

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS/COORDENAÇÃO**  
**DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**SELMA MARIA SANTOS MOURA**

**MORFOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA DO JEJUNO**  
**DE CAMUNDONGOS BALB/c EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS**  
**COM *Leishmania (L.) infantum chagasi***

**TERESINA**

**2020**

**SELMA MARIA SANTOS MOURA**

**MORFOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA DO JEJUNO  
DE CAMUNDONGOS BALB/c EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM  
*Leishmania (L.) infantum chagasi***

**Tese apresentada ao Programa de Pós -  
graduação em Ciência Animal (PPGA) da  
Universidade Federal do Piauí (UFPI),  
como requisito para obtenção do grau de  
DOUTORA em ciência Animal**

**Área de concentração: Sanidade e  
Reprodução Animal**

**Orientador: Prof. Dr. Airton Mendes Conde  
Júnior**

**TERESINA**

**2020**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco  
Serviço de Processamento Técnico

M929m Moura, Selma Maria Santos.  
Morfologia e imunohistoquímica do jejuno de  
camundongos Balb/c experimentalmente infectados com  
*leishmania (l.) infantum chagasi* / Selma Maria Santos Moura.  
– 2020.  
71 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade  
Federal do Piauí, Teresina, 2020.  
"Orientador: Prof. Dr. Airton Mendes Conde Junior".

1. Leishmaniose visceral. 2. Jejuno. 3. Proliferação  
celular. 4. Ki-67. 5. Beta-catenina. I. Título.

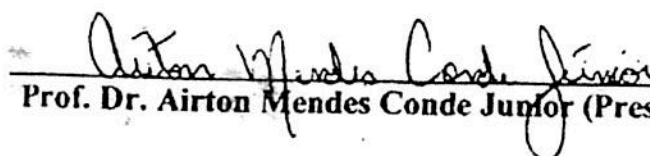
CDD 616.936 4

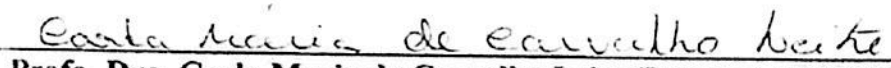
**MORFOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA DO INTESTINO DELGADO DE  
CAMUNDONGOS BALB/c EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM  
*LEISHMANIA (L.) INFANTUM CHAGASI***

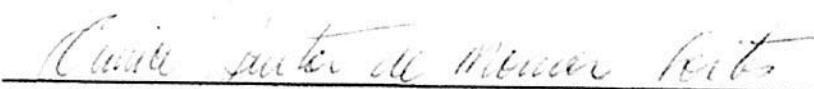
**SELMA MARIA SANTOS MOURA**

Tese aprovada em: 27/05/2020

Banca Examinadora:

  
Prof. Dr. Airton Mendes Conde Junior (Presidente) / DMOR/CCS/UFPI

  
Profa. Dra. Carla Maria de Carvalho Leite (Interna) / DMOR/CCS/UFPI

  
Profa. Dra. Eunice Anita de Moura Fortes (Interna) / DMOR/CCS/UFPI

  
Profa. Dra. Kelly Palombit (Interna) / DMOR/CCS/UFPI

  
Pesquisadora Dra. Flávia Melo Barreto (Externa) / ADAPI

  
Profa. Dra. Tarsia Giabardo-Silva Mendonça (Externa) / UNESP



## **Dedicatória**

### **A Deus**

**“Que se fez presente em todos os momentos, firmes e trêmulos e, passo a passo, pude sentir a sua mão na minha, transmitindo-me a segurança necessária para enfrentar meu caminho a seguir”.**

Vinícius de Moraes

Aos meus pais, Lourenço Moura Neto (*in memoriam*) e Maria de Sousa Santos Moura pelos princípios de amor, respeito e responsabilidade transmitidos durante toda a minha vida dedico este Trabalho. O meu eterno agradecimento pelo apoio incondicional e pela presença em todos os momentos para a realização deste doutorado, vocês são a minha base!

Aos meus irmãos Sílvia Maria Santos Moura, Raimundo Santos Moura e João Sinval Santos Moura pelos laços de família, companheirismo, estímulo e otimismo durante toda minha vida acadêmica, o meu obrigada especial!

