da diabetes mellitus tipo I. Foram realizadas análises para determinação do lipídio total pancreático, biometria das Ilhotas de Langherans e expressão de insulina pelas células  $\beta$  de pâncreas infectados naturalmente com *E. coelomaticum*. Verificou-se na análise macroscópica, que os pâncreas de animais infectados havia obstrução de ductos com incontáveis parasitos adultos, enrijecimento do órgão pela presença visível de fibrose, aumento da deposição de tecido adiposo, redução da área das ilhotas de Langerhans e redução da expressão de insulina. A partir desses resultados podemos concluir que a Diabetes Mellitus pode ter o parasitismo pancreático como origem primária, porém é necessário o desenvolvimento de mais pesquisas que demonstrem os mecanismos endócrinos e exócrinos envolvidos na infecção.

Palavras- Chave: *Eurytrema coelomaticum*. *Bos Indicus*. Ilhotas de Langerhans. Expressão de Insulina. Lipídeo. Diabetes Mellitus.

#### **ABSTRACT**

The Eurytrematosis is a helminthic is a disease caused by trematodes belonging to the genus *Eurytrema* that parasitize the pancreas of various domestic animals and humans. This parasite

causes chronic fibrosing pancreatitis, fat infiltration into the pancreatic parenchyma, as well as the compromise of the exocrine pancreas, with progressive destruction of the islets of Langerhans, similar to that found in patients with Type I Diabetes Mellitus. To evaluate the use of bovine pancreas as an animal model for the study of pathophysiology of diabetes mellitus type I. Analyzes were performed to determine total pancreatic lipid, Langerhans Islet biometry and insulin expression by pancreas  $\beta$  cells naturally infected with *E. coelomaticum*. It was verified in the macroscopic analysis that the pancreas of infected animals had obstruction of ducts with countless adult parasites, stiffening of the organ by the visible presence of fibrosis, increased deposition of adipose tissue, reduction of the islet area of Langerhans, and reduction of Expression of insulin. From these results we can conclude that Diabetes Mellitus can have pancreatic parasitism as a primary source, but it is necessary to develop more research that demonstrates the endocrine and exocrine mechanisms involved in the infection.

**Key words:** *Eurytrema coelomaticum*. *Bos Indicus*. Islets of Langerhans. Expression of Insulin. Lipids. Diabetes Mellitus.

## Introdução

A Euritrematose é uma doença do pâncreas causada pelos trematódeos pertencentes ao gênero *Eurytrema*, e afetam tanto animais quanto seres humanos, sendo considerada uma zoonose cujo ciclo necessita de dois hospedeiros intermediários: primeiro, caracol do gênero *Bradybaena*; segundo, várias espécies de gafanhotos do gênero *Conocephalus*<sup>[1]</sup>.

A infecção humana é ocasionada pela espécie *E. pancreaticum* que já foi relatada no continente asiático em indivíduos residentes em áreas rurais, sendo encontrado em associação com quadro clínico e patológico de pancreatite intersticial crônica<sup>[2]</sup> e neoplasia<sup>[3]</sup>.

O caráter zoonótico desse patógeno faz com que as lesões pancreáticas endócrinas e exócrinas sejam semelhantes entre animais e humanos.

Nos casos humanos, o parasitismo por *E. pancreaticum*, evidenciou em necropsia a dilatação do ducto pancreático e infiltração de gordura no parênquima pancreático<sup>[2]</sup>, bem como fibrose leve no ducto pancreático, sendo que essas alterações foram consideradas resultantes da irritação pelos parasitas<sup>[3]</sup>.

Alterações clínicas e patológicas semelhantes às encontradas em seres humanos também foram descritas em bovinos infectados naturalmente com *E. coelomaticum*<sup>[4]</sup>. Dentre os sinais clínicos podemos citar:

Caquexia [5, 6, 7, 8, 9, 10], glicosúria [9, 11, 13] e hiperglicemia [7, 13].

