

LEISHMANIOSE VISCERAL NÃO ALTERA O NÚMERO DE CÉLULAS PRODUTORAS DE MUCINAS NO ÍLEO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS

Mariana Sacchi Silva (PIBIC/FA/UEM), Amanda Gubert Alves dos Santos, Herintha Coeto Neitzke Abreu, Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo (Coorientador) Andrea Claudia Bekner Silva Fernandes (Orientador), e-mail: maariana.sacchi@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina/Maringá, PR.

Ciências da Saúde - Farmácia

Palavras-chave: leishmaniose, intestino, caliciformes

Resumo:

A leishmaniose visceral é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*, no qual o principal elo na cadeia de transmissão para as áreas urbanas são os cães. O intestino delgado é um dos órgãos afetados pela doença. Este órgão é importante para homeostasia do organismo e destaca-se pela sua importância imune. Entre as células intestinais que apresenta, estão as células caliciformes que são produtoras, armazenadoras e secretoras de mucinas que compõe o muco protetor. O objetivo deste trabalho foi avaliar quantitativamente as células caliciformes no intestino delgado de cães com leishmaniose visceral. Os animais foram separados em grupo infectado e, aqueles que apresentaram sorologia negativa, formaram o grupo controle. Após eutanasiados, um segmento do íleo foi coletado para o processamento histológico, desidratado, diafanizados e emblocados em parafina para a realização dos cortes histológicos de 5 µm. Lâminas coradas com Alcian Blue pH 1,0, Alcian Blue pH 2,5 e Ácido Periódico de Schiff foram utilizadas para evidênciação e quantificação das células caliciformes em microscópio ótico. Os resultados não demonstraram diferenças significativas entre os grupos infectados e controle em nenhuma das colorações. Concluímos assim, que a leishmaniose visceral não causa alterações na quantificação das células caliciformes do íleo de cães infectados naturalmente.

Introdução

A leishmaniose visceral é uma doença grave causada por protozoários do gênero *Leishmania* que se não tratada corretamente pode levar o hospedeiro ao óbito. O Brasil é considerado endêmico para a doença apresentando um dos maiores índices das Américas. Em todo o continente americano, foram reportados 59.769 novos casos da doença entre 2001 e

2017 desses, 57.582 casos, aproximadamente 96%, foram registrados no Brasil (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2019).

O intestino delgado é um dos órgãos afetados pela leishmaniose visceral (SILVA et al., 2016), este é responsável pela digestão e absorção dos nutrientes provenientes da alimentação. No epitélio intestinal, encontramos diversos tipos celulares, como as células caliciformes, que são produtoras de mucinas glicoproteicas que compõe o muco protetor do intestino (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2017). Santos e colaboradores (2018) relataram alterações quantitativas nessas células em camundongos infectados por diferentes espécies de *Leishmania* agentes da forma tegumentar da doença, o que pode ocasionar em alterações do funcionamento normal do órgão.

Em cães com leishmaniose visceral, já foi demonstrado lesões inflamatórias intestinais que se estenderam às camadas mucosa e submucosa e extensa degeneração no epitélio de vilos e criptas (SILVA et al., 2016), contudo, não foram encontrados trabalhos analisando as células produtoras de mucinas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar quantitativamente as possíveis alterações das células caliciformes produtoras de diferentes mucinas no íleo de cães infectados naturalmente com leishmaniose visceral.

Materiais e métodos

Animais

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) sob protocolo 27/2016. Foi aplicado o teste rápido para Leishmaniose Visceral Canina e a técnica de ELISA para o diagnóstico da leishmaniose visceral. Os animais com sorologia positiva compuseram o grupo infectado (GI; n=4) e, os que apresentaram sorologia negativa no grupo controle (GC; n=4).

Coleta de dados

Em fichas individuais foram catalogados os dados epidemiológicos, características físicas e sinais clínicos dos animais, estes foram posteriormente tabelados.

Análise histológica

Os cães foram eutanasiados por meio de anestesia de tiopental sódico seguido de cloreto de potássio no Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande. Realizou-se a laparotomia e 5 centímetros do íleo foi coletado e fixado em paraformaldeído tamponado 4%. Este material foi então desidratado, diafanizado e embebido em parafina para a obtenção de lâminas histológicas com cortes transversais semi-seriados de 5 µm.

Para análise, as lâminas foram coradas pelas técnicas de Alcian Blue pH 1,0 (AB pH 1,0+), Alcian Blue pH 2,5 (AB pH 2,5+) e Ácido Periódico de Schiff (PAS+) para a detecção de sulfomucinas, sialomucinas e mucinas neutras e sialomucinas lábeis, respectivamente. A quantificação das células

caliciformes foi realizada utilizando um microscópio ótico, objetiva de 40X. Foram contadas 2560 células do epitélio da túnica mucosa intestinal e as células caliciformes presentes entre elas em cada animal nas três colorações. Posteriormente, foi calculada a proporção de células caliciformes/100 células epiteliais para a realização das análises estatísticas.

Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados e os grupos foram comparados pelo Teste T no software GraphPad Prism 8, sendo representados pela média \pm desvio padrão e o nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

O intestino é um importante órgão imune, que auxilia na manutenção do organismo como um todo. Este órgão, pode sofrer alterações devido a infecções por diferentes protozoários, como espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose tegumentar (SANTOS et al., 2018) ou visceral (SILVA et al., 2016, SOUZA et al., 2019). Silva e colaboradores (2016) observaram a presença de amastigotas no intestino de cães com leishmaniose visceral associadas a lesões inflamatórias. Demonstrando assim, a importância da análise de diferentes parâmetros intestinais, como as células caliciformes.

Os animais foram selecionados para o estudo com base em seus dados clínicos e epidemiológicos. Foram selecionados animais adultos, de porte médio e grande e a maioria sem raça definida. Essa seleção acabou limitando a quantidade de animais analisados, e devido ao baixo número de amostras não foi possível utilizar apenas um sexo, sendo incluídos machos e fêmeas. Os sinais clínicos mais notáveis nos animais do grupo infectado foram alopecia, descamação, perda de peso, feridas, linfadenopatia, onicogribose, amiotrofia e anemia profunda.

Na análise intestinal, não foram observadas diferenças significativas no número de células caliciformes quando comparado o grupo infectado (AB pH 1,0: $15,20 \pm 3,84$; AB pH 2,5: $17,07 \pm 2,85$; PAS: $26,76 \pm 3,82$ células caliciformes/100 células epiteliais) com o controle (AB pH 1,0: $12,69 \pm 2,65$; AB pH 2,5: $19,04 \pm 4,07$; PAS: $23,44 \pm 1,36$ células caliciformes/100 células epiteliais) em nenhuma das colorações analisadas (Figura 1).

Nossos resultados corroboram com Souza e colaboradores (2019) que também não encontraram alterações nas células produtoras de mucinas em camundongos BALB/c infectados cronicamente por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, principal espécie causadora de leishmaniose visceral no Brasil. No nosso trabalho, não foi possível definir o tempo de infecção dos animais, já que estes foram naturalmente infectados, e esse fator pode ser importante para o desenvolvimento das alterações intestinais.

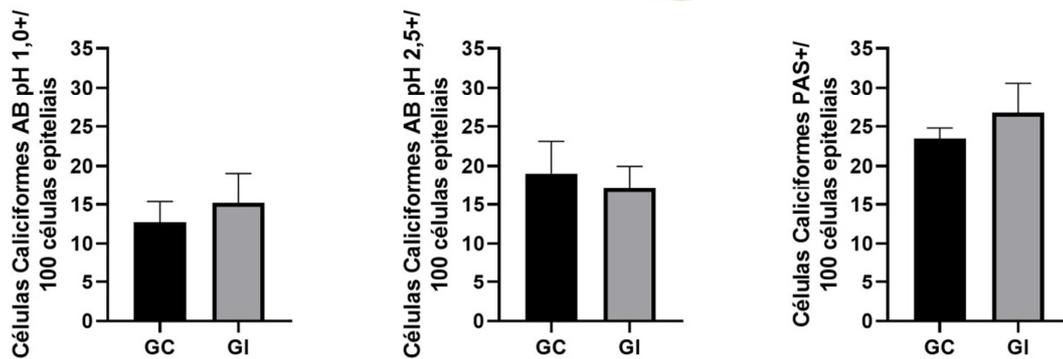


Figura 1 – Contagem de células caliciformes nas colorações de Alcian Blue pH 1,0 (AB pH 1,0), Alcian Blue pH 2,5 (AB pH 2,5) e Ácido Periódico de Schiff (PAS). Dados apresentados por média \pm desvio padrão. GC: Grupo Controle. GI: Grupo Infectado.

Conclusões

A leishmaniose visceral não levou a alterações na quantificação das células caliciformes do íleo de cães infectados naturalmente. Outros estudos devem ser realizados para melhor entendimento das alterações intestinais durante a infecção pela doença.

Agradecimentos

Agradeço à Fundação Araucária, ao laboratório de histologia e parasitologia da UEM, ao grupo de pesquisa em neurogastroenterologia e aos departamentos de Biomedicina e Análises Clínicas e de Ciências Morfológicas na UEM e a Universidade Federal da Grande Dourados.

Referências

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

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

SANTOS, A. G. A. DOS et al. Alterations induced in the ileum of mice upon inoculation with different species of *Leishmania*: a preliminary study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 4, p. 537–541, ago. 2018.

SILVA, D. T. et al. Correlation study and histopathological description of intestinal alterations in dogs infected with *Leishmania infantum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 1, p. 24–36, mar. 2016.

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.