Agradeço aos meus sobrinhos Jéssica, Lucas, Thâmara e Marina pelo carinho e alegria sempre, vocês são os amores da tia Selma! Também sou grata aos demais integrantes da minha família pelo apoio, torcida e confiança que depositam em mim, pelos momentos que não estivemos juntos e souberam entender.

**Dedico este trabalho**

## **Agradecimentos**

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha. É porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

Charles Chaplin

Ao meu orientador e amigo, **Prof. Dr. Airton Mendes Conde Júnior** pela competência e inteligência com que conduziu a orientação deste trabalho, e que através de seu conhecimento proporcionou-me valiosos ensinamentos, com estímulo e entusiasmo, não somente agora, mas desde o dia que tive o privilégio de conhecê-lo, como uma daquelas pessoas que Deus escolhe com muito critério para fazer parte de sua vida, a minha gratidão e reconhecimento!

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por sua companhia incondicional! Pelos dons da sabedoria e da fé; por sua iluminação, fundamental na superação dos momentos difíceis vivenciados ao longo deste curso; por sua proteção e amparo experimentados por mim nos mais variados momentos de minha vida. Obrigada meu Deus, por este momento de alegria e realização profissional.

A Universidade Federal do Piauí, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. **Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes**, pela oportunidade de realizar o curso de doutorado. Obrigada a UFPI por fazer parte de minha trajetória acadêmica na graduação e na pós-graduação. Tenho muito orgulho por integrar o quadro de docentes desta honrada Instituição!

A Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal/CCA/UFPI, na pessoa do Prof<sup>a</sup>. **Dr. Arnaud Azevedo Alves**.

Aos **Professores do Programa de Pós-Graduação** em Ciência Animal/CCA/UFPI, eu agradeço pelos conhecimentos tão importantes para minha capacitação profissional e para meu crescimento pessoal.

Agradeço também, aos membros da **Banca de Qualificação e de defesa da Tese**, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Carla Maria de Carvalho Leite**, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kelly Palombith**, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Eunice Anita de Moura Fortes**, **Dra Társia Giabardo Silva Mendonça** e **Dra. Flávia Melo Barreto** pela disposição em colaborar com o aperfeiçoamento desse estudo, através de valiosas contribuições.

Ao Departamento de Morfologia do CCS/UFPI, na pessoa da Prof<sup>a</sup>. **Dr<sup>a</sup>. Maíra Soares Ferraz**, pelo apoio e solicitude em todos os momentos. Sou grata também a todos os professores dos setores de Anatomia e Histologia deste departamento pela convivência prazerosa e pelo compartilhamento de suas experiências, além da amizade e carinho que tornaram os momentos difíceis mais leves; especialmente aos professores doutores Carla Maria de Carvalho Leite, Christianne Maria Tinoco Veras, Maria Ivone Mendes Benigno, Karinn de Araújo Soares Bastos, Kelly Palombith e Leonardo Borges Ferro pelo auxílio no exercício da docência compartilhada.

Agradeço também aos técnicos e funcionários do Laboratório de Histotécnica e Embriologia do DMOR pela ajuda nas atividades diárias, assim como aos demais funcionários e técnicos do Laboratório de anatomia pela gentileza e amizade tão importantes durante estes anos. Profissionais que junto aos professores constituem a minha segunda casa muito querida.

Em especial, sou grata ao Fábio Luís Oliveira de Sousa por sua disposição no auxílio com as tarefas referentes a informática, internet, excel, formatação, enfim, no desenvolvimento da parte teórica deste trabalho.

A todos os alunos da Iniciação Científica, Mestrado e integrantes do grupo de pesquisa do Conde, em particular a Clarisse Maria Barbosa Fonseca, Maria Michele Araújo de Sousa Cavalcante e Andrezza BS da Silva pela colaboração na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Aécio e aos funcionários do Biotério setorial da UFPI, pelo auxílio, colaboração e gentileza.

Em particular, agradeço pela solicitude ao médico Raimundo Gerônimo da Silva Júnior, ao representante comercial Nilton Júnior da Silva Costa (Laboratório LAPAC) e a Ana Cláudia Ribeiro de Carvalho pela valiosa contribuição no desenvolvimento deste experimento.

