

**INFLUÊNCIA DA ESPLENECTOMIA E DO AUTOTRANSPLANTE DE  
BAÇO NA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS E CITOCINAS APÓS  
INFECÇÃO POR *LEISHMANIA CHAGASI***

***EFFECT OF SPLENECTOMY AND AUTOLOGOUS SPLENIC  
IMPLANTATION ON ANTIBODY AND CYTOKINE PRODUCTION  
AFTER LEISHMANIA CHAGASI INFECTION***

Izabelly Fávero Souza Lima<sup>1</sup>, Alice Belleigoli Rezende<sup>2</sup>, Caio César de Souza  
Alves<sup>1</sup>, Suelen Martins Perobelli<sup>1</sup>, Bruno Faria Fernandes<sup>1</sup>, Maria Aparecida de  
Souza<sup>3</sup>, Ana Paula Ferreira<sup>3</sup>, Henrique Couto Teixeira<sup>4</sup>

---

<sup>1</sup>Mestrando (Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFJF)

<sup>2</sup>Doutorando (Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFJF)

<sup>3</sup>Doutora (Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFJF)

<sup>4</sup>Pesquisador Responsável (Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFJF. Juiz de Fora, Minas Gerais. e-mail: henrique.teixeira@ufjf.edu.br. endereço: Campus Universitário, Laboratório de Imunologia, Bairro Martelos, Juiz de Fora).

## Resumo

A leishmaniose visceral é uma doença infecciosa fatal se não tratada. Formas amastigotas sobrevivem no interior de macrófagos levando a hepatoesplenomegalia. Este trabalho avaliou a influência da esplenectomia e do autotransplante de baço em camundongos BALB/C infectados com *L. chagasi*. Fêmeas BALB/c foram divididas em três grupos (n=5): controle operação simulada ou sham (SH), esplenectomizado (SP) e autotransplantado em retroperitônio (RP). Trinta dias após a cirurgia os animais foram infectados intraperitonealmente com  $1 \times 10^6$  promastigotas de *L. chagasi*. Após trinta dias de infecção, o sangue foi coletado para titulação de anticorpos e os animais foram sacrificados, baço e fígado foram retirados para avaliação da produção de TNF-alfa e IFN-gama. O grupo controle apresentou maior produção de IFN-gama pelo fígado quando comparado aos outros grupos. Por outro lado, as células esplênicas do grupo RP tiveram produção maior dessa citocina quando comparado ao controle. Os grupos SH e RP não mostraram diferença significativa na produção de TNF-alfa no fígado e baço. Os animais do grupo SP tiveram produção menor de IgG quando comparados aos demais grupos. Estes dados sugerem que a esplenectomia pode modificar a produção de anticorpos e citocinas do hospedeiro na infecção por *L. chagasi*, e o autotransplante de baço poderia reverter este cenário.

**Palavras-chave:** *Leishmania chagasi*, baço, esplenectomia, implante esplênico autógeno.

**Abstract**

Visceral Leishmaniosis is an infectious disease fatal if not treated. This work evaluated the influence of splenectomy and autologous splenic implants on *L. chagasi* infection in BALB/C mice. Female BALB/c mice were distributed into three groups (n=5): control group, splenectomized group and splenectomized and autotransplanted in the retroperitoneum group. Thirty days after surgery, animals were infected with  $1 \times 10^6$  *L. chagasi* promastigote forms intraperitoneally. After thirty days of infection, the animals were bled and sacrificed. The spleen and liver were collected for evaluation of cytokine production. The control group presented the highest production of IFN-g in the liver when compared to the other groups. On the other hand, the IFN-g production by splenic cells was greater in the autotransplanted mice. There was no significant difference in TNF-alfa production in spleen or liver between the autotransplanted and the control groups. Lower IgG production was observed in the splenectomized group in comparison to the others groups. These data suggest that splenectomy modify the production of antibodies and cytokines in *L. chagasi* infected host, and autologous splenic implantation may reverts this scenario.

