

**ESTUDO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR DIFERENTES CEPAS DE
Leishmania (Viannia) braziliensis SOBRE A PAREDE E CRIPTAS DO INTESTINO
DE *Mesocricetus auratus***

Bruna Cristina Pagliarini (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Maria Vitória Jacomini Silva (Biomédica), Lainy Leiny de Lima (Doutoranda), Amanda Gubert Alves dos Santos (Doutoranda), Thais Gomes Verzignassi Silveira (Docente), Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo (Coorientadora), Debora de Mello Gonçalves Sant Ana (Orientadora), e-mail: dmgsana@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Morfológicas/Maringá, PR.

**MORFOLOGIA
HISTOLOGIA**

Palavras-chave: leishmaniose, jejuno, cólon.

Resumo:

A leishmaniose é considerada um grande problema de saúde pública. As espécies de *Leishmania* se comportam de formas diferentes, dependendo do hospedeiro, da carga parasitária e da via de infecção, influenciando assim de forma distinta na resposta imune. Há relatos que podem promover distúrbios intestinais. Porém não existem estudos prévios sobre os efeitos da infecção causada por diferentes isolados de *L. (V) braziliensis* sobre o jejuno e o cólon de roedores. Sendo assim, o objetivo desse projeto foi compreender os efeitos da infecção sobre a estrutura do intestino de hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados via subcutânea por *L. (V.) braziliensis*. Foram utilizados hamsters adultos distribuídas aleatoriamente em 12 grupos (n=4), 6 grupos com 90 dias e 6 com 120 dias de infecção, sendo um grupo controle e cinco grupos infectados por diferentes isolados do protozoário para cada tempo de infecção. Após este período os animais foram submetidos a eutanásia e o jejuno e o cólon coletados para análise. Foram realizadas técnicas histológicas para mensuração da tela submucosa, túnica muscular total, largura e profundidade de criptas. Houve alterações significativas em todos os parâmetros analisados. A infecção por diferentes cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* promovem alterações morfológicas na parede e criptas do jejuno e cólon de hamsters.

Introdução

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença de caráter zoonótico que acomete o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos, podendo se manifestar através de diferentes formas clínicas. É considerada uma enfermidade polimórfica e espectral da pele e das mucosas (NEVES et al., 2016). No Brasil, é uma das doenças dermatológicas que merece mais atenção, devido a sua ampla distribuição geográfica, bem como, os danos físicos e psicológicos (BRASIL, 2017).

A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é um dos agentes da LTA, que pode provocar no homem lesões conhecidas popularmente por úlcera-de-Bauru, ferida brava, ferida seca e boubá. As lesões primárias são usualmente únicas, ou em pequeno número, mas frequentemente de grandes dimensões, com úlceras em forma de cratera. O curso da infecção é geralmente irregular e crônico e a tendência para cura espontânea varia de uma região geográfica para outra. Esta espécie é responsável pela forma cutânea mais destrutiva dentre as demais conhecidas (NEVES et al., 2016).

A doença humana é caracterizada por úlcera cutânea, única ou múltipla, cuja principal complicação é a metástase por via hematogênica ou linfática, para as mucosas da nasofaringe, com destruição desses tecidos (BRASIL, 2017; NEVES et al., 2016). Desse modo, a *Leishmania* tegumentar pode chegar a órgãos secundários ao local da infecção, por um mecanismo denominado visceralização. Estudos demonstraram que *L. (V.) braziliensis* podem migrar e causar alterações histopatológicas no baço, fígado e linfonodo (GOMES-SILVA, et al., 2013). Deste modo, o objetivo desse projeto foi compreender os efeitos da infecção sobre a estrutura do intestino de hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados via subcutânea por *L. (V.) braziliensis*.

Materiais e métodos

O protocolo experimental foi submetido à Comissão de Ética no uso de Animais da UEM (CEUA/UEM - 7587260416).

Parasitas e Animais

Foram utilizadas quatro cepas da espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis*, isoladas de pacientes da região noroeste do Paraná e mantidas pelo Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC), da UEM e identificadas no CLIOC – Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, MHOM/BR/2000/1655 (1655), MHOM/BR/2003/2311 (2311), MHOM/BR/2003/2314 (2314) e MHOM/BR/2009/3476 (3476), e uma cepa padrão MHOM/BR/1975/M2903 (2903).

Os animais de estudos foram hamsters fêmeas, da espécie *Mesocricetus auratus*, linhagem Dourada, com aproximadamente 90 dias de vida, provenientes do Biotério da UEM. As hamsters foram experimentalmente infectadas com 50µL (2×10^7) de promastigotas dos isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, no dorso da pata posterior esquerda. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos para cada tempo de infecção, 90 e 120 dias, um grupo controle e 5 infectados. Depois de

inoculados, os animais foram mantidos em biotério climatizado, com ração balanceada e água *ad libitum*.