Na pesquisa desenvolvida por Oliveira e Bechera [14], foi observado em pâncreas bovinos parasitados por *E. coelomaticum*, a ocorrência de pancreatite fibrosante intersticial crônica, com exuberante fibroplasia que substituía extensas áreas do parênquima pancreático e acúmulo de ovos do parasita, além de comprometimento do pâncreas endócrino com a redução de números e dimensões das ilhotas de Langerhans.

Nesse contexto, essa endoparasitose pode ocasionar transtornos variados nas funções secretoras do pâncreas, admitindo-se que processos digestivos e metabólicos dependentes da função pancreática podem apresentar alterações como diminuição na digestibilidade e, conseqüentemente, assimilação dos alimentos [15].

As alterações orgânicas de origem parasitária encontradas em seres humanos e animais sugerem o desenvolvimento de um quadro patológico de diabetes mellitus tipo I, no qual há destruição imunomediada progressiva das células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas desencadeando secreção insuficiente de insulina [16]. Essa evidencia é fundamentada no quadro clínico, bioquímico e patológico descrito na literatura, porém tornam-se necessários estudos que comprovem que o parasitismo pode ser a origem primária da doença.

Diante da relevância da Euritrematose para a saúde animal e humana, o presente trabalho objetivou avaliar o uso de pâncreas bovino como modelo animal para o estudo da fisiopatogenia da diabetes mellitus tipo I, por meio da determinação do lipídio total pancreático, biometria das Ilhotas de Langerhans e expressão de insulina pelas células  $\beta$  de pâncreas infectados naturalmente com *E. coelomaticum*.

## **Materiais e métodos**

### *Aspectos éticos*

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Fronteira Sul (Protocolo CEUA/UFFS: 23205.005061/2014-20).

### *Animais experimentais*

Avaliou-se pâncreas de bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*), machos, adultos, advindos de 2 grupos: animais naturalmente infectados com *E. coelomaticum* ( $n = 12$ ) e animais não parasitados ( $n = 3$ ). Os órgãos foram coletados em abatedouro localizado no município de Capitão Leônidas Marques, Estado do Paraná, Brasil. Após o abate do animal, as peças anatômicas foram depositadas em bandejas de inspeção para confirmação do parasitismo, e posteriormente os pâncreas foram encaminhados em caixas de isopor com gelo ao Laboratório de Saúde Única da Universidade Federal da Fronteira Sul, Realeza-PR, para avaliação das

alterações patológicas macroscópicas e coleta de fragmentos pancreáticos para dosagem de lipídio total e expressão de insulina pelas células  $\beta$ .

#### *Identificação do trematódeo*

Os parasitos coletados durante a manipulação dos pâncreas infectados foram fixados em solução de Railliet e Henry (930 ml de água destilada, 6 g de cloreto de sódio, 50 ml de formol e 20 ml de ácido acético glacial) [17]. Posteriormente, os parasitos foram clarificados com ácido acético 80% para confirmação microscópica da espécie do trematódeo. As imagens foram registradas por meio de uma ocular digital, marca Dino-Lite, acoplado ao microscópio óptico.

#### *Análise Patológica e Imunoistoquímica (IMH)*

Todos os pâncreas do estudo foram analisados macroscopicamente. Posteriormente, fragmentos das regiões com as principais alterações macroscópicas foram selecionados para histopatologia e IMH. Os tecidos foram processados no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Os mesmos foram fixados, desidratados, diafanizados, seccionados com 4  $\mu$ m de espessura e corados com hematoxilina/eosina (H/E) e Picrosirius (PC) para análise em microscopia de campo claro das alterações celulares e extensão da lesão do epitélio dos ductos e do parênquima. Para