**Keywords:** *Leishmania chagasi*, spleen, splenectomy, transplantation.

## 1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, o baço vem despertando o interesse de muitos pesquisadores sobre as suas funções no corpo humano, muitas das quais ainda não estão bem esclarecidas (PETROIANU, 2003). Muitos trabalhos têm demonstrado que os indivíduos que não possuem baço (asplênicos), são mais susceptíveis a infecções por bactérias encapsuladas que são depuradas por opsonização e fagocitose, demonstrando que essa função é deficiente na ausência do baço (KING et al, 1952). Além disso, alguns autores têm atribuído ao baço, um importante papel na regulação do metabolismo lipídico. Acredita-se que o tecido esplênico age como um grande filtro biológico captando e destruindo o LDL-colesterol, através de receptores na membrana de macrófagos, controlando assim os seus níveis e os de colesterol total (FATOUROS et al, 1995).

Apesar de várias funções do baço já serem conhecidas, sua retirada em casos de acidente com traumas abdominais vem ocorrendo de forma indiscriminada. A esplenectomia priva o organismo de um eficiente filtro fagocitário. Sepses e outras complicações infecciosas são conseqüências bem conhecidas da retirada do baço. Com o objetivo de diminuir esses efeitos adversos e preservar as múltiplas funções desse órgão, abordagens conservadoras do baço têm sido cada vez mais utilizadas quando não houver contra-indicação à conservação de tecido esplênico (LIKHTE, 1978.). Entretanto, quando a esplenectomia total é inevitável, o autotransplante de baço torna-se a única opção de preservação das funções esplênicas.

O baço desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da infecção por *L. chagasi*, estando relacionado às manifestações clínicas da doença, desde a hepatoesplenomegalia até a morte de pacientes quando não tratados (CAMARGO et al, 2006).

*Leishmania sp.* são parasitas intracelulares obrigatórios, encontrados nas células do sistema mononuclear fagocítico, principalmente nas células de Kupffer do fígado, células reticulares e macrófagos do baço, resultando numa progressiva hipertrofia desses órgãos levando a hepatoesplenomegalia presente na infecção por este parasita. Estão adaptados a viver no interior de macrófagos, local onde as formas infectantes, amastigotas, são encontradas (NILDA, 2004; HERWALDT, B. L. 1999).

A leishmaniose visceral é uma enfermidade infecciosa, que pode apresentar em indivíduos infectados desde uma forma assintomática até uma doença de evolução fatal se não tratada. O curso clínico da doença pode depender tanto de fatores relacionados à natureza da resposta imune do hospedeiro, quanto à virulência do parasito. (KIRAR, 2003). É uma doença endêmica em várias regiões do Brasil e de alta letalidade principalmente em indivíduos não tratados e em crianças desnutridas. A leishmaniose também é considerada emergente em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), tornando-se uma das doenças mais importantes da atualidade (ANDRÉ et al, 2004).

O objetivo deste trabalho foi analisar a função do baço no controle da infecção por *Leishmania chagasi* através da avaliação do impacto da esplenectomia e do implante esplênico autógeno em camundongos BALB/c.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os animais foram obtidos do Centro de Biologia da Reprodução (CBRUFJF) e mantidos no setor de experimentação do Laboratório de Imunologia do ICBUFJF em microisoladores colocados em estantes ventiladas (Alesco). Os animais receberam ração comum e água ad libitum. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFJF (Protocolo nº 052/2007).

Foram utilizados 18 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, machos, a partir de quatro semanas de idade. Os animais foram divididos em três grupos: Controle operação simulada ou Sham (SH), Esplenectomizado (SP) e Autotransplantado em retroperitônio (RP). Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com solução de xilazina e quetamina (NaCl 0.9% + xilazina 2% + quetamina 5%) e sofreram uma laparotomia mediana, com esplenectomia total convencional. No grupo RP, parte do tecido esplênico ressecado (30%) foi fragmentado em duas partes e implantado (autotransplantado) no retroperitônio.

