AVALIAÇÃO DA PAREDE DUODENAL DE HAMSTERS INFECTADOS POR *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Larissa Leiko Yamada (PIBIC/FA), Maria Gabriela Lima da Silva, Debora de Mello Gonçales Sant´Ana, Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo, Amanda Gubert Alves dos Santos, Andrea Claudia Bekner da Silva Fernandes (Orientador), e-mail: acbsfernandes@gmail.com

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

Farmácia/Análise Toxicológica

Palavras-chave: Leishmania, intestino delgado, morfometria

Resumo:

Denomina-se Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) as formas da doença mucocutânea e cutânea da leishmaniose presente no continente americano. Seu principal causador é o protozoário da espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis,* o qual é transmitido pela picada de flebotomínios. Além da pele, há relatos de disseminação da doença acometendo outros órgãos. No intestino, alterações morfológicas como aumento da espessura das camadas musculares e das vilosidades foram relatadas no íleo dos animais infectados. Com o objetivo de encontrar tais alterações, em nosso estudo, utilizamos 32 animais para avaliar a morfologia da parede duodenal por meio da morfometria de diversos parâmetros da parede intestinal. Foi encontrado que, no grupo 2311, após 120 dias de infecção por uma cepa isolada, os vilos estavam reduzidos quando comparados ao controle. Infere-se que a infecção crônica por este parasito leva a redução da área de contato duodenal com o lúmen.

Introdução

As leishmanioses são antropozoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas pela picada de flebotomíneos fêmeas, sendo que a denominação Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) engloba as formas clínicas cutânea e mucocutânea da doença no continente americano. A LTA é causada principalmente pela espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* e apresenta caráter endêmico no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).
Em infecções experimentais, já foi demonstrado o surgimento de alterações morfológicas e detecção do parasito em outros órgãos, como o intestino (SANTOS et al., 2021). Este, é um órgão de grande importância fisiológica, sendo dividido anatomicamente em intestino delgado e grosso. A primeira porção do intestino delgado é o duodeno, que participa ativamente do processo de digestão e histologicamente é formado pela mucosa, submucosa, musculares (circular interna,

longitudinal externa) e serosa. Na mucosa, observam-se as vilosidades envolvidas no processo de absorção nutricional (JUNQUEIRA; CARNEIRO,2017).
Alterações nestas camadas que compõe a parede intestinal no íleo de hamsters infectados por *L. (V.) braziliensis*, já foram relatadas anteriormente (SANTOS et al., 2021, 2018). Todavia, faz-se necessário o estudo dos demais segmentos intestinais, uma vez que apresentam diferenças morfofuncionais significativas, podendo responder de formas distintas à processos infecciosos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar aspectos histológicos, como a espessura das camadas musculares, da submucosa, parede total, bem como da altura e largura de vilos e profundidade e largura de criptas na parede duodenal de hamsters infectadas com diferentes cepas de *L. (V.) braziliensis*.

Materiais e Métodos

Animais
Sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá pelo parecer número 7587260416, utilizou-se 32 hamsters fêmeas (*Mesocricetus auratus*) que foram divididas em um grupo controle e 3 grupos infectados. Metade dos animais foram eutanasiados após 90 dias de infecção e a outra metade aos 120 dias de infecção, formando assim 8 grupos (n= 4). Durante o tempo do experimento, os animais foram mantidos em racks mini-isoladoras ventiladas com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12 h, com água e ração à vontade.
Delineamento experimental
Foram utilizadas para a infecção, 3 cepas diferentes de *L. (V.) braziliensis:* a cepa MHOM/BR/1975/M2903 (2903), considerada padrão e duas cepas isoladas e armazenadas no Laboratório de Imunologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá MHOM/BR/2003/2311 (2311) e MHOM/BR/2009/3476 (3476). As promastigotas foram obtidas do Laboratório de Leishmanioses da UEM e cultivadas no meio 199 (GibcoLaboratories®, 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 (CalmiunAgener-Union Animal Healt) e 50 mg/kg de ketamina (Francotar®- Virbac Animal health). Em seguida, os animais do grupo controle receberam 100 µl de tampão fosfato-salino (PBS) estéril no dorso da pata esquerda traseira e os animais dos grupos infectados, receberam uma suspensão de 100 µl de promastigotas ($2x10^7$ parasitos) de cada cepa nos mesmos moldes do controle.
Eutanásia e processamento histológico
Os animais foram submetidos à eutanásia por meio de aprofundamento anestésico 90 ou 120 dias pós-infecção e após laparotomia, foi coletado 1 cm do duodeno, que foi submetido ao processamento histológico, para confecção de lâminas com cortes semi-seriados de 5 µm, que foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina.
Mensuração da parede duodenal
As análises morfométricas foram realizadas por meio do software Motic Images Plus (versão 2.0) a partir da captura de 16 imagens do duodeno de cada animal com o auxílio do microscópio ótico trilocular (Olympus CX31) acoplado a uma

câmera digital (Moticam 2000, 2.0 Megapixel). Mensurou-se a espessura das camadas musculares (longitudinal, circular e total) da submucosa e da parede total, além da altura e largura de vilos e da profundidade e largura das criptas, totalizando 64 medidas de cada parâmetro por animal (4 medidas/imagem).

Análise estatística

Os dados foram organizados em planilhas eletrônicas (Microsoft Excel®). Por meio do software GraphPad Prism (versão 8.0.1) foi verificada a distribuição dos dados utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram considerados com distribuição normal para todas as análises e foram apresentados pela média ± desvio padrão. Para comparação entre os grupos foi aplicado o teste ANOVA two way seguido por pós-teste de Tukey. Em todos os testes foi considerado um nível de significância de 5% com 95% de confiança.