avaliação imuno-histoquímica, pâncreas de 5 animais/grupo experimental foram processados, desparafinizados e hidratados em xilol, álcool e água. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com o reagente Peroxidase-Blocking Reagent (DAKO), e das ligações inespecíficas com PBS + BSA 0,1% por 20 minutos. A seguir, foi realizada incubação com anticorpos primários anti-insulina (H-68, Santa Cruz Biotechnology, Inc.; diluição 1:100, sc-9168) por 12 h. O *kit* Universal LSAB™+ Kit/HRP (DAKO) foi usado como fonte do anticorpo secundário e estreptavidina, sendo a reação revelada com diaminobenzidina (DAB). Em seguida, o tecido foi contra-corado com hematoxilina. A área total da ilhota de Langerhans e expressão de insulina/área total da ilhota foram obtidos por meio da análise de 10 ilhotas de Langerhans/lâmina em microscopia óptica de campo claro. Todas as imagens foram capturadas usando vídeo câmera (Leica® Microsystems, Heebrugg, Suíça) acoplado a um microscópio DMR (Leica®, Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) e computador. Os programas Leica QWin (Leica Microsystems Image Solutions®, Cambridge, UK) e ImageJ 1.48v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) foram utilizados nas análises das imagens.

#### *Determinação de lipídeo total pancreático*

Para determinação de Lipídeo Total pancreático utilizou-se o método de Bligh &

Dyer<sup>[18]</sup>. Este método mede a porcentagem de gordura de um tecido através da extração com um solvente orgânico e medição da diferença entre os pesos da amostra desengordurada.

Utilizou-se 0,5 g de tecido pancreático foram homogeneizados com auxílio de um Sonificador (Hielscheer UP4005 40 MHz) em uma mistura de clorofórmio/metanol (2:1 – 1g de tecido para cada 10 mL). Após este processo o tecido foi transferido para um frasco graduado e completou-se seu volume com a mistura clorofórmio/metanol (5 mL). O sistema foi filtrado e seu volume foi medido. Para cada 5 mL do filtrado foi adicionado 1 mL de água deionizada. O sistema foi agitado até obter-se uma única fase. Então, centrifugou-se a amostra por 5 minutos a 1500 rpm para que a fase orgânica (clorofórmio) contendo os lipídeos fossem separadas. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur a fase orgânica foi separada e transferida para uma placa de Petri previamente pesada. A placa foi mantida na estufa a 100 °C por 1 hora para evaporação total do solvente. Após este período a placa foi resfriada em um dessecador e o conjunto novamente pesado. O cálculo de determinação dos lipídeos totais considera a fase extraída como correspondente a 60% do volume total.

#### Análise Estatística

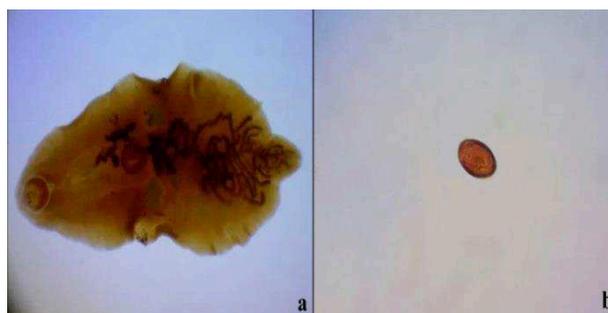
Os dados foram avaliados pelo teste T de Student usando o programa GraphPad

Prism (v.7.01; GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## Resultados e discussões

Realizou-se a caracterização morfológica e biométrica dos parasitos *E. coelomaticum* isolados das lesões pancreáticas de bovinos naturalmente infectados. Nos dados apresentados na Figura 1, podemos observar que os parasitos apresentam morfologia típica de trematódeo, caracterizado por corpo de aspecto foliáceo com uma ventosa oral e outra ventral, um ovário, útero ramificado e dois testículos. Os ovos do parasito apresentam formato elíptico, coloração naturalmente castanha e opérculo numa das extremidades.