Após trinta dias de cirurgia, os animais foram infectados intraperitonealmente com 10<sup>6</sup> formas promastigotas de *Leishmania chagasi*. Para análise da produção de anticorpos IgG total foram colhidos cerca de 2ml de sangue de cada animal através de punção do plexo retro-orbital trinta dias após infecção. Logo após a coleta, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e foi realizada a retirada do baço e do fígado. Estes órgãos foram macerados, centrifugados e o sobrenadante coletado para avaliação da produção de citocinas.

A produção de anticorpos no soro e a avaliação dos níveis de citocinas (IFN-gama e TNF-alfa) no sobrenadante do macerado dos órgãos foram feitos

através do método de ELISA, seguindo a metodologia descrita pelo fabricante (Becton and Dickinson, São José CA-USA).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais do grupo controle tiveram produção maior de IFN-gama no fígado quando comparados aos outros grupos (Fig 1). Por outro lado, as células esplênicas do grupo submetido ao implante esplênico autógeno em retroperitônio tiveram produção maior dessa citocina quando comparado ao grupo que apresentava o órgão intacto (Fig 1). Essa inversão do perfil da produção de citocinas na infecção por *L. chagasi*, pode estar relacionado à captura por macrófagos e alteração na migração para o baço. Assim, este fato pode contribuir para a modificação da resposta imune no fígado. No entanto, Teixeira e cols (2008) demonstraram que na infecção por *S. aureus* animais controles e autotransplantados mantêm níveis semelhantes da produção de citocinas, por exemplo, o IFN-gama. Contudo, essas infecções comprometem preferencialmente órgãos distintos, por exemplo, *Leishmania* apresenta tropismo para baço e fígado, enquanto *Staphylococcus* é mais sistêmico. Além disso, a via de infecção utilizada no presente trabalho foi intraperitoneal e a do *S. aureus* foi via endovenosa, refletindo nos resultados obtidos.

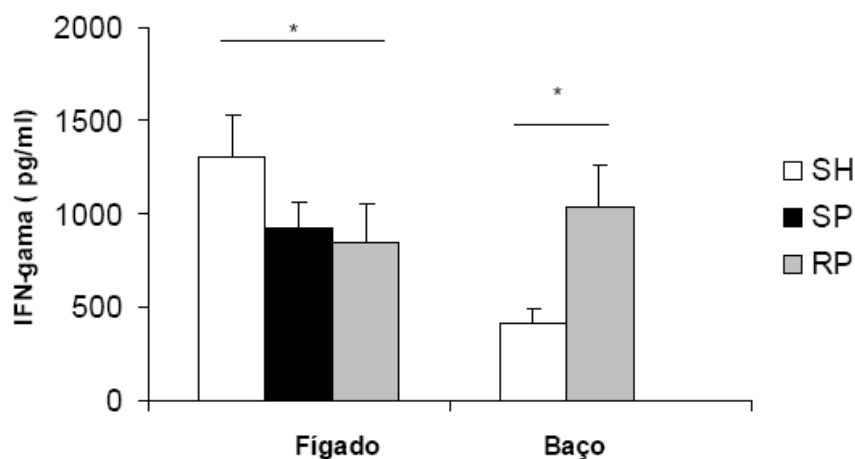


Figura 1: Produção de IFN-gama pelo baço e fígado em animais BALB/c infectados com *L. chagasi*, trinta dias após a infecção.

