

## **ESTUDO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR DIFERENTES CEPAS DE *Leishmania (Viannia) braziliensis* SOBRE O COLÁGENO INTESTINAL DE *Mesocricetus auratus***

Vitória Rodrigues Soares (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Amanda Gubert Alves dos Santos, Lainy Leiny de Lima (coorientadora), Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana (Orientadora), e-mail: dmgsana@uem.br

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

**Área do conhecimento:** Morfologia **Subárea:** Histologia

**Palavras-chave:** Leishmaniose, fibras colágenas, trato gastrointestinal.

### **Resumo**

A leishmaniose é uma das doenças infecto-parasitárias endêmica no Brasil. Há relatos que a doença em sua forma tegumentar atinge também o intestino, todavia, não há estudos que demonstrem que a *Leishmania (Viannia) braziliensis* interfere na quantidade da proteína mais abundante do intestino, o colágeno. Deste modo, o objetivo deste estudo foi compreender o efeito da infecção de diferentes isolados da espécie de *L. (V) braziliensis* sobre o colágeno do tipo I e III do intestino delgado e grosso de hamsters fêmeas distribuídas em 12 grupos (n=4), 6 grupos com 90 dias e 6 grupos com 120 dias de infecção, um grupo representando o grupo controle não infectado e cinco grupos representando o grupo infectados por diferentes isolados do protozoário para cada tempo de infecção. Após o período de infecção, as hamsters foram submetidas à eutanásia por aprofundamento anestésico e foi coletado o jejuno e o cólon para realização de técnicas histológicas, *PicroSiriusRed*, para evidênciação de fibras colágenas. Como resultado observamos mudanças no padrão quantitativo de colágeno de alguns isolados, apesar da *L. (V.) braziliensis* ser uma espécie conhecida por seu alcance tegumentar, pode estar ligada ao processo de visceralização da doença.

### **Introdução**

As leishmanioses são consideradas pela Organização Mundial da Saúde uma enfermidade de grande importância na saúde pública global. Na América do Sul e Central 11 espécies de *leishmanias* podem causar a leishmaniose tegumentar, entre elas se encontra a *Leishmania (Viannia) braziliensis* (LVB) (ALVES, 2009).

É possível observar que diferentes cepas de LVB podem alterar morfológicamente o íleo de hamsters, bem como migrar de sítio anatômico para as outras porções intestinais (SANTOS, 2018). Deste modo, o objetivo desse projeto foi estudar o efeito da infecção por diferentes isolados de LVB sobre as fibras colágenas tipo I e III no intestino delgado e grosso de hamsters da espécie *Mesocricetus auratus*.

## Materiais e métodos

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) sob nº 7587260416.

As infecções dos animais foram realizadas com quatro cepas da espécie LVB, adquiridas a partir de pacientes atendidos no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas - UEM, posteriormente isoladas e identificadas na Coleção de *Leishmanias* do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (CLIOC), foram então selecionadas cinco cepas, cada qual pelo perfil de sensibilidade a Glucantime observado durante o tratamento dos pacientes, sendo elas MHOM/BR/2003/2314 (2314), MHOM/BR/2003/2311 (2311), MHOM/BR/2003/1655 (1655), MHOM/BR/2009/3476 (3476) e MHOM/BR/1975/M2903 (2903), classificadas respectivamente como susceptível, moderadamente resistente, com reativação após o tratamento, com comportamento atípico e por fim, a cepa de referência para LVB.

Para a infecção foi administrado 50µL de suspensão contendo  $2 \times 10^7$  promastigotas dos isolados das cepas selecionadas no dorso do membro posterior esquerdo de hamsters fêmeas com aproximadamente 90 dias de idade da espécie *Mesocricetus auratus*, linhagem dourada, providas do Biotério da UEM. Estes animais foram separados em dois tempos de infecção (90 e 120 dias), 6 grupos para cada tempo, um grupo controle (GC) e 5 grupos infectados para cada tempo de infecção.

Os animais foram mantidos em biotério climatizado e submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico com vapor de halotano. Os segmentos de intestino foram coletados e submetidos a rotina histológica, cortados em cortes transversais semiseriados de 4 µm e corados com a técnica de *Picro Sirius Red* para evidência das fibras colágenas tipo I e III.

A obtenção dos resultados se deu por captura de 16 imagens da tela submucosa de cada animal e de cada órgão, 4 cortes, 1 imagem/quadrante/corte/órgão, coradas por *Picro Sirius Red* e posteriormente a análise destas imagens, gerando dados que foram analisados estatisticamente.

Foi aplicado o teste de D'Agostino-Pearson para a verificação dos dados, que se apresentaram normais, deste modo, aplicado ANOVA para análise estatística entre os grupos, os dados foram representados pela média  $\pm$  erro padrão, considerando um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## Resultados e Discussão

No jejuno, após 90 dias de infecção houve uma menor quantidade de colágeno do tipo I e III em todos os em relação ao Grupo Controle, porém sem diferença significativa entre si. Já no cólon, observamos diminuição significativa apenas do colágeno do tipo III no grupo 2903, se comparado ao controle, com 120 dias de infecção (Figura 1). Com 120 dias de infecção apenas o grupo 2903 apresentou diferença se comparado ao GC no subtipo de colágeno III (Figura 1).