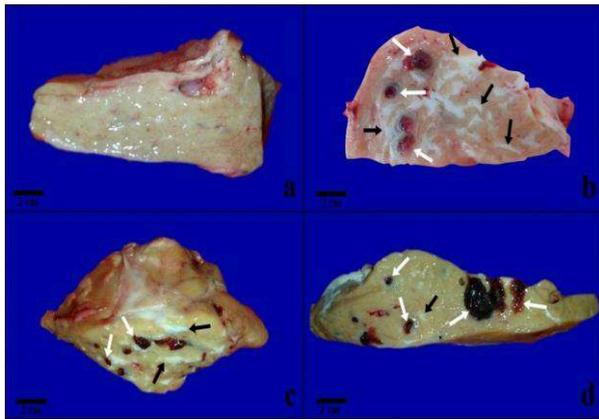
**Figura 1** - *E. coelomaticum* isolado de dutos pancreáticos bovinos. A) Parasita adulto. 100x; B) Ovo de Trematódeo. 400x.



Fonte: Autores.

Na análise macroscópica do pâncreas de animais infectados observamos obstrução de ductos com incontáveis parasitos adultos, além de enrijecimento do órgão pela presença visível de fibrose e aumento da deposição de tecido adiposo (Figura 2).

Figura 2- Alterações patológicas macroscópicas em bovinos de corte sadios e infectados com *E. coelomaticum*. A) Pâncreas do grupo de controle; B) Alterações brutas visualizadas no pâncreas de bovinos infectados com *E. coelomaticum*. Veja a deposição intensa de colágeno no tecido pancreático (setas pretas) acompanhada de obstrução ductal pelos parasitas (setas brancas). C-d) Visão mais detalhada da deposição de colágeno (setas pretas) e obstrução ductal pelos parasitas.



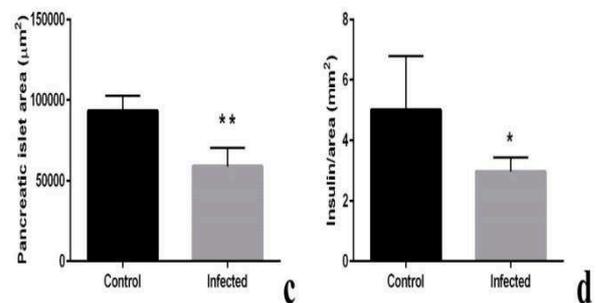
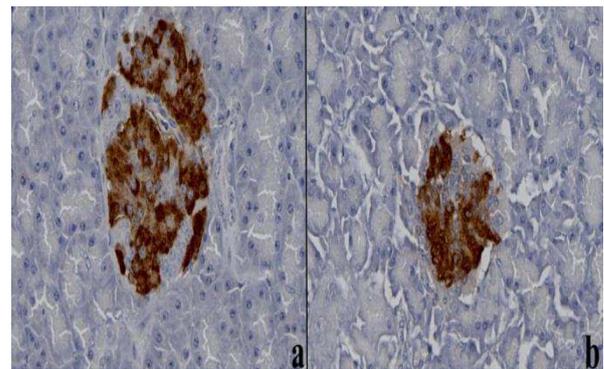
Fonte: Autores.

As alterações patológicas encontradas no presente estudo são semelhantes às encontradas em seres humanos com euritrematose [2,3].

Segundo Nousia-Arvanitakis [19] a obstrução dos ductos pancreáticos, leva a perda elevada e progressiva das células acinares do pâncreas, e conseqüentemente a insuficiência pancreática exócrina. Outras condições pancreáticas que podem estar relacionadas a esse quadro são: atrofia acinar pancreática; pancreatite crônica; pancreatite intersticial fibrosante; desnutrição proteica grave; hipoplasia pancreática e diabetes mellitus [20].

A análise por imuno-histoquímica do parênquima confirmou que, quando comparado com animais não infectados, o parasitismo por *E. coelomaticum* resultou em diminuição da área das ilhotas de Langerhans e na marcação para insulina presente nas células  $\beta$  pancreáticas (Figura 3).