Eutanásia, coleta de amostras e processamento histológico

Após o período de 90 e 120 dias de infecção, os hamster foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico em seguida foi realizada a laparotomia e coletado o jejuno e o cólon. Os seguimentos foram cortados em cortes transversais semi seriados de 4 μ m. Foram desparafinizados e corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) para mensuração da tela submucosa, túnica muscular total e criptas.

Medidas da tela submucosa, túnica muscular e largura e profundidade de criptas

Foram realizadas 64 medidas da tela submucosa, túnica muscular, largura e profundidade de criptas de cada animal em 16 imagens de cada fragmento, sendo no total 4 cortes, 1 imagem/quadrante/corte coradas por HE, na objetiva de 20x para o jejuno e 10x para o cólon.

Análise estatística

Foi realizado o teste ANOVA, com pós-teste de Tukey e os dados foram apresentados por média \pm erro padrão. Foi considerado um nível de significância de 5%, ($p \leq 0,05$).

Resultados e Discussão

Como resultados, observamos no jejuno, com 90 dias de infecção, aumento significativo da muscular total dos grupos 1655, 2314 e 2903 (87,19 \pm 8,752, 84,23 \pm 6,42 e 77,42 \pm 7,00 μ m) e na profundidade de criptas nos grupos 1655 e 2903 (121,7 \pm 3,93 e 147,4 \pm 7,133 μ m) se comparado ao grupo controle (GC), (52,76 \pm 1,03 e 78,51 \pm 7,90 μ m), respectivamente. Assim como diminuição da submucosa no grupo 2903 (10,13 \pm 1,53 μ m) e na largura de das criptas para os grupos 1655, 2311, 2314 e 2903 (35,39 \pm 2,54, 29,31 \pm 3,66, 36,14 \pm 4,24 e 32,66 \pm 0,61 μ m) se comprado ao GC (22,70 \pm 0,69 e 49,69 \pm 2,29 μ m), respectivamente.

Com 120 dias de infecção a muscular total diminuiu nos grupos 1655 e 2903 (74,48 \pm 2,64 e 70,31 \pm 0,44 μ m), assim como a submucosa dos grupos 1655, 2311, 2314, 2903 e 3476 (7,70 \pm 0,47, 7,89 \pm 0,089, 10,14 \pm 1,39, 8,66 \pm 0,69 e 9,22 \pm 0,33 μ m), se comparado ao controle (93,37 \pm 4,49 e 14,14 \pm 0,81 μ m), respectivamente. E houve um aumento da profundidade de criptas dos grupos 1655, 2314, 2903 e 3476 (76,84 \pm 0,6346, 78,10 \pm 0,28, 82,14 \pm 0,48 e 75,92 \pm 0,61 μ m), assim como, largura de cripta no grupo 2903 (40,72 \pm 1,49 μ m), se comparado ao GC (69,65 \pm 1,14 e 34,83 \pm 0,72 μ m), respectivamente.

Na infecção de 90 dias houve um aumento significativo da muscular do cólon dos grupos 2311, 2903 e 3476 (227,1 \pm 20,87, 163,1 \pm 17,01 e 247,1 \pm 13,41 μ m), assim como, submucosa (50,10 \pm 5,99 μ m) e profundidade de criptas (101,9 \pm 1,81) do grupo 1655 se comparado ao grupo não infectado (95,43 \pm 11,27, 29,67 \pm 3,69 e 73,42 \pm 3,56 μ m), respectivamente. Com 120 dias de infecção, a largura das criptas do grupo

1655 ($60,83 \pm 8,99 \mu\text{m}$) aumentaram e dos animais do grupo 2903 ($14,66 \pm 1,32 \mu\text{m}$) diminuíram se comparado ao GC ($40,56 \pm 2,70 \mu\text{m}$), em todos os testes foi considerado um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Santos e colaboradores (2018), também observaram diferença significativa no jejuno de hamsters infectados com o mesmo parasito do nosso estudo, não se restringindo ao local de inoculação, chegando a locais secundários como o intestino e o linfonodo mesentérico, causando alterações histopatológicas. Também evidenciaram a presença do DNA do parasito no intestino delgado dos animais infectados.

Conclusões

A infecção via subcutânea por diferentes cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* promovem alterações morfológicas na parede e criptas do jejuno e cólon de hamsters. Estas alterações podem ser devido à disseminação do parasito do local inicial da infecção para o órgão de estudo, causando aumento ou diminuição da espessura dependendo da cepa analisada. Essa mudança em espessura, pode ser devido à resposta imune do órgão a infecção.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao CNPq e a Fundação Araucária, pelo apoio financeiro e ao Departamento de Ciências Morfológicas e programa de Pós-graduação em Biologia Comparada da Universidade Estadual de Maringá (PGB-UEM), pela infraestrutura e apoio.

Referências

BRASIL. **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília: Ministério da Saúde: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2017.

NEVES, D.P. et al. **Parasitologia Humana**. 13. ed. São Paulo: Atheneu, 2016.

GOMES-SILVA, J.G. et al. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection, **Parasitology** 140 771–779, 2013.

SANTOS, A. G. A. et al. Insights of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) intestine. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 106, 1624–1632, 2018.