Agradeço também aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram para o desenvolvimento desta pesquisa.

MOURA, S.M.S. **MORFOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA DO JEJUNO CAMUNDONGOS BALB/c EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania (L.) infantum chagasi***. 2020. 71p. Tese (Pós-graduação em Ciência Animal). Orientador: Prof. Dr. Airton Mendes Conde Júnior. Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina-Piauí.

#### RESUMO

A leishmaniose é uma Doença Tropical Negligenciada, que possui como agente etiológico um protozoário do gênero *Leishmania*, transmitido ao homem através da picada de flebotomíneos hematófagos, sendo *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie responsável pela transmissão no Brasil. O espectro da enfermidade depende da espécie do parasita infectante e da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro a infecção, podendo evoluir para diferentes formas clínicas como Leishmaniose Tegumentar, Leishmaniose Mucosa e Leishmaniose Visceral, esta última, representa a forma mais grave da doença e constitui um problema de saúde pública no Brasil em função da alta morbidade e mortalidade. Conhecimentos sobre os efeitos da leishmaniose no trato gastrintestinal são escassos, por isso, este estudo possui como propósito avaliar as consequências promovidas pela *Leishmania (L.) infantum chagasi*, na morfologia, proliferação e arquitetura celular do jejuno de camundongos BALB/c. Foram utilizados trinta e seis (36) animais divididos aleatoriamente em três (3) grupos, sendo um Controle, sem a inoculação da *Leishmania* (GC) e dois Grupos Experimentais I e II (GEI/GEII): animais infectados por *Leishmania (L.) infantum chagasi* e após 7 e 50 dias da infecção, respectivamente, as amostras biológicas foram coletadas seguindo-se os protocolos de anestesia e eutanásia. Em sequência foram imersas em solução de formaldeído e realizado o processamento histológico de rotina com coloração por Hematoxilina e Eosina, morfometria e imunohistoquímica. A análise histopatológica foi realizada com auxílio de um microscópio óptico comum e se observou presença de células inflamatórias, desorganização das vilosidades intestinais e metaplasia do epitélio cilíndrico simples de revestimento nos grupos que foram instituídos o tratamento com o protozoário. A imunohistoquímica foi realizada com a utilização dos anticorpos primários anti-Ki-67 e anti-beta-catenina e verificou-se maior proliferação celular na base das vilosidades intestinais no GC, enquanto nos Grupos Experimentais I e II, o maior crescimento foi observado nas bordas superiores destas estruturas. Com relação a arquitetura celular, a marcação foi de forma pontual nas bordas superiores das vilosidades para os Grupos Controle e Experimental I, porém neste último, observou-se também a desorganização destas regiões. Já no Grupo Experimental II a marcação pela beta-catenina aconteceu de forma contínua, por toda a vilosidade intestinal. Os dados foram tabulados em Microsoft Excel, analisados pelo programa PROC GLM (General Linear Models) do Software SAS (Statistical Analysis System) for Windows versão 9.0 e os testes de Duncan e Tukey foram utilizados para análise estatística. O presente estudo constatou que a inoculação por *Leishmania (L.) infantum chagasi* provocou alterações no jejuno de camundongos de forma mais expressiva na fase aguda da doença (GEI) do que na fase crônica (GEII), nesta observou-se a reorganização tecidual.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral, jejuno, proliferação celular, ki-67 e beta-catenina.

MOURA, S.M.Š. **Morphology and immunohistochemistry of the jejunum of BALB / c mice experimentally infected with leishmania (L.) infantum chagasi.** 2020. 71 p. Thesis (Animal science Graduate Program). Supervisor: Prof. Ph.D. Airton Mendes Conde Júnior. Universidade Federal do Piauí (UFPI). Teresina-Piauí.