Figura 3: Redução na área de ilhotas de Langerhans e síntese de insulina de células  $\beta$  pancreáticas em pâncreas infectados por *E. Coelomaticum*. A) Ilhotas de Langerhans (10 ilhotas / animal) do grupo de controle. DAB. 400x; B) Ilhotas de Langerhans (10 ilhotas / animal) do grupo infectado. DAB. 400x; C) Área das Ilhotas de Langerhans (10 ilhotas / animal) (\*\* P = 0,001); D) Síntese de insulina a partir de células  $\beta$  pancreáticas (10 ilhotas / animal) (\* P = 0,037).



Fonte: Autores:

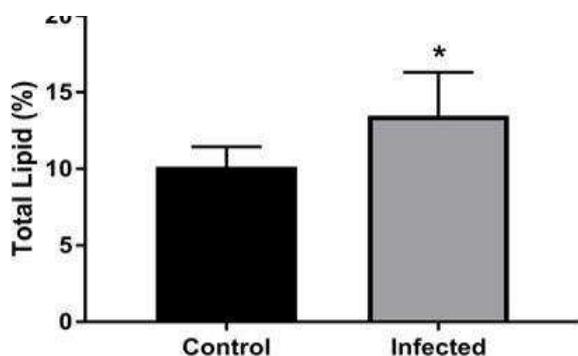
As ilhotas de Langerhans constituem a porção endócrina do pâncreas, e são formadas por células  $\beta$  e  $\alpha$ , que produzem,

respectivamente, insulina e glucagon, sendo que esses exercem papel fundamental na regulação do metabolismo da glicose, lipídeos e proteínas [20]. A destruição das células  $\beta$  no pâncreas resulta na deficiência absoluta de insulina, conseqüentemente hiperglicemia, sendo essas características de um quadro Diabetes Mellitus Tipo I [21].

Com a destruição das células  $\beta$ , no estado de jejum os níveis de insulina diminuem, e os do glucagon aumentam, mais do que num indivíduo saudável, levando ao aumento da produção hepática de glicose, aumento da lipólise, da cetogenese e do catabolismo das proteínas [22].

No gráfico 1, é possível observar que os pâncreas parasitados apresentaram maior porcentagem de gordura quando comparado com os pâncreas não parasitados, evidenciando que animais infectados apresentam maior deposição de tecido adiposo no parênquima pancreático.

**Gráfico 1** Lipídeos totais (%) em 100g de tecido pancreático de bovinos de corte saudáveis e infectados por *E. Coelomaticum* (\* P = 0,005).



Fonte: Os autores.

Segundo Nousia-Arvanitakis, quando ocorre a obstrução dos ductos pancreáticos pode ocorrer a substituição do tecido glandular (células acinares pancreáticas) por tecido fibroso e adiposo, com variados padrões de alteração, como substituição parcial ou completa do pâncreas por tecido adiposo [19].

## Conclusão

As alterações patológicas observadas em pâncreas de bovinos infectados com *E. coelomaticum* foram semelhantes às encontradas em pâncreas de seres humanos infectados com *E. pancreaticum*, viabilizando o uso do modelo animal para estudar a patogenia que também ocorre em seres humanos. A diminuição do tamanho das Ilhotas de Langerhans, assim como a redução da expressão de insulinas pelas células  $\beta$  pancreáticas, juntamente com o aumento da deposição do tecido adiposo pancreático podem ser fortes indicadores de que a Diabetes Mellitus pode ter como causa primária o parasitismo pancreático, porém se faz necessário o desenvolvimento de mais pesquisas que demonstrem os mecanismos endócrinos e exócrinos envolvidos na infecção.

