

INFECÇÃO POR *Leishmania (Viannia) braziliensis* NÃO ALTERA A QUANTIDADE DE CÉLULAS CALICIFORMES DO ÍLEO DE HAMSTERS

Isabela Alessandra Mariano (PIBIC/ CNPq/FA/Uem), Amanda Gubert Alves dos Santos (Coorientadora) Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo (Orientadora), e-mail: ganmelo2@uem.br.

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

Farmácia/Análises toxicológicas

Palavras-chave: leishmaniose tegumentar, intestino delgado, células caliciformes

Resumo:

A Leishmaniose Tegumentar é uma doença cuja magnitude, potencial endêmico e espectro clínico merecem a atenção do serviço público de saúde. Uma das principais espécies causadoras é a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, que já foi descrita causando alterações no intestino de animais. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da infecção por *L. (V.) braziliensis* sobre as células caliciformes do íleo de hamsters. Foram utilizados 18 hamsters separadas em três grupos (n = 6): um grupo controle e dois grupos infectados com diferentes cepas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/2003/2314 e MHOM/BR/2000/1655). Após 120 dias, os animais foram submetidos à eutanásia e 1 cm do íleo foi coletado para a quantificação de células caliciformes nas colorações de Ácido Periódico de Schiff, Alcian Blue pH 1,0 e pH 2,5. A infecção por *L. (V.) braziliensis* não alterou a quantidade de células caliciformes. Contudo, outros estudos devem ser realizados para melhor entendimento dessa relação, já que os trabalhos envolvendo o intestino são recentes.

Introdução

As leishmanioses são doenças causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* cuja estimativa mundial de novos casos por ano é de mais de 700.000. A transmissão da doença ocorre através da picada de insetos flebotomíneos, quando há a inoculação de formas infectantes nos hospedeiros vertebrados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a uma das principais responsáveis pelas formas cutâneas e cutaneomucosas da doença no Novo Mundo, causando lesões mais graves e destrutivas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Além dessas lesões na pele e mucosas, autores já relataram o encontro de alterações histopatológicas no intestino de hamsters

infectadas por essa espécie, além da detecção do seu DNA no órgão (SANTOS *et al.*, 2018a).

O intestino possui em seu epitélio, as células caliciformes, que são responsáveis por secretar as mucinas formadoras do muco intestinal. Este é a primeira linha de defesa da mucosa do intestino, uma vez que, além da ação lubrificante, confere proteção química contra a agressão ocasionada por diversas substâncias e possui também propriedades bactericidas (GAUDIER *et al.*, 2009). Portanto, alterações na quantidade de células caliciformes podem interferir na integridade da barreira protetora do intestino, e assim, esse trabalho buscou avaliar as células caliciformes presentes no epitélio do íleo de hamsters após a infecção crônica por *L. (V.) braziliensis*.

Materiais e métodos

Animais e aspectos éticos

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá aprovou este estudo sob o protocolo nº7587260416. Foram utilizadas 18 hamsters douradas (*Mesocricetus auratus*) fêmeas com 12 semanas de idade. Esses animais foram mantidos em racks mini-isoladoras ventiladas com maravalha autoclavada, temperatura controlada (22 °C) e ciclo claro/escuro de 12 h, com água filtrada e ração *ad libitum*.

Delineamento experimental

Para a infecção, duas cepas de *L. (V.) braziliensis* foram obtidas do Laboratório de Leishmanioses da UEM. Esses parasitos foram descongelados e cultivados em 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 (Calmium Agener - Union Animal Health) e 50 mg/kg de ketamina (Francotar® - Virbac Animal health). Foi realizada a separação das hamsters em três grupos: um grupo controle (GC) e dois grupos infectados, que receberam um inóculo de 2×10^7 de promastigotas duas cepas de *L. (V.) braziliensis* que foram isoladas de lesões de pacientes atendidos pelo Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da UEM e que utilizaram Glucantime como tratamento. Esses pacientes apresentaram diferentes respostas: aquele infectado pela cepa MHOM/BR/2003/2314 (2314) foi considerado sensível ao tratamento; e o outro que foi infectado pela MHOM/BR/2000/1655 (1655) foi considerado resistente, uma vez que houve reativação da lesão.

Procedimentos histológicos

As hamsters foram mantidas por 120 dias após a infecção, quando ocorreu a eutanásia por aprofundamento anestésico, seguido de laparotomia para a coleta de 1 cm do íleo para as análises histológicas. Esse material foi fixado em paraformaldeído tamponado, desidratado em bateria de álcool, diafanizado em xilol e incluído em parafina para a obtenção de cortes semi-seriados de 5 µm. Esses cortes foram depositados em lâminas que por sua vez, foram submetidas a coloração pelas técnicas de *Alcian Blue* pH 1,0 (AB 1,0) para detecção de células caliciformes produtoras de sulfomucinas, e pH

2,5 (AB 2,5) para sialomucinas e Ácido Periódico de Schiff (PAS) para detectar a produção de mucinas neutras.

Contagem de células caliciformes

A contagem das células caliciformes foi realizada nas três colorações citadas acima, em microscópio ótico (Nikon Eclipse E200), na objetiva de 40X. Para isso, 2.560 células do epitélio intestinal foram contadas e as células caliciformes presentes entre elas foram quantificadas separadamente. Para a realização da análise estatística, foi calculada a proporção de células caliciformes por 100 células epiteliais de cada animal.

