



ESTUDO QUANTITATIVO DAS CÉLULAS CALICIFORMES DO ÍLEO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM DIFERENTES ESPÉCIES DE *Leishmania spp*

Amanda Gubert Alves dos Santos (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Jessica de Paula Ferlini, Maria Valdrinez Campana Lonardoni, Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana, Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo (Orientador), e-mail: amanda_gubert@hotmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Ciências Biológicas, Parasitologia

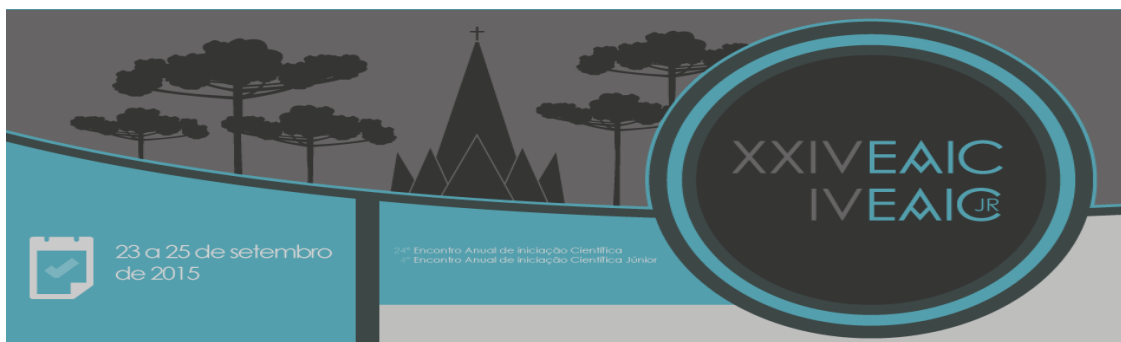
Palavras-chave: Parasitologia, protozoários, intestino

Resumo:

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Sua importância se deve à sua alta ocorrência, ampla distribuição geográfica e possibilidade de assumir formas clínicas graves. Há relatos na literatura demonstrando distúrbios intestinais em humanos e cães com leishmaniose visceral. Entretanto, pouco se conhece os efeitos causados por espécies agentes de LTA sobre a morfologia da parede intestinal. Portanto, o objetivo desse trabalho foi investigar possíveis alterações quantitativas em células caliciformes no íleo de camundongos. Para isso, foram inoculadas por via intraperitoneal formas promastigotas de *Leishmania (L) amazonensis* (LLA), *Leishmania (L) major* (LLM) e *Leishmania (V) braziliensis* (LVB) em camundongos fêmeas BALB/c. Setenta e duas horas após, os animais foram eutanasiados para remoção de um segmento do íleo, que posteriormente, foi submetido ao processamento histológico e coloração com ácido periódico de Schiff (PAS). Foi observado que as espécies LLA e LVB induziram aumento na proporção de células caliciformes, demonstrando que a infecção por estas espécies leva a alterações no epitélio intestinal.

Introdução

Diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* causam uma infecção parasitária chamada leishmaniose, uma doença cuja apresentação clínica varia bastante, dependendo da espécie do parasito envolvida. Pode



se apresentar desde úlceras cutâneas múltiplas ou únicas, a lesões mucosas e viscerais. Particularmente a espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* pode produzir a leishmaniose cutâneo difusa, a infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* é associada a formas mucosa e mucocutânea, enquanto que *Leishmania (L.) major* é agente etiológico da leishmaniose cutânea.

Em animais com infecção parasitária, ocorre a indução de processo inflamatório, podendo conduzir a alterações morfológicas teciduais. A presença do parasito associada à resposta imune pode levar a danos epiteliais, desorganizando a camada epitelial (BUZONI-GATEL; WERTS, 2006). Em estudos realizados com camundongos, áreas de inflamação intestinal, com infiltrados de células inflamatórias na lâmina própria, submucosa e camadas musculares foram observadas em infecções por protozoários (KASPER; BUZONI-GATEL, 2001). Alterações anatomopatológicas e infiltrado inflamatório foram encontrados na mucosa intestinal de humanos e animais com leishmaniose visceral. Entretanto, não há relatos relacionando LTA e o epitélio intestinal.