## Referências

- [1] BASSANI, C.A. et al. Euritrematose bovina/Bovine eurytrematosis. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n.2, p. 299–316, 2007.
- [2] ISHII, Y. et al. Human infection with the pancreas fluke, *Eurytrema pancreaticum*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Japão, v.32, n.5, p.1019–1022, 1983.
- [3] TAKAOKA, H. et al. A Human case of Eurytremiasis: Demonstration of Adult Pancreatic Fluke, *Eurytrema pancreaticum* (Jason, 1889) in Resected Pancreas. **Japanese Journal of Parasitology**, Japão, v.32, n.6, p.501-508, 1983.
- [4] BELÉM, P. A. D.; OLIVEIRA, M. R.; PADOVANI, C. R. Alterações pancreáticas em bovinos naturalmente infectados por *Eurytrema* spp. e sua associação com a carga parasitária e o número de ovos por grama de fezes (OPG). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.31, n.3-4, p.273-281, 1994.
- [5] CODO, V. Teste cutâneo para diagnóstico da Euritrematose em bovinos. **Revista Ceres**, Viçosa, v.9, n.50, p.132-138, 1952.
- [6] MARTIN, O. C. The incidence of *Eurytrema pancreaticum* in dairy cattle at the Dtri farm. **Philippine Journal of Science**, Manila, v.56, p.25-34, 1972.
- [7] SAKAMOTO, H. et al. Clinicopathological findings of cattle infected with *Eurytrema coelomaticum*. **Bulletin of the Faculty of Agriculture Kagoshima**, Kagoshima, v.30, n.2 p.117-122, 1980.
- [8] CORREA, W. M. et al. *Eurytrema pancreaticum*: clínica e diagnóstico em bovinos. **Hora Veterinária**, V. 4, n. 19, p. 31 - 34, 1984.
- [9] BELÉM, P.A.D., SILVA, J.C.P., VIEIRA, D. Diabete mellitus em bovino. In: **ENCONTRO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS VETERINÁRIAS**, 11, 1986, Jaboticabal, SP. Resumos: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, p.62, 1986.
- [10] MATTOS JÚNIOR, D. G.; VIANNA, S. S. O *Eurytrema coelomaticum* (Trematoda: Dicrocoeliidae) no Brasil. **Arquivos Fluminenses de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v.2, n.1, p.3-7, 1987.
- [11] HORTA, P. P. Distomatose pancreática e glicosúria em bovinos. **A lavoura**, Rio de Janeiro, v.22, n.3-4, p.157-158, 1918.
- [12] HARRIS, D. G. *Eurytrema pancreaticum*. **Journal of the Royal Army Veterinary Corps**, Aldershot, v.23, n.1, p.23-24, 1952.

- [13] HARADA, H.; WATO, M. ; FUJIWARA, N. Eurytrema infection in dairy cattle. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v.707, n.707, p.328-331, 1980.
- [14] OLIVEIRA O. C.; BECHARA G. H. Aspectos microscópicos do pâncreas de bovino parasitado por *Eurytrema coelomaticum*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 31, n.2, pg. 275-279, 1988.
- [15] YAMAMURA, M. H. **Algumas avaliações sobre a patologia e controle da euritrematose bovina**. 1989. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Parasitologia Veterinária – Concentração Helminologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- [16] GEPTS, W.; LECOMPTE, P. M. The pancreatic islet in diabetes. **American Journal of Medicine**, v.70, n.1, p.105-113, 1981.
- [17] FERNANDEZ, M. A.; THIENGO, S. C.; PARAENSE, W. L. Primeiro registro de *Plesiophysa guadeloupensis guadeloupensis* (“Fischer” ischer” Mazé) no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 3, pg 883–885, 2006.
- [18] BLIGH, E. G. ; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, n.8, p.911-917, 1959.
- [19] NOUSIA-ARVANITAKIS, S. Cystic fibrosis and the pancreas: recent scientific advances. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 29, n. 2, pg.138–142, 1999.
- [20] WESTERMARCK, E.; WIBERG, M. Exocrine pancreatic insufficiency in the dog: Historical background, diagnosis and treatment. **Topics in Companion Animal Medicine**, Finlândia, v.27, n. 3, p.96-103, 2012.
- [21] NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5ª Edição. Nova Iorque, W. H. Freeman and Company, 2008.
- [22] FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. **Diabetes Mellitus In: Canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia: Saunders, 3 ed., p. 339-391, 2003.