

LEISHMANIOSE VISCERAL CAUSA ALTERAÇÕES NA MORFOMETRIA DA PAREDE E NAS CÉLULAS CALICIFORMES DO JEJUNO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS

Vivian Fuguhara de Lima (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Amanda Gubert Alves dos Santos, Herintha Coeto Neitzke Abreu, Jaqueline de Carvalho Rinaldi (Coorientador) Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo (Orientador), e-mail: ganmelo2@uem.br.

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

Ciências da Saúde - Farmácia

Palavras-chave: *Leishmania infantum chagasi*, intestino delgado, histologia.

Resumo:

O cão é o principal reservatório na área urbana do protozoário *Leishmania infantum chagasi* agente da leishmaniose visceral, uma doença crônica e sistêmica grave que pode ser fatal quando não tratada. Essa doença pode afetar órgãos como medula óssea, baço, fígado e linfonodos e tecidos como o sanguíneo, pulmonar, renal e digestório. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da leishmaniose visceral sobre a morfometria da parede intestinal e a quantidade de células caliciformes do jejuno de cães naturalmente infectados por *L. i. chagasi*. Foram utilizados 10 cães divididos em dois grupos: grupo controle (GC; n=4) e grupo infectado (GI; n=6). Os animais utilizados provieram do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Campo Grande, local no qual se realizou a eutanásia e a coleta do jejuno, os órgãos foram enviados para a Universidade Estadual de Maringá (UEM), onde foram fixados e processados histologicamente, foram utilizadas as técnicas de Hematoxilina e Eosina, Ácido Periódico de Schiff, Alcian-Blue pH 1,0 e 2,5, para análise morfométrica da parede e análise quantitativa de células caliciformes. Os resultados obtidos demonstraram que houve diminuição da espessura da camada muscular circular e total e aumento do número das células secretoras de mucinas, quando comparado o GI com o GC. Dessa forma, conclui-se que a infecção por *Leishmania infantum chagasi* provocou alterações significativas na espessura da camada muscular circular e total da parede do jejuno e hiperplasia de células caliciformes em cães naturalmente infectados.

Introdução

O cão é o principal reservatório na área urbana do protozoário *Leishmania infantum chagasi* que causa a leishmaniose visceral (LV), uma doença crônica e sistêmica grave que pode ser fatal quando não tratada (NEVES, 2016). É transmitida durante o repasto sanguíneo das fêmeas de flebotomíneos infectadas da espécie *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor no Brasil. Essa doença pode afetar vários órgãos tais como medula óssea, baço, fígado e linfonodos, além de acometer os tecidos sanguíneo, pulmonar, renal e digestório (NEVES, 2016).

O intestino delgado é responsável pela digestão final dos alimentos, absorção dos nutrientes e secreção endócrina. Ele é subdividido em três segmentos histologicamente semelhantes, mas que apresentam diferenças que permitem sua identificação como o duodeno, jejuno e o íleo. No epitélio intestinal, encontramos diversos tipos celulares, como as células caliciformes que secretam mucinas, que ao entrar em contato com a água presente no lúmen, formam o muco para a proteção do epitélio intestinal (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017).

Atualmente, existem estudos que apresentam as alterações na parede intestinal em cães com LV (SILVA, 2015). No entanto, não são apontados todos os aspectos dessas mudanças. Desse modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar as alterações morfológicas da parede jejunal e quantitativas das células caliciformes de cães com leishmaniose visceral.

Materiais e métodos

Delineamento Experimental

O protocolo experimental foi aprovado (protocolo 27/2016) pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Grande Dourados. Foram utilizados 10 cães distribuídos em dois grupos: Grupo Controle (GC; n=4) e Grupo Infectado (GI; n=6). O grupo GC foi formado por cães com sorologia negativa e o grupo GI foi formado por animais que adquiriram naturalmente a LV apresentando sorologia positiva (técnica de ELISA e teste rápido DPP® LV Canina).

