

A INFECÇÃO CRÔNICA POR DIFERENTES CEPAS DE *Leishmania (Viannia) braziliensis* NÃO CAUSA ALTERAÇÕES NOS MASTÓCITOS TOTAIS E SEROTONINÉRGICOS NO ÍLEO DE HAMSTERS

Erick Lincoln Carneiro (PIBIC/FA), Amanda Gubert Alves dos Santos, Lainy Leiny de Lima, Thaís Gomes Verzignassi Silveira, Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana, Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo, Andrea Claudia Bekner Silva Fernandes (Orientador), e-mail: acbsfernandes@gmail.com.

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

Farmácia / Análise toxicológica

Palavras-chave: leishmaniose, intestino delgado, mastócitos.

Resumo:

A espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis*, é uma das espécies causadoras de leishmaniose tegumentar mais importantes no Brasil. Essa espécie pode migrar para outros órgãos além da pele, como o intestino. Nesse órgão há, dentre outras células imunes, os mastócitos que têm grande importância na defesa do hospedeiro contra a infecção por estes protozoários. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a presença dos mastócitos totais e serotoninérgicos no íleo de hamsters infectados por diferentes cepas de *L. (V.) braziliensis*. Foram utilizadas 18 hamsters fêmeas separadas em três diferentes grupos: um grupo controle não infectado e dois grupos infectados com diferentes cepas de *L. (V.) braziliensis*. Os animais do grupo infectado receberam uma suspensão de 100µl de promastigotas (2×10^7 parasitos) de cada cepa via intradérmica no dorso da pata esquerda traseira, já no grupo controle, foi inoculado 100µl de tampão fosfato-salino estéril. Após 120 dias de infecção, as hamsters foram submetidas à eutanásia por meio de aprofundamento anestésico e foi coletado 1 cm do íleo para o processamento histológico. Foi realizada a quantificação de mastócitos totais em lâminas coradas com Azul de Toluidina e de mastócitos serotoninérgicos em lâminas imunomarcadas com anticorpos específicos. Nossos resultados demonstraram uma tendência à diminuição de ambas as populações de mastócitos após a infecção, porém, essas alterações não foram significativas. Logo, a infecção por *L. (V.) braziliensis* não causou alterações no número de mastócitos totais e serotoninérgicos no íleo de hamsters.

Introdução

A leishmaniose cutânea é uma doença que afeta principalmente pele e mucosas e é causada por diferentes protozoários do gênero *Leishmania*. A espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis*, é uma das espécies mais importantes no Brasil, onde encontramos altas prevalências da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Esta espécie é responsável pela maioria dos casos de leishmaniose cutânea, mucosa e disseminada, apresentando as lesões mais destrutivas e uma ampla distribuição geográfica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Contudo, existem relatos na literatura demonstrando que essa espécie migra para outros órgãos além da pele, como o intestino, onde foram encontradas diversas alterações histopatológicas (SANTOS, 2018). O intestino é um importante órgão imune que apresenta em grandes quantidades células para a defesa do organismo. Dentre elas, temos os mastócitos, que participam ativamente na inflamação (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017) e que têm grande importância na defesa do hospedeiro contra a infecção por *Leishmania* (TUON, 2008). Portanto, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar a presença dos mastócitos totais e serotoninérgicos no íleo de hamsters infectados por diferentes cepas de *L. (V.) braziliensis*.

Materiais e métodos

Animais

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais para Experimentação da Universidade Estadual de Maringá (parecer n. 7587260416). Foram utilizadas 18 hamsters fêmeas (*Mesocricetus auratus*) separadas aleatoriamente em três diferentes grupos (n = 6): um grupo controle não infectado e dois grupos infectados com diferentes cepas de protozoários da espécie *L. (V.) braziliensis*. Foram utilizadas as cepas: MHOM/BR/1975/M2903 (2903), considerada uma cepa padrão para o estudo da infecção e a cepa MHOM/BR/2000/1655 (1655) que foi isolada de um paciente atendido pelo Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá que apresentou a reativação da lesão aparentemente curada.

Delineamento experimental

As promastigotas de *Leishmania* foram descongeladas e cultivadas no meio 199 (Gibco Laboratories®, Grand Island, USA) suplementado com 1% L-glutamine, 1% urina humana e 10% de soro fetal bovino. Antes da infecção, os animais foram anestesiados com uma combinação de 10 mg/kg de xilazina (Calmiun Agener-Union Animal Health) e 50 mg/kg de ketamina (Francotar®- Virbac Animal health). Os animais do grupo infectado receberam uma suspensão de 100µl de promastigotas (2×10^7 parasitos) de cada cepa via intradérmica no dorso da pata esquerda traseira, já no grupo controle, foi inoculado 100µl de tampão fosfato-salino (PBS). Os animais foram mantidos em racks mini-isoladoras ventiladas com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12 h, com água e ração à vontade.