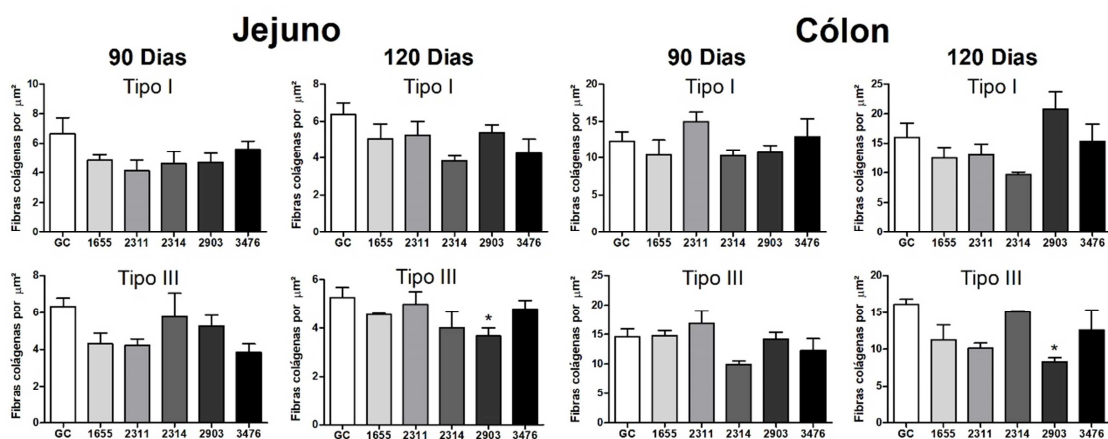


Figura 1 – Área em  $\mu m^2$  de fibras colágenas tipo I e tipo III em dois tempos de infecção (90 e 120 dias) no Jejuno e Cólon de hamsters infectados por diferentes idótipos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (1655, 2311, 2314, 2903 e 3476) se comparado ao grupo controle (GC). \* indica diferença significativa dos grupos infectados em relação ao GC.

Estudos com leishmaniose tegumentar demonstram que o comportamento patológico da parasitose não se resume em injúria do tecido tegumentar, como expõe Cardoso (2012) quando relatou que camundongos infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* reagiram com uma produção mista de citocinas em vários órgãos independentes da linhagem genética dos animais e com isso, a promoção da redução da expressão proteica na matriz extracelular, como a fibronectina e colágeno no fígado e linfonodos.

Já Moitinho (2019) em estudo com a mesma espécie de parasito do nosso experimento, observou lesões tegumentares de humanos há destruição da matriz extracelular, sugerindo que as reações inflamatórias ocasionadas pelo parasito estão ligadas a progressão da doença. Logo as

fibras colágenas presente em abundância na matriz extracelular também seriam afetadas pela LVB, como observada na cepa 2903, após 120 dias de infecção no jejuno e cólon.

A redução do colágeno tipo III em ambos os órgãos de nosso estudo nos permite traçar um paralelo com o estudo de linfonodos de cães infectados por *Leishmania chagasi*, que mostra que este subtipo de colágeno menos abundante sugerindo uma substituição do colágeno III pelo I (KONDO, 2009), como observados em nossos resultados, apesar de não haver alterações significativas no colágeno tipo I.

### Conclusões

Concluimos que apesar de a infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* ser relatada com comportamento tegumentar, ela pode visceralizar, e promover alterações na dinâmica de colágeno no intestino delgado e grosso de hamsters.

### Agradecimentos

Ao PIBIC/CNPq/FA/Uem, a minha orientadora e coorientadora, e a todos do laboratório de pesquisa de neurogastroenterologia da UEM.

### Referências

ALVES, W. A. Leishmaniose visceral americana: situação atual no Brasil. BEPA, **Bol. Epidemiol. Pausl.** (Online), São Paulo, n.6, n. 71, nov. 2009.

CARDOSO, F. C. **Infecção por *Leishmania amazonenses* em camundongos sensíveis e resistentes alterações na matriz extracelular, perfil de citocinas e caracterização do infiltrado inflamatório.** 2012. 135 f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.

KONDO, Kris Régia J. et. al. Análise histomorfométrica da matriz extracelular do linfonodo poplíteo de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*. **Pesq. Vet. Bras**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 8, p. 610, Aug. 2009.

MOITINHO, J., VALALDOMIRO, S. **Perfil de transcriptoma imune revela um mecanismo de degradação de matriz extracelular na leishmaniose cutânea humana.** 2019. 70 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz; Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2019.

SANTOS, A.G.A.D.; LIMA, L.L.; MOTA, C.A.; GOIS, M.B.; FERNANDES, A.C.B.S.; SILVEIRA, T.G.V.; SANT'ANA, D.M.G.; NOGUEIRA DE MELO, G.A. Insights of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) intestine. **Biomed Pharmacother**, v.106, p.1624-1632, 2018.