

INFECÇÃO CRÔNICA POR *Leishmania (Viannia) braziliensis* LEVA AO AUMENTO DE TGF- β NO ÍLEO DE HAMSTERS

Erick Lincoln Carneiro (PIBIC/UEM), Andrea Claudia Bekner Silva Fernandes, Thaís Gomes Verzignassi Silveira, Debora de Mello Gonçalves Sant'Ana, Amanda Gubert Alves dos Santos (Coorientadora), Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo (Orientadora), e-mail: c-erick17@live.com.

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

Ciências da Saúde - Farmácia

Palavras-chave: leishmaniose, intestino delgado, fator de crescimento transformador beta

Resumo:

A principal espécie causadora de leishmaniose cutânea é a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, porém, além das lesões na pele, já foram reportadas alterações intestinais em animais infectados por este protozoário. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de TGF- β e quantificar as células produtoras da citocina no íleo de animais infectados por *L. (V.) braziliensis*. Para isso, foram utilizadas hamsters distribuídas em 6 grupos: dois grupos controles e quatro grupos infectadas por duas cepas de *L. (V.) braziliensis*: MHOM/BR/1975/M2903 e MHOM/BR/2000/1655. Após 90 ou 120 dias de infecção, os animais foram submetidos à eutanásia e foi coletado aproximadamente 1 cm do íleo de cada animal para a realização da técnica de imunohistoquímica para a marcação de TGF- β . A análise das lâminas foi realizada em 16 imagens capturadas em objetiva de 40X sendo 1 imagem/quadrante/corte/animal. Foi realizada a contagem das células e a determinação das áreas imunorreativas a TGF- β na camada mucosa e submucosa e na camada muscular separadamente. Para as análises estatísticas, foi realizada a proporção para 1 mm². Nossos resultados mostraram que há um aumento tanto do número de células que expressam o TGF- β quanto da área intestinal marcada. Logo, a infecção crônica por *L. (V.) braziliensis* causa aumento de TGF- β no íleo de hamsters.

Introdução

As leishmanioses estão presentes em 18 países das Américas e a principal forma encontrada é a leishmaniose cutânea (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2019). O Brasil é considerado endêmico para a doença, tendo reportado no ano de 2017, mais de 17 mil novos casos (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2019), sendo a espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* a mais importante no país, devido a sua ampla distribuição geográfica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Em infecções com essa espécie, já foram demonstradas alterações histopatológicas e a presença no intestino (SANTOS et al., 2018). Essas alterações possivelmente estão relacionadas com um processo inflamatório (SANTOS et al., 2018), por isso se faz importante o estudo de outros fatores que podem estar envolvidos, como por exemplo, o fator de crescimento transformador beta (TGF- β). Esta citocina participa da manutenção da homeostase intestinal, mas pode ter papel relevante nas doenças inflamatórias intestinais (DII) (FEAGINS et al., 2010). Portanto nosso objetivo foi avaliar a expressão de TGF- β e quantificar suas células produtoras no íleo de hamsters fêmeas infectadas por *L. (V.) braziliensis*.

Materiais e métodos

Animais

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá sob o parecer número 7587260416. Para a realização deste trabalho, 24 hamsters (*Mesocricetus auratus*) fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em 6 grupos: dois grupos controles (GC) e quatro grupos infectados por duas cepas de *L. (V.) braziliensis*. Dois grupos foram infectados pela cepa MHOM/BR/1975/M2903 (2903), considerada padrão, e os demais pela cepa MHOM/BR/2000/1655 (1655), que foi isolada de um paciente atendido pelo Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da UEM.

Delineamento experimental

Os parasitos foram obtidos no Laboratório de Leishmanioses da UEM. Após descongelados, foram cultivados no meio 199 (Gibco Laboratories®, Grand Island, USA) suplementado com 1% Lglutamine, 1% urina humana e 10% de soro fetal bovino. Antes da infecção, as hamsters foram anestesiadas com uma combinação de 10 mg/kg de xilazina (Calmiun Agener-Union Animal Health) e 50 mg/kg de ketamina (Francotar®- Virbac Animal health). Nos grupos infectados, foi inoculada uma suspensão de 100 μ l de promastigotas (2×10^7 parasitos) de cada cepa via intradérmica no dorso da pata esquerda traseira e no grupo controle, foi inoculado 100 μ l de tampão fosfato-salino. Os animais foram mantidos em racks isoladoras ventiladas com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12 h, com água e ração à vontade.

Coleta de Material Biológico

Três grupos foram submetidos à eutanásia por meio de aprofundamento anestésico após 90 dias de infecção e demais após 120 dias. Foi então coletado aproximadamente 1 cm do íleo de cada animal para o processamento histológico e realização de cortes semi-seriados de 5 μ m.

Análise imuno-histoquímica

As lâminas contendo os cortes histológicos foram desparafinizadas, e passaram por recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena e das reações não específicas. A amostra foi então incubada com o anticorpo primário para marcação de TGF- β (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA) e posteriormente incubada com o polímero conjugado (Life Technologies Corp., Frederick, MD, EUA). A revelação foi realizada pela

coloração castanha do cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA) e contracorada com hematoxilina. A análise das lâminas foi realizada a partir de 16 imagens capturadas em 4 cortes histológicos na objetiva de 40X (1 imagem/quadrante/corte/animal), onde foram contadas as células e determinadas as áreas correspondentes a marcação de TGF- β na camada mucosa e submucosa e nas camadas musculares separadamente. Para as análises estatísticas, foi realizada a proporção para 1 mm².