#### ABSTRACT

Leishmaniasis is a Neglected Tropical Disease, whose etiologic agent is a protozoan of the genus *Leishmania*, transmitted to humans through the bite of blood-sucking sandflies, with *Lutzomyia longipalpis* being the main species responsible for transmission in Brazil. The spectrum of the disease depends on the species of the infecting parasite and the immune response developed by the host to the infection, which can evolve to different clinical forms such as Tegumentary Leishmaniasis, Leishmaniasis Mucosa and Visceral Leishmaniasis, the latter, represents the most serious form of the disease and constitutes a problem of public health in Brazil due to the high morbidity and mortality. Knowledge about the effects of leishmaniasis on the gastrointestinal tract is scarce, therefore, this study aims to evaluate the consequences promoted by *Leishmania (L.) infantum chagasi*, on the morphology, proliferation and cell architecture of the BALB / c mice jejunum. Thirty-six (36) animals were randomly divided into three (3) groups, one Control, without inoculation of *Leishmania* (GC) and two Experimental Groups I and II (GEI / GEII): animals infected with *Leishmania (L.) infantum chagasi* and 7 and 50 days after infection, respectively, biological samples were collected following the anesthesia and euthanasia protocols, in sequence they were immersed in formaldehyde solution and routine histological processing with hematoxylin and eosin staining was performed, morphometry and immunohistochemistry. The histopathological analysis was performed with the aid of a common optical microscope, observing the presence of inflammatory cells, disorganization of the intestinal villi and metaplasia of the simple cylindrical lining epithelium in the groups that were instituted the treatment with the protozoan. Immunohistochemistry was performed with the use of primary anti-Ki-67 and anti-beta-catenin antibodies and there was greater cell proliferation at the base of the villi in the GC, while in Experimental Groups I and II, the greatest growth was observed at the edges of these structures. With regard to cellular architecture, the marking was punctually on the upper edges for the Control and Experimental I Groups, however in the latter, the disorganization of these regions was also observed. In the Experimental Group II, beta-catenin labeling happened continuously, throughout the intestinal villus. The data were tabulated in Microsoft Excel, analyzed by the PROC GLM (General Linear Models) program of the SAS Software (Statistical Analysis System) for Windows version 9.0 and the Duncan and Tukey tests were used for statistical analysis. The present study found that inoculation by *Leishmania (L.) infantum chagasi* caused changes in the jejunum of mice more significantly in the acute phase of the disease (GEI) than in the chronic phase (GEII), in this tissue reorganization was observed.

Keywords: Visceral Leishmaniasis, jejunum, cell proliferation, ki-67 and beta-catenin

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão Bibliográfica

Figura 1. <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	17
Figura 2. Ciclo heteroxênico da <i>Leishmania</i> .....	20
Figura 3. Formas da <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i> .....	21
Figura 4. Ciclo biológico da <i>Leishmania spp.</i> .....	22

### Capítulo I

Figura 1. Obtenção das amostras biológicas de Camundongos BALB/c, sequência das etapas realizadas.....	44
Figura 2. Fotomicrografia do jejuno de camundongos BALB / c corados com HE, do grupo controle (2 A e B): sem infecção com promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i> ..	47
Figura 3. Fotomicrografia do jejuno de camundongos BALB / c corados com HE, do grupo GEI: 7 dias após infecção com promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i> .....	47
Figura 4 Fotomicrografia do jejuno de camundongos BALB / c corados com HE, do grupo GEII: 50 dias após infecção com promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i> .....	44
Figura 5. Resumo gráfico .....	48

### Capítulo II

Figura 1. Obtenção das amostras biológicas de Camundongos BALB/c, sequência das etapas realizadas.....	68
Figura 2. Amastigotas presentes em medula óssea de camundongos BALB/c após infecção com <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i> , corado com panótico rápido.....	68
Figura 3. Fotomicrografias das seções longitudinais da parede do jejuno de camundongos BALB/c do Grupo Controle 7 dias; Grupo Experimental I; Grupo Controle 50 e Grupo Experimental II, corados com $\beta$ -catetina.....	69



Figura 4. – Fotomicrografias das secções longitudinais da parede do jejuno de camundongos BALB/c do Grupo Controle, corados com Ki-67.....70

Figura 5. Fotomicrografias das secções longitudinais da parede do jejuno de camundongos BALB/c infectados com promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, 7 e 50 dias, (GEI e GEII), respectivamente, corados com Ki-67.....70

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

Tabela 1. Delineamento experimental dos grupos de animais.....	38
Tabela 2: Parâmetros observados no jejuno de camundongos BALB/c experimentalmente infectados com <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i> e não infectados.....	40