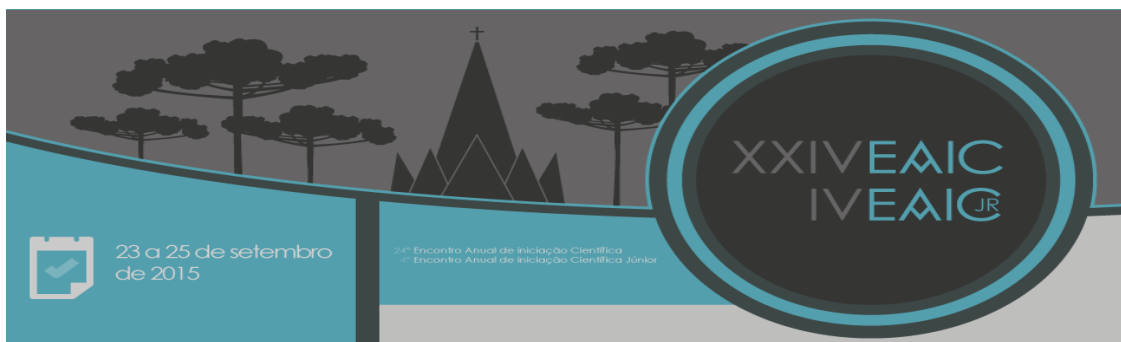
O epitélio intestinal é coberto por uma camada de muco que tem a função de proteção e é sintetizado e secretado por células caliciformes, que são células do epitélio intestinal. Em resposta a infecção por microrganismos e parasitos já foram observadas alterações nas células caliciformes e também na composição do muco (DEPLANCKE; GASKINS, 2001).

Logo, esse projeto teve como objetivo avaliar se a infecção causada por *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (L.) major* e *Leishmania (V.) braziliensis* causaria alterações quantitativas em células caliciformes do íleo de camundongos.

Materiais e métodos

Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas obtidas do biotério central da Universidade Estadual de Maringá. Esses animais foram infectados com a inoculação intraperitoneal de 0,1mL de uma suspensão contendo 2×10^8 parasitos/mL de cada espécie, preparada a partir de cultura de promastigotas em fase estacionária de crescimento. Foram constituídos quatro grupos de animais: Controle (C), *L. (L.) amazonensis* (LLA), *L. (L.) major* (LLM) e *L. (V.) braziliensis* (LVB). Setenta e duas horas após a inoculação das espécies de *Leishmania*, os animais foram submetidos à eutanásia, em seguida foi realizada laparotomia pela linha média, e o íleo do animal foi retirado, tendo como referência a prega ileocecal.

Um anel de um centímetro do íleo foi retirado e submetido à rotina histológica para obtenção de cortes transversais semi-seriados de 4µm, que foram corados pela técnica de ácido periódico de Schiff (PAS).



Foram contadas 2.500 mil células do epitélio da túnica mucosa de cada animal. Em seguida foram contadas as células caliciformes presentes e calculadas a proporção de células caliciformes/100 células epiteliais. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá sob o parecer 039/2013.

Os resultados foram submetidos ao teste D'Agostino-Pearson para verificar o tipo de distribuição. Os dados apresentaram distribuição normal e foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Utilizou-se a análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey, para a comparação entre os grupos considerando $\alpha=0,05$. Para executar as análises foi utilizado o software BioEstat 5.0 (Mamirauá).

Resultados e Discussão

O muco é um importante componente da barreira imune intestinal por formar um gel viscoso que previne o acesso e a adesão de microrganismos enterais no epitélio. Sua produção é aumentada em resposta a injúria da mucosa (WIEST; RATH, 2003). Os resultados obtidos a partir da contagem das células caliciformes podem ser observados na Figura 1. Na coloração realizada (PAS) ficam evidenciadas células produtoras de mucinas neutras e sialomucinas lábeis.