Resultados e Discussão

Nossos resultados demonstraram que a altura dos vilos do grupo 2311 infectado por 120 dias estava reduzida quando comparado ao seu controle em cerca de 55,12% (Figura 1), estando reduzida também quando comparado ao grupo 2903 no mesmo tempo de infecção. Uma vez que os vilos são estruturas envolvidas na absorção de nutrientes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017), a sua redução sugere que há menor área de absorção disponível, ou seja, a infecção pode afetar a morfologia e a fisiologia do órgão.

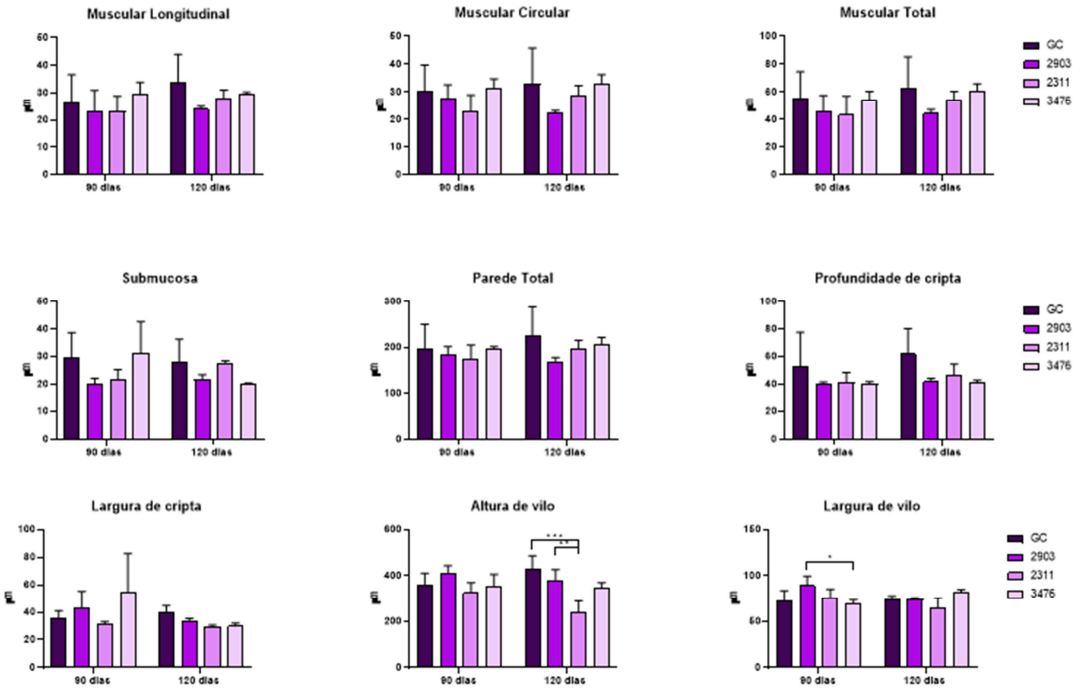

Figura1. Morfometria da parede, vilosidades e criptas (µm) no duodeno de hamsters fêmeas infectadas com 2x10^7 promastigotas de *L. (V.) braziliensis* por 90 ou 120 dias. GC: Grupo Controle. 2903: Grupo infectado com a cepa MHOM/BR/1975/M2903 de *L. (V.) braziliensis*.2311: Grupo infectado com a cepa MHOM/BR/2003/2311 de *L. (V.) braziliensis*. 3476: Grupo infectado com a cepa MHOM/BR/2009/3476 *de L. (V.) braziliensis*. n= 4, *p<0,05.

Ao compararmos os dados já publicados a respeito das alterações no íleo, com aquelas encontradas no duodeno, observamos que, de fato, os segmentos intestinais respondem ao quadro infeccioso de maneiras distintas. Uma vez que, no íleo, houve aumento da maioria dos parâmetros analisados na parede intestinal (SANTOS et al., 2021, 2018). Isto pode estar relacionado às funções desempenhadas por estes segmentos, uma vez que o duodeno atua na digestão dos alimentos e está localizado mais próximo ao estômago, enquanto o íleo tem uma função imunológica mais acentuada, estando mais próximo aos linfonodos mesentéricos (MOWAT e AGACE, 2014) o que pode ser fundamental para a chegada do antígeno no órgão e desenvolvimento de resposta imune mais acentuada.

Conclusões

A infecção por *L. (V.) braziliensis* levou a redução da área de contato do duodeno com o lúmen intestinal. O que pode estar relacionado a uma redução da digestão alimentar e da absorção de nutrientes. Sendo assim, reforça-se a importância de mais estudos na relação parasito-hospedeiro.

Agradecimentos

Agradecemos ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica em parceria com a Fundação Araucária e a Universidade Estadual de Maringá pela concessão de bolsa ao projeto garantindo a oportunidade de desenvolvimento de pesquisa.

Referências

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 13ed. Rio de Janeiro, 2017.

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

MOWAT, A. M.; AGACE, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 10, p. 667–685, out. 2014.

SANTOS, A. G. A. DOS et al. A New Target Organ of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Chronic Infection: The Intestine. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 687499, 14 jul. 2021.

SANTOS, A. G. A. DOS et al. Insights of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) intestine. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1624–1632, out. 2018.