### Capítulo II

Tabela 1. Delineamento experimental dos grupos de animais.....	60
Tabela 2: Peso e desvio-padrão dos camundongos BALB/c segundo o tratamento aplicado..	60

## LISTA DE ABREVEATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

<b>APC</b>	Células apresentadoras de Antígenos
<b>CDC</b>	Centers for Disease Control and Prevention (Centros de Controle e Prevenção de Doenças)
<b>Células M</b>	Microfold Cells (Células microfenestradas)
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética no Uso de Animais
<b>CONCEA</b>	Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>cm</b>	Centímetro
<b>DAB</b>	Diaminobenzidine
<b>DMOR</b>	Departamento de Morfologia
<b>DNES</b>	Células Enteroendócrinas
<b>DNT</b>	Doença Tropical Negligenciada
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>g</b>	Grama
<b>GC</b>	Grupo controle
<b>GEI</b>	Grupo Experimental I
<b>GEII</b>	Grupo Experimental II
<b>HE</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>HIV</b>	Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
<b>IHQ</b>	Imunohistoquímica
<b>IL</b>	Interleucina
<b>L.</b>	Leishmania
<b>LM</b>	Leishmaniose Mucosa
<b>LT</b>	Leishmaniose Tegumentar
<b>LV</b>	Leishmaniose Visceral
<b>m</b>	Metro
<b>mg/kg</b>	Miligrama por Kilograma
<b>min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitro

<b>mL/KL</b>	Mililitros/Kilolitros
<b>OPAS</b>	Organização Pan-Americana de Saúde
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PAHO</b>	Pan American Health Organisation
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>PKDL</b>	Leishmaniose dérmica pós-calazar (Post-kala-azar dermal leishmaniasis)
<b>q.s.p.</b>	quantidade suficiente para
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SFM</b>	Sistema Fagocítico Mononuclear
<b>SINAN</b>	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
<b>SNE</b>	Sistema Nervoso Entérico
<b>TGI</b>	Trato Gastrointestinal
<b>TH</b>	T Helper
<b>TNF-<math>\gamma</math></b>	Fator de Necrose Tumoral $\gamma$
<b>UFPI</b>	Universidade Federal do Piauí
<b>WHO</b>	World Health Organization
<b><math>\mu\text{m}</math></b>	Micrômetro
<b><math>\mu\text{m}^2</math></b>	Micrômetro ao quadrado

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução</b> .....	15
<b>2 Revisão Bibliográfica</b> .....	17
2.1 Epidemiologia da Leishmaniose Visceral.....	17
2.2 Clínica da Leishmaniose Visceral.....	24
Referências Bibliográficas.....	27
<b>3 Capítulo I: Histopatologia do jejuno de camundongos BALB/c experimentalmente infectados com <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i></b> .....	33
Resumo.....	34
Palavras-chave.....	34
Abstract.....	35
Introdução.....	36
Materiais e Métodos.....	37
Resultados e Discussão.....	41
Conclusão.....	44
Referências bibliográficas.....	45
<b>4 Capítulo II: Expressão de Beta-catenina e Ki-67 no jejuno de camundongos BALB/c com <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i></b> .....	49
Resumo.....	50
Palavras-chave.....	50
Abstract.....	51
Introdução.....	52
Materiais e Métodos.....	54
Resultados.....	58
Discussão.....	61
Conclusão.....	64
Referências bibliográficas.....	66
<b>5 Considerações finais</b> .....	71

## 1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é categorizada por quatro síndromes clínicas: leishmaniose cutânea; leishmaniose mucosa (espúndia); leishmaniose visceral (calazar) e leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL) (CHAPPUIS et al, 2007). A Leishmaniose Visceral (LV) ou calazar é uma doença infecciosa parasitária tropical negligenciada (DEBROY et al., 2017). Apresenta ciclo zoonótico nas Américas e constitui um problema de saúde pública no Brasil em função da alta morbidade e mortalidade (BARRETO et al., 2011; ALVAR et al., 2012; WHO, 2018). É uma patologia grave por produzir formas clínicas severas que podem causar deformidades e incapacidades, sendo fatal em até 90% dos casos não tratados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE - OPAS/OMS, 2016).