Análise estatística

A distribuição dos dados foi considerada normal a partir do teste de Shapiro-Wilk e a comparação realizada pelo teste ANOVA seguido de Tukey, sendo representados por média \pm erro padrão. Foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

A espécie *L. (V.) braziliensis* causa não apenas lesões na pele e mucosas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017) mas também pode causar alterações histopatológicas que podem sinalizar um processo inflamatório em órgãos como o intestino (SANTOS et al., 2018). Assim, se faz necessário o estudo de fatores que podem estar envolvidos nesse processo, como o TGF- β .

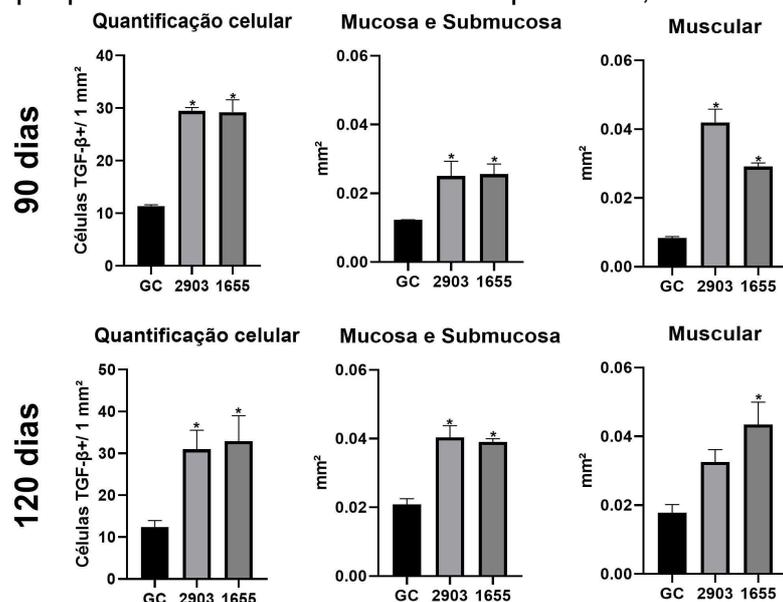


Figura 1 – Representa a quantificação das células e da área imunorreativa por TGF- β na camada mucosa, submucosa e muscular por 1 mm² de animais infectados por 90 ou 120 dias por *L. (V.) braziliensis*. GC: Grupo controle. 2903: Grupo infectado pela cepa MHOM/BR/1975/M2903. 1655: Grupo infectado pela cepa MHOM/BR/2000/1655. * $p < 0,05$.

Ao analisarmos as lâminas imunomarcadas com anticorpos específicos para TGF- β , observamos um aumento na contagem das células imunorreativas nos dois grupos infectados em ambos os tempos (90 dias – 2903: 29,45 \pm 0,65 células/mm²; 1655: 29,20 \pm 2,39 células/mm². 120 dias – 2903: 31 \pm 1,55 células/mm²; 1655: 32,88 \pm 6,07 células/mm²) ao comparar com os respectivos controles (90 dias: 11,38 \pm 0,22 células/mm². 120 dias: 12,36 \pm

1,55 células/mm²). Nas camadas mucosa e submucosa, a área imunomarcada por TGF- β , aumentou aproximadamente 50% nos dois tempos de infecção em ambos os grupos infectados. Na muscular, aos 90 dias, houve um aumento de 80% no grupo 2903 e 72% no 1655, enquanto aos 120 dias, houve apenas um aumento de 60% no 1655 (Figura 1).

Santos e colaboradores (2018), observaram alterações nos enterócitos e aumento de linfócitos intraepiteliais, vilos, criptas e das camadas musculares e submucosa no íleo de animais infectados cronicamente por *L. (V.) braziliensis*. Uma vez que o TGF- β está relacionado com a manutenção da homeostase intestinal (TRONCONE et al., 2018), essa citocina pode estar aumentada na tentativa de regular a inflamação no local. Por outro lado, essa citocina também está envolvida na diferenciação das células T virgens em células Th17, que são consideradas pró-inflamatórias e importantes na manutenção da inflamação nas DII crônicas (FEAGINS et al., 2010).

Conclusões

A infecção crônica por *L. (V.) braziliensis* causa aumento na expressão e das células produtoras de TGF- β no íleo de hamsters. Mais estudos precisam ser realizados para a elucidação dos mecanismos envolvidos na resposta imune e inflamação intestinal desencadeada pela infecção.

Agradecimentos

Agradecemos à UEM pela oportunidade e pela bolsa, ao CNPq e a CAPES pelo financiamento do projeto e ao grupo de Neurogastroenterologia/UEM.

Referências

FEAGINS, L. A. Role of transforming growth factor- β in inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 16, n. 11, p. 1963–1968, 1 nov. 2010.

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

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas**. Washington: Organização Pan-Americana da Saúde, 2019.

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.

TRONCONE, E. et al. Transforming Growth Factor- β 1/Smad7 in Intestinal Immunity, Inflammation, and Cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 20 jun. 2018.