Coleta e processamento histológico

A eutanásia foi realizada sob anestesia com tiopental sódico, seguido da administração de cloreto de potássio no Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande. Em seguida foi coletado aproximadamente 5 cm do jejuno dos animais, este foi fixado em paraformaldeído tamponado a 4% e enviado para a Universidade Estadual de Maringá, onde o material foi submetido à rotina histológica, sendo embocado em parafina e realizado cortes transversais semi-seriados de 5µm, os quais foram corados pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina (HE), Ácido Periódico de Schiff (PAS), Alcian-Blue pH 1,0 e 2,5 (AB-1,0 e AB-2,5).

Análise morfológica da parede intestinal

Para análise morfológica foram utilizadas as lâminas coradas pela técnica de HE, as quais foram capturadas na objetiva de 4X em um microscópio óptico (MOTIC®) equipado com câmera de vídeo associada a um sistema computadorizado de análise de imagem (Image Pró-Plus 4.0). Foram obtidas 16 imagens de cada animal para a realização da mensuração da profundidade e largura das criptas, espessura da túnica submucosa e das camadas musculares longitudinal, circular e total.

Análise quantitativa das células caliciformes

Para análise quantitativa foram utilizadas as lâminas coradas em PAS, AB-1,0 e AB-2,5. Os cortes foram divididos em quatro quadrantes, totalizando 16 quadrantes por animal por coloração, em cada quadrante foram contadas 160 células do epitélio intestinal (total = 2.560 células/animal/coloração) e as células secretoras presentes entre estas células em um microscópio óptico (Nikon Eclipse E200) utilizando a

objetiva de 40X. Em seguida foi calculada a proporção de células caliciformes/100 células epiteliais.

Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste D'Agostino ou D'Agostino Pearson para analisar o tipo de distribuição no programa BioEstat. Posteriormente, dados com distribuições normais, foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão e comparados entre os grupos por Teste T e os com distribuição livre foram apresentados como mediana (Percentil 25%; Percentil 75%) e avaliados por Teste T seguido de Mann-Whitney no programa GraphPad Prism 5.0. Foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Em nosso estudo foi possível observar uma diminuição significativa de 26,48% na espessura da camada muscular circular no grupo GI ($497,60 \pm 77,52 \mu\text{m}$) em relação ao grupo GC ($676,80 \pm 163,00 \mu\text{m}$) e de 28,17% na camada muscular total no grupo infectado naturalmente por *L. i. chagasi* ($683,00 \pm 112,60 \mu\text{m}$) comparado ao grupo controle ($950,80 \pm 196,10 \mu\text{m}$) (Figura 1). Tais resultados contradizem os apresentados por Souza et al. (2019), que observaram aumento nessas camadas no íleo de camundongos selvagens infectados experimentalmente por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, em animais geneticamente deficientes em células B-1. Paciello et al. (2009) observaram que as fibras musculares do músculo bíceps femoral de cães infectados naturalmente por *L. infantum* apresentaram sinais de regeneração muscular, assim como variação acentuada na dimensão das fibras, as quais estavam desde atroficas à hipertroficas. Ademais, o estudo de tais autores fornece evidências de que o dano muscular pode estar relacionado à mecanismos imunomediados associados à infecção.