Trata-se de uma enfermidade causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos ao homem através da picada de flebotômíneos hematófagos, fêmeas infectadas, sendo *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie responsável pela transmissão no Brasil (PEARSON, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; WHO, 2019).

Nas Américas, a espécie prevalente é a *Leishmania (L.) infantum chagasi* e a infecção acontece quando o flebótomo, durante o repasto, injeta saliva contaminada com formas promastigotas que invadem as células do sistema fagocítico mononuclear de seres humanos, canídeos domésticos e silvestres, entre outros animais e desenvolvem a doença (MARCILI et. al., 2014; MARCONDES; ROSSI, 2013; WHO, 2018).

O espectro patológico depende da espécie do parasita infectante e da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro à infecção (FIOCRUZ, 2013), podendo evoluir para Leishmaniose Tegumentar (LT) caracterizada por lesões na pele, Leishmaniose Mucosa (LM) que afeta as mucosas do nariz e da boca e a LV que é a forma mais grave da infecção e como o nome indica acomete as vísceras, sobretudo fígado, baço, gânglios linfáticos e medula óssea (FIOCRUZ, 2013). A estimativa é de 50.000 a 90.000 mil novos casos de LV ocorram em todo o mundo a cada ano (WHO, 2019).

A infecção por LV se caracteriza clinicamente por se apresentar como uma enfermidade generalizada crônica, com febre irregular e de longa duração, emagrecimento, anemia, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia, hipoalbuminemia, hemorragias, imunodeficiência, estado de debilidade progressivo levando a caquexia e ao óbito nos casos sem tratamento adequado e em tempo hábil, em consequência da infiltração de formas amastigotas do parasita nos sítios de infecção do parasitismo já citados (ALVARENGA et al., 2010; BARRETT; CROFT, 2012; MENDONÇA et. al., 2017; FIOCRUZ, 2013; WHO, 2019).

Padrões histopatológicos embasam o conhecimento sobre as diferentes reações patológicas associadas à leishmaniose visceral nos órgãos (GUERRA et al., 2016) e a presença das amastigotas nas células mononucleares, infiltrado inflamatório, hiperplasia e hipertrofia celular, fibrose e granuloma são os principais achados microscópicos (OLIVEIRA, SANTORO, SADIGURSKY, 1993; VERSOÇA, 2015).

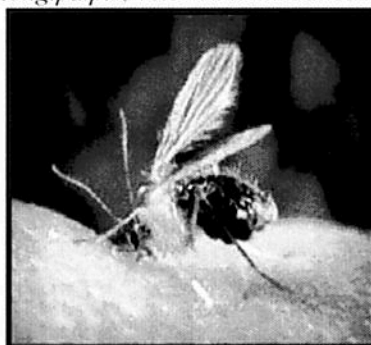
Neste contexto, diante da escassez de conhecimentos sobre os efeitos da leishmaniose no trato gastrintestinal, realizou-se técnicas histológicas e imunohistoquímicas para identificar as variações no perfil de proliferação e arquitetura celular frente a infecção pelo parasita por meio dos marcadores ki-67 e Beta-catenina, além de verificar alterações na histopatologia do jejuno de camundongos BALB/c experimentalmente infectados por *Leishmania (L.) infantum chagasi*. Portanto, esta pesquisa é relevante para aquisição de dados biológicos, histológicos e morfométricos, propiciando melhor entendimento da fisiopatologia da LV nos sítios intestinais, assim como para elucidar vários aspectos do desenvolvimento da doença, informações necessárias para aumentar a eficiência das estratégias de prevenção e controle e dessa forma minimizar os problemas com doenças ignoradas, especificamente a Leishmaniose Visceral.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL

O agente etiológico da doença LV é um protozoário do gênero *Leishmania*, (ROSS, 1903; HERWALDT, 1999) que está incluído na Ordem Kinetoplastea, Família Trypanosomatidae, da espécie *Leishmania donovani* no Velho Mundo, regiões da Índia, Paquistão, China e África, e *Leishmania infantum* na região do Mediterrâneo (D'AVILA-LERY et al., 2015). No Novo Mundo, a LV é causada por *Leishmania Chagasi*, sinônimo de *Leishmania Infantum* (MAURÍCIO et al., 2000; LUKES et al., 2007), espécie encontrada em todas as regiões do Brasil (MCGWIRE; SATOSKAR, 2013). Tais protozoários são transmitidos por insetos dípteros pertencentes a Família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e aos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo, espécie *Lutzomyia longipalpis* que no Brasil apresenta ampla distribuição geográfica (DEANE, 1956; YOUNG; DUNCAN, 1994; LAINSON; RANGEL, 2005), Figura 1.