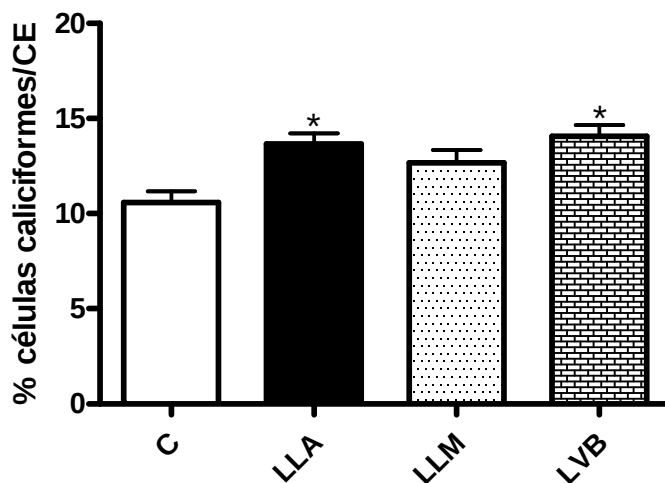
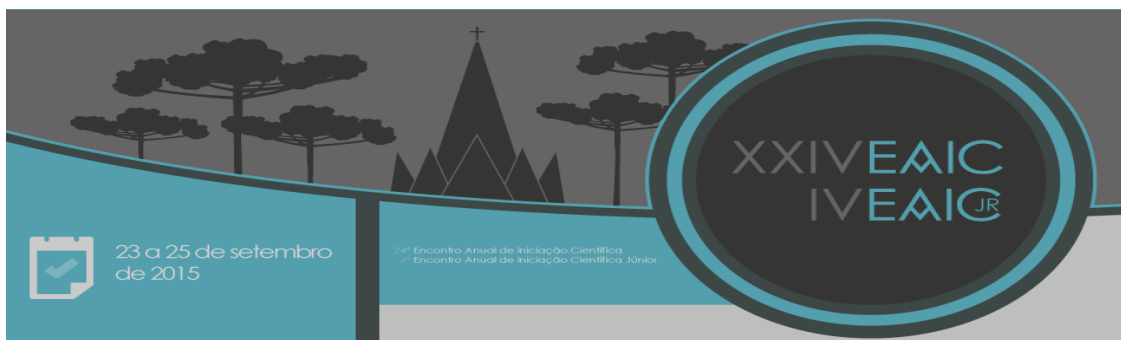


Figura 1 – Número de células caliciformes PAS+ em relação a 100 células epiteliais (CE) de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (LLA), *L. (L.) major* (LLM) e *L. (V.) braziliensis* (LVB). Os dados representam a média $\pm$ EPM. $n = 4$ animais por grupo, $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Nossos resultados demonstraram que a proporção de células caliciformes marcadas com PAS nos grupos LLA e LVB aumentou significativamente quando comparada ao grupo controle. Esse resultado sugere que o



equilíbrio na composição química do muco que recobre a mucosa está alterado com aumento na proporção de muco neutro que confere maior capacidade de proteção em meio aquoso (ZIESKE; BERNSTEIN, 1982). Possivelmente que esse achado seja uma resposta para proteção do epitélio intestinal. Não houve diferença significativa no percentual de células caliciformes quando comparadas as três espécies de *Leishmania*.

Conclusões

Concluimos que houve aumento na proporção de células caliciformes PAS+ no epitélio do íleo de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.

Agradecimentos

Fundação Araucária.

Referências

BUZONI-GATEL, D.; WERTS, C. Toxoplasma gondii and subversion of the immune system. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 10, p. 448-452, 2006.

DEPLANCKE, B.; GASKINS, H. R. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 1131S-41S, 2001.

KASPER, L. H.; BUZONI-GATEL, D. Ups and downs of mucosal cellular immunity against protozoan parasites. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 1-8, 2001.

ZIESKE, J. D.; BERNSTEIN, I. A. Modification of cell surface glycoprotein: addition of fucosyl residues during epidermal differentiation. **The Journal of Cell Biology**, v. 95, n. 2, p. 626-631, 1982.

WIEST R; RATH HC. Gastrointestinal disorders of the critically ill. Bacterial translocation in the gut. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**. 2003;17:397–425.