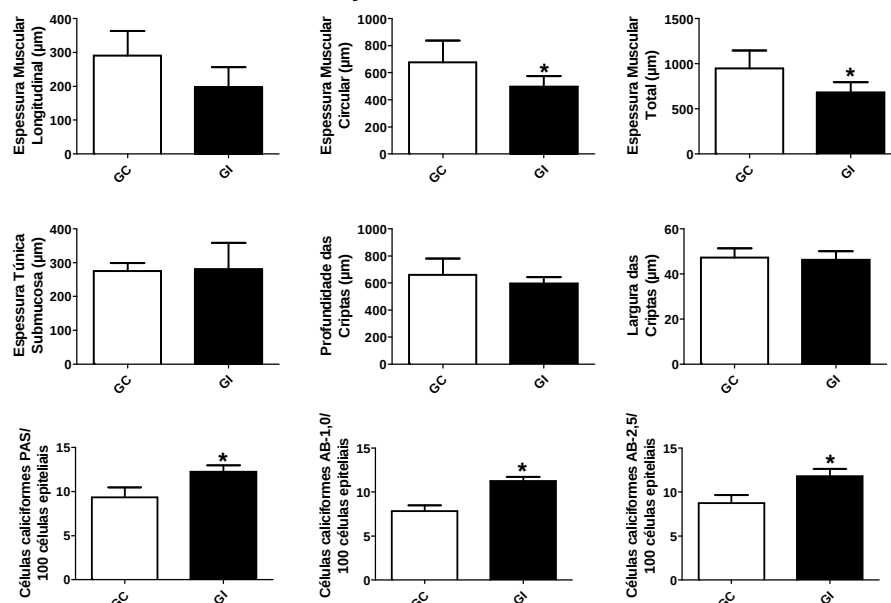


Figura 1 – Morfometria da parede intestinal do jejuno (μm) e número de células caliciformes em 100 células epiteliais no PAS, AB-1,0 e AB-2,5. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Grupo Controle (GC) e Grupo Infectado (GI). * indica significância estatística com $p < 0,05$.

Além disso, a espessura da camada muscular longitudinal não apresentou diferença estatística entre o grupo GI ($198,10 \pm 58,94 \mu\text{m}$) e o GC ($291,20 \pm 72,22 \mu\text{m}$), apesar de haver uma diminuição de aproximadamente 32%, o que pode estar associado ao alto desvio padrão dos dados. As demais análises realizadas, espessura da túnica submucosa [GC: 270,9 (254,2; 300,0) μm ; GI: 251,1 (219,0; 360,5) μm], profundidade [GC: 635,0 (557,8; 783,0) μm ; GI: 575,8 (562,2; 639,0) μm] e largura [GC: 46,06 (44,39; 51,39) μm ; GI: 45,62 (42,76; 49,62) μm] das criptas, não sofreram alterações significativas ao se comparar os grupos analisados (Figura 1).

As células caliciformes produzem e secretam glicoproteínas ácidas (mucina), que são hidratadas formando o muco, que é de extrema importância para a proteção e lubrificação do revestimento intestinal (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017). No presente estudo, observamos um aumento significativo no número dessas células ao se comparar o grupo GI (PAS: $12,25 \pm 0,73$; AB-1,0: $11,26 \pm 0,46$ e AB-2,5: $11,79 \pm 0,84$) com o GC (PAS: $9,36 \pm 1,11$; AB-1,0: $7,83 \pm 0,65$ e AB-2,5: $8,75 \pm 0,91$), o que demonstra um aumento de 30,88% (PAS); 43,81% (AB-1,0) e 34,74% (AB-2,5) (Figura 1). Essa hiperplasia das células secretoras pode se tratar de uma resposta a infecção por *L. i. chagasi* para proteção do intestino.

Conclusões

A leishmaniose visceral provocou alterações significativas na espessura da camada muscular circular e total do jejuno, assim como hiperplasia de células caliciformes no epitélio intestinal em cães naturalmente infectados, quando comparados com animais com sorologia negativa para a doença.

Agradecimentos

A Fundação Araucária e ao Laboratório de Neurogastroenterologia.

Referências

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**: texto e atlas. 13 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 13 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2016.

PACIELLO, O. *et al.* Canine inflammatory myopathy associated with *Leishmania infantum* infection. **Neuromuscular Disorders**, v. 19, n. 2, p. 124-130, 2009.

SILVA, D. T. **Estudo das células mononucleares e polimorfonucleares no intestino de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum***. 2015. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia, Unesp, Ilha Solteira, 2015.

SOUZA, K. D. *et al.* Infection by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* causes intestinal changes B-1 cells dependent. **Parasite Immunology**, v. 41, n. 9, 2019.