Análises histológicas

Após 120 dias de infecção, as hamsters foram submetidas à eutanásia por meio de aprofundamento anestésico e após laparotomia, foi coletado 1 cm do íleo para o processamento histológico, sendo obtidas lâminas com cortes semi-seriados de 5 µm. Foi realizada a quantificação de mastócitos totais por meio da contagem de todos os mastócitos presentes em 100 campos microscópicos (objetiva de 100x) em 4 cortes por animal em lâminas coradas com a técnica de Azul de Toluidina. Por meio de imunohistoquímica, foi realizada a imunomarcagem de mastócitos serotoninérgicos com anticorpos específicos para serotonina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). As lâminas foram relevadas com o stable DAB (Invitrogen™,

Carlsbad, CA, EUA) e contraincubadas com Hematoxilina. Essas células foram quantificadas em 50 campos microscópicos (objetiva de 40x) em 4 cortes por animal. *Análise estatística*

A distribuição dos dados foi considerada normal pelo teste de Shapiro-Wilk (BioEstat 5.0) e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste ANOVA seguido de Tukey (GraphPad Prism 8). Os dados foram apresentados pela média \pm desvio padrão, sendo considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

A espécie *L. (V.) braziliensis* é a principal responsável pelo agravamento da leishmaniose cutânea, podendo atingir as mucosas do hospedeiro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Além disso, Santos (2018), relatou a migração desse parasito para o íleo e linfonodo mesentérico de hamsters infectados nos mesmos moldes do nosso estudo. Além da migração do parasito, a autora também observou alterações morfológicas que podem sinalizar uma reação inflamatória e a atração de células imunes para a porção ileal desses animais (SANTOS, 2018).

Os mastócitos são células imunes que são encontradas em grandes quantidades no intestino, podendo secretar substâncias que atuam promovendo a inflamação, como a serotonina (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017). Essas células atuam também em processos infecciosos, inclusive na leishmaniose (TUON, 2008).

Os nossos resultados demonstraram que não houve alterações significativas no número de mastócitos totais e nem na subpopulação serotoninérgica após a infecção em nenhum dos grupos. Contudo, podemos observar uma diminuição na quantidade dessas células. Sendo que, nos mastócitos totais, a diminuição foi mais expressiva no grupo 2903, com aproximadamente 27%. Já nos mastócitos serotoninérgicos, a diminuição foi de aproximadamente 37% em ambos os grupos infectados (Figura 1).

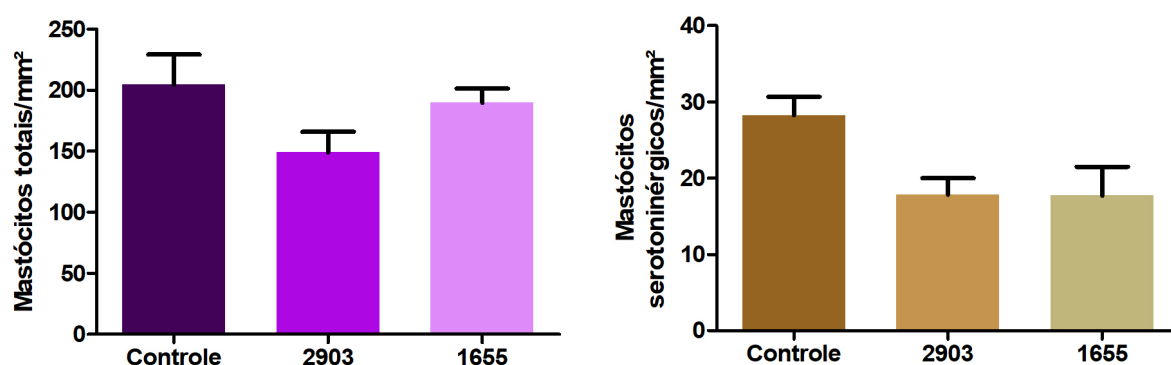


Figura 1 – Número de mastócitos totais e serotoninérgicos por mm² do íleo de hamsters infectadas por *L. (V.) braziliensis*. Controle: Grupo Controle. 2903: Grupo infectado com a cepa MHOM/BR/1975/M2903 de *L. (V.) braziliensis*. 1655: Grupo infectado com a cepa MHOM/BR/2000/1655 de *L. (V.) braziliensis*. Dados expressos em média \pm desvio padrão.

Assim, apesar de existirem relatos na literatura demonstrando que após a infecção crônica por *L. (V.) braziliensis*, são encontradas alterações que podem sinalizar uma reação inflamatória, como o aumento de linfócitos intraepiteliais, infiltrados

inflamatórios e ganglionite (SANTOS, 2018), não encontramos alterações significativas nas populações de mastócitos analisadas.

Entretanto, essa tendência à diminuição pode ser devida a alguns fatores, como o acometimento da medula óssea, já relatado em outros trabalhos após a infecção por *L. (V.) braziliensis* (SILVA et al., 2002). Os mastócitos são derivados de progenitores hematopoiéticos da medula óssea e o acometimento deste órgão poderia levar a uma diminuição na produção dessas células.

Atrelado a isso, a infecção por *L. (V.) braziliensis* provoca um aumento na migração dos mastócitos para o local da lesão (TUON, 2008), assim as células produzidas na medula óssea migram para a pele do animal, não repondo os mastócitos que degranularam no intestino.

Conclusões

A infecção crônica por *L. (V.) braziliensis* por diferentes cepas, não alterou quantitativamente os mastócitos totais e serotoninérgicos presentes no íleo de hamsters. Contudo, mais estudos precisam ser realizados para um melhor entendimento desta relação parasito-hospedeiro.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação Araucária, ao CNPq, ao Laboratório de Leishmanioses e ao Grupo de Pesquisa em Neurogastroenterologia da UEM.

Referências

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 13ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. 1. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2017.

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

SILVA, E. S. DA et al. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a patient infected with human immunodeficiency virus. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 3, p. 145–9, 2002.

TUON, F. F. et al. A quantitative and morphometric study of mast cells in cutaneous leishmaniasis. **Parasite immunology**, v. 30, p. 641-645, 2008.