**Figura 1-** Inseto Flebotomíno fêmea da espécie *Lutzomyia longipalpis*, vetor da leishmaniose.



Fonte: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>

A LV é classificada como Doença Tropical Negligenciada (DTN) por ser infecto-parasitária causada pela invasão do parasita aos macrófagos do hospedeiro (FEASEY et al., 2009; FUERTES et al., 2008) e está relacionada a pobreza, uma vez que afeta principalmente indivíduos que vivem em condições socioeconômicas desfavoráveis, habitando lugares com falta de saneamento básico, como rede de esgoto e coleta de lixo, ambientes que pelo acúmulo de matéria orgânica, são propícios a proliferação dos vetores, aumentando o risco de infecção e tornando-se ainda mais vulneráveis porque o acesso aos serviços de saúde é difícil (COSTA et al., 2005; BOELAERT et al., 2014). Associada a desnutrição, deslocamento populacional, moradia precária, sistema imunológico debilitado e falta de recursos financeiros, está também



ligada a mudanças ambientais como o desmatamento, construção de barragens, esquema de irrigação e urbanização desorganizada, que causam o desequilíbrio ecológico (DE ALMEIDA; WERNECK; RESENDES, 2014; WHO, 2019).

A LV é uma endemia que representa um problema de saúde pública em vários países do mundo (LARANJEIRA et al, 2014; TORRES-GUERRERO et al., 2017). Sua propagação tem sido atribuída a vários fatores, principalmente a problemas como: falha terapêutica e alta incidência de efeitos adversos aos fármacos de primeira linha para o tratamento da doença; toxicidade elevada dos fármacos de segunda linha e emergência de cepas resistentes do parasito; tratamento exclusivamente parenteral com injeções diárias; baixa adesão dos pacientes ao esquema de tratamento e quantidade insuficiente de medicamentos para tratar os doentes em áreas endêmicas (HERWALDT, 1999; OLIVEIRA et al., 2011; INFOLEIS, 2017).

Os primeiros casos de LV no mundo foram notificados em 1903, quando William Leishman encontrou o parasito em um soldado na Índia e Charles Donovan confirmou a descrição de *Leishmania* em outro estudo independente, onde amastigotas foram observadas no interior de macrófagos obtidos de pessoas infectadas (ROSS, 1903). Já o papel do cão como hospedeiro foi demonstrado por Charles Nicolle em 1908 e foi confirmada a transmissão do protozoário ao homem através da picada de *Phlebotomus argentipes* em 1924, dados importantes para a compreensão do ciclo biológico da doença (BADARÓ et al., 1986).

Os dados atuais mostram a distribuição mundial da doença em 76 países, sendo que mais de 95% dos novos casos em 2017, notificados a Organização Mundial da Saúde (OMS), ocorreram nos seguintes países: Bangladesh, Brasil, China, Etiópia, Índia, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão. É endêmica em 12 países das Américas (PAHO-WHO, 2018; OPAS/OMS, 2018; WHO, 2019) e, 59.769 casos novos da doença foram registrados neste continente no período de 2001-2017, resultando em uma média de 3.516 casos por ano. Desse total, aproximadamente 96% (57.582) foram reportados pelo Brasil, entretanto, países Sul Americanos como Argentina, Colômbia, Paraguai e Venezuela possuem elevados registros da doença. Por outro lado, alguns países da América Central, como Honduras e Guatemala que apresentavam anteriormente casos esporádicos de LV, reportaram nos últimos anos um aumento ou registro anual constante de casos (OPAS/OMS, 2018). Também em 2017, 7.97% (338) dos casos apresentaram coinfeção LV/HIV, sendo que, deste total, 322 (95.3%) ocorreram no Brasil, 13 (3.85%) casos no Paraguai, 2 (0,59%) na Argentina e 1 (0.3%) na Colômbia (PAHO-WHO, 2018; OPAS/OMS, 2018).