Análise estatística

A distribuição dos dados foi considerada normal pelo teste de Shapiro-Wilk e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) de um fator seguido do pós-teste de Tukey. Foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

A espécie *L. (V.) braziliensis* possui um grande polimorfismo genético, fato que pode estar associado à diversidade de manifestações clínicas desenvolvidas pelos hospedeiros (DA SILVA VIEIRA *et al.*, 2019). Em estudos anteriores que avaliaram o intestino de roedores infectados com outras cepas de *L. (V.) braziliensis*, foram encontradas diversas alterações histopatológicas como aumento das camadas musculares, na altura e largura de vilos e infiltrados inflamatórios (SANTOS *et al.*, 2018a). Devido à diversidade genética do parasito, é interessante que esses parâmetros sejam avaliados após a infecção por outras cepas do parasito. Assim sendo, avaliamos no presente estudo, as células caliciformes.

Em nosso estudo, apesar de haver um aumento de aproximadamente 17% nas células caliciformes coradas por AB 1,0 e uma diminuição de 25% nas células caliciformes coradas por AB 2,5 do grupo 1655 em relação ao controle, não foram observadas alterações significativas na contagem de células caliciformes em nenhum dos grupos em nenhuma das colorações analisadas (Figura 1).

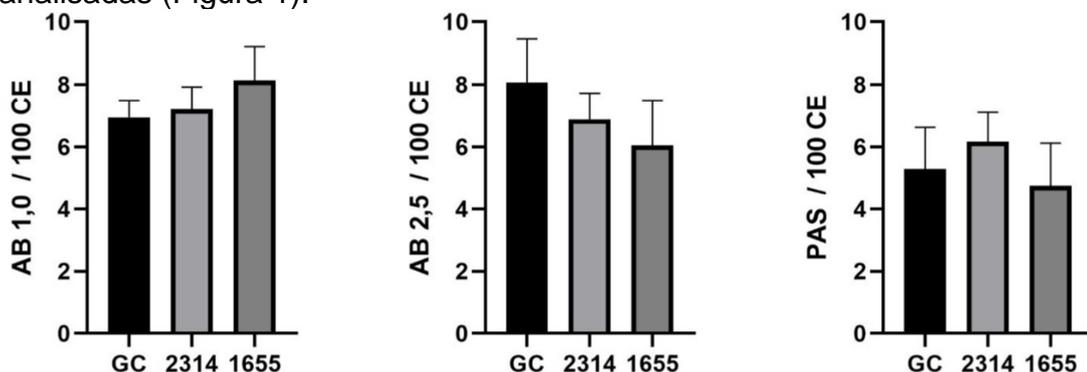


Figura 1. Proporção de células caliciformes coradas por Alcian blue pH 1,0 (AB 1,0), pH 2,5 (AB 2,5) e Ácido Periódico de Schiff (PAS) por 100 células epiteliais (CE) em animais infectados por *L. (V.) braziliensis*. Dados representados em média \pm desvio padrão. GC: Grupo Controle. 2314: Grupo infectado pela cepa MHOM/BR/2003/2314. 1655: Grupo infectado pela cepa MHOM/BR/2000/1655.

Nossos resultados corroboram com o observado previamente na literatura em um estudo envolvendo hamsters infectados cronicamente por *L. (V). braziliensis*. Neste, as células absortivas epiteliais estavam alteradas e a profundidade de criptas aumentada, demonstrando uma alteração na integridade da barreira epitelial. Contudo, não foram encontradas alterações nas células caliciformes (SANTOS *et al.*, 2018a). Por outro lado, um estudo que avaliou o íleo em camundongos após 72 horas da inoculação de *L. (V). braziliensis*, demonstrou aumento na quantidade de células caliciformes produtoras de mucinas neutras e sialomucinas (SANTOS *et al.*, 2018a). Sendo assim, essas alterações intestinais são dependentes da cepa do parasito, tempo de infecção e modelo experimental.

Conclusões

A infecção por *L. (V). braziliensis* não alterou a contagem de células caliciformes no íleo de hamsters, sugerindo a manutenção da barreira física íntegra em relação a proporção de mucinas mesmo após a infecção. Entretanto, outros estudos devem ser realizados para melhor conhecimento dessa relação *L. (V). braziliensis*-intestino, uma vez que esses estudos são recentes.

Agradecimentos

Ao *CNPq* pela oportunidade oferecida e a Universidade Estadual de Maringá.

Referências

DA SILVA VIEIRA, T. *et al.* *Leishmania braziliensis*: Strain-Specific Modulation of Phagosome Maturation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, vol. 9, p. 319, 6 Sep. 2019. DOI 10.3389/fcimb.2019.00319.

GAUDIER, E. *et al.* Butyrate enemas upregulate Muc genes expression but decrease adherent mucus thickness in mice colon. **Physiological Research**, p. 111–119, 2009.

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

SANTOS, A. G. A., *et al.* Insights of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) intestine. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, vol. 106, no. July, p. 1624–1632, Oct. 2018a. DOI 10.1016/j.biopha.2018.07.120.

SANTOS, A. G. A. *et al.* Alterations induced in the ileum of mice upon inoculation with different species of *Leishmania*: a preliminary study. **Revista**

30º Encontro Anual de Iniciação Científica
10º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



11 e 12 de novembro de
2021

da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, vol. 51, no. 4, p. 537–541,
Aug. 2018b. DOI 10.1590/0037-8682-0348-2017.