As células esplênicas do grupo autotransplantado em retroperitônio (RP) produziram níveis de TNF-alfa semelhantes quando comparados ao grupo controle (Fig 2). No entanto, quando se avaliou a produção de TNF-alfa pelo fígado, detectou-se menor produção dessa citocina nos animais do grupo SP. Já os animais dos grupos controle e RP não mostraram diferença significativa na produção de TNF-alfa no fígado (Fig. 2). Esses dados sugerem que os animais autotransplantados apresentaram comportamento semelhante aos animais com baço íntegro em relação a produção desta citocina no baço e fígado, que é importante no controle da infecção por *L. chagasi*. Por outro lado, a ausência de tecido esplênico nos animais esplenectomizados levou a redução dos níveis de TNFAlfa o que poderia comprometer a resposta imune protetora destes animais.



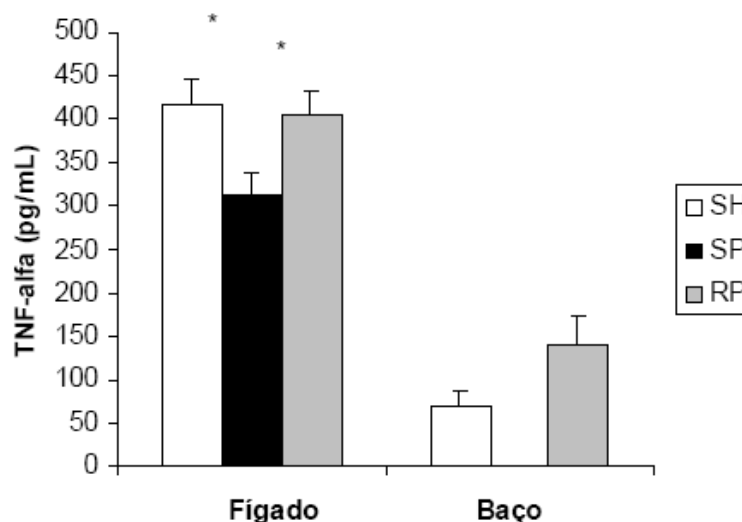


Figura 2: Produção de TNF-alfa pelo baço e fígado em animais BALB/c infectados com *L. chagasi*, trinta dias após a infecção.

Quando se avaliou os níveis de IgG nos soros dos animais submetidos a esplenectomia total houve menor detecção desses anticorpos (Fig. 3) quando comparados aos demais grupos. Nos animais controle houve maior produção de IgG total que o grupo RP e SP, demonstrando a importância do baço para a produção de imunoglobulinas. Além disso, o grupo RP mantém valores próximos da normalidade sugerindo que o implante esplênico autógeno preserva a capacidade de secreção de anticorpos semelhante ao órgão intacto (Rezende et al, 2007). No entanto, anticorpos anti-*Leishmania* não são importantes primariamente para proteção, mas podem estar envolvidos na patogênese da lesão tecidual (Mathias et al, 2001).

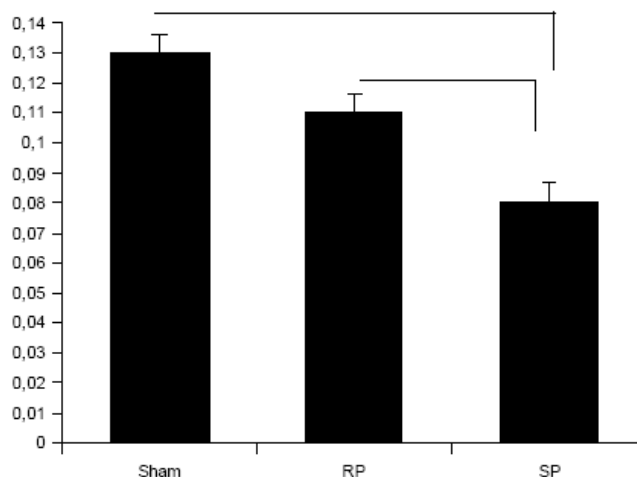


Figura 3: Produção de IgG total no soro de camundongos BALB/c infectados com *L. chagasi*, trinta dias após a infecção.