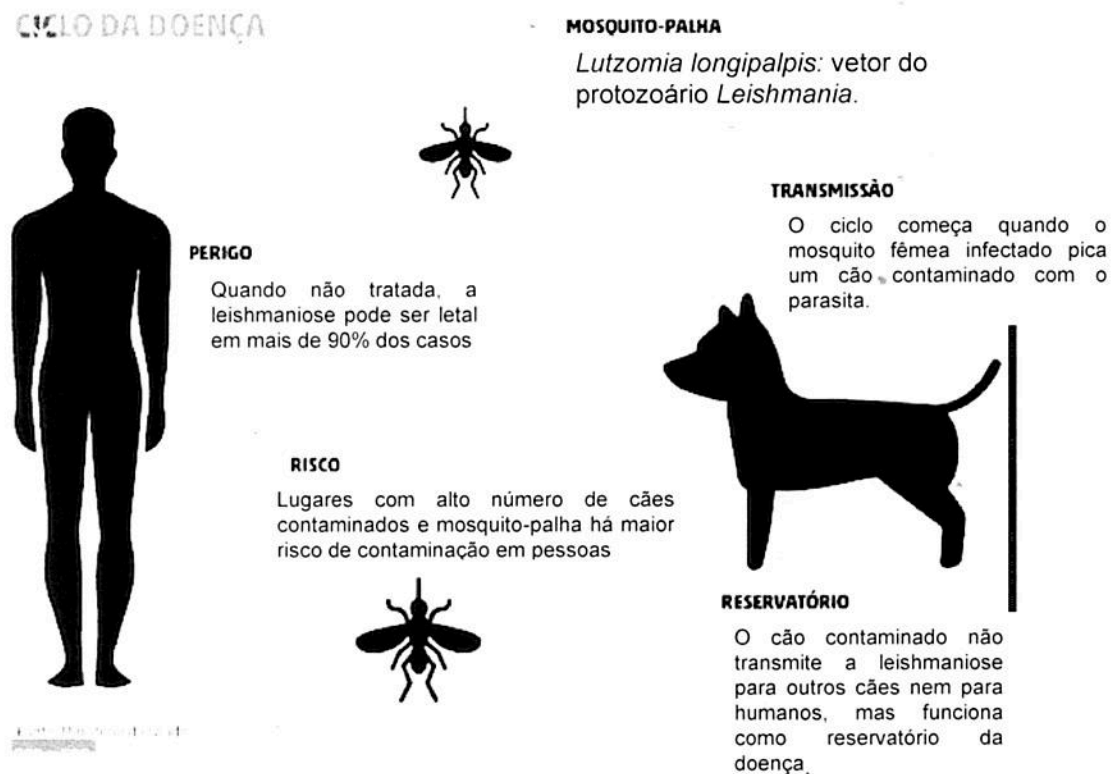
O primeiro relato de LV no Brasil ocorreu em 1934, quando amastigotas de *Leishmania* foram encontrados em cortes histológicos do fígado de pessoas que morreram

com suspeita de febre amarela (PENNA, 1934). Chagas, em 1936, diagnosticou os primeiros casos autóctones do Brasil, nos estados do Ceará e Sergipe, e 20 anos depois é que dados epidemiológicos revelaram o primeiro surto de LV no país através de investigações sobre os reservatórios e vetores efetuadas no estado do Ceará (DEANE, 1956). Contudo, os estados do Piauí e Maranhão são os que apresentam maior número de notificação por LV, seguidos dos estados do Pará, Tocantins, Ceará, Bahia e Rio de Janeiro (WERNECK, 2010; SOUSA, NUNES E FREIRE, 2019).

A *Leishmania* possui capacidade de adaptação a diferentes ecossistemas e pode infectar diferentes espécies de mamíferos (WHO, 2019; NUNES et al., 2010). O ciclo de vida do parasito é heteroxênico (RIBEIRO, 1997; LAINSON; SHAW, 1988), alternando estágios entre hospedeiros silvestre (edentados, marsupiais e roedores), domésticos (cão, suínos, felinos, equinos) e invertebrados (NERY GUIMARÃES et al., 1968