Estes dados sugerem que a esplenectomia pode modificar a produção de citocinas e a secreção de anticorpos do hospedeiro na infecção por *L. chagasi*, e o implante esplênico autógeno poderia reverter este processo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRÉ GUSTAVO TEMPONE, DANIEL PEREZ, SUSANNE RATH, ANDRÉ LUIS VILARINHO, Targeting *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. **J. Antimicrob Chemother.** 2004 Jul; 54(1):60-8.
- CAMARGO, L. B AND LANGONI, H. Impact of leishmaniasis on public health. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis**, 2006, vol.12, no.4, p.527-548.

- FATOUROS, M.; BOURANTAS, K.; BAIRAKTARI, E.; ELISAF, M.; TSOLAS, O.; CASSIOUMIS, D. Role of the spleen in lipid metabolism. **Br J Surg**, v. 82, n. 12, p.1675-1677, 1995.
- HERWALDT, B. L. 1999. Leishmaniasis. **Lancet** 354:1191–1199.
- KING H, SCHUMACKER, H. Splenic studies: susceptibility to infection after splenectomy performed in infancy. **Ann Surg**. 1952; 136:239-42.
- KIRAR. GANTT, STACEY SCHULTZ-CHERRY, NILDA RODRIGUEZ, SELMA M. B. JERONIMO, ELIANA T. NASCIMENTO, TODD L. GOLDMAN, THOMAS J. RECKER, MELISSA A. MILLER, AND MARY E. WILSON, Activation of TGF- by *Leishmania chagasi*: Importance for Parasite Survival in Macrophages. **The Journal of Immunology**, 2003, 170: 2613–2620.
- LIKHITE VV. Protection against fulminant sepsis in splenectomized mice by implantation of autochthonous splenic tissue. **Exp Hemat** 1978; 6 ; 433-39.
- NILDA E. RODRIGUEZ, HAEOK K. CHANG, AND MARY E. WILSON, Novel Program of Macrophage Gene Expression Induced by Phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **Infection and Immunity**, Apr. 2004, p. 2111–2122
- PETROIANU, A. Aspectos históricos do baço e da cirurgia esplênica. In: **O baço** São Paulo: CRL Baleiro, 2003a. Cap. 1, p. 3-15.
- PETROIANU, A. Avaliação da função fagocitária em remanescentes de esplenectomia subtotal e auto implante esplênico autógeno. **Rev Bras Hematol Hemoter** 2003;25(1);25-30.
- R MATHIAS, FAL COSTA, H GOTO. Detection of immunoglobulin G in the lung e liver of hamsters with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2001.
- RENATO A. MORTARA AND HEITOR FRANCO DE ANDRADE, Targeting *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs

entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2004); 54, 60–68.

RESENDE V, PETROIANU A. Estudo funcional tardio do autotransplante esplênico após trauma complexo do baço humano. *Rev Col Bras Cir.* 2001;28(3):165-8.

RESENDE V, PETROIANU A. Functions of the esplenic remnant after subtotal splenectomy for treatment of severe splenic injuries. **Am J Surg** 2003; 185(4); 311- 15.

Rezende AB, Nunes SI, Farias RE, Vieira FR, Petroianu A, Teixeira. HC. Influência do baço, da asplenia e do implante esplênico autógeno no metabolismo lipídico de camundongos. *Rev Col Bras Cir.* 2007; v.34 n.3.

TEIXEIRA, F. R.; FERNANDES, B. F.; REZENDE, A. B.; MACHADO, R. R. P.; ALVES, C. C. S.; PEROBELLI, S. M.; NUNES, S. I.; FARIAS, R. E.; RODRIGUES, M. F.; FERREIRA, A. P.; OLIVEIRA, S. C.; TEIXEIRA, H. C.; Staphylococcus aureus infection after splenectomy and autotransplation in BAB/c mice *Clin Exp Immunology.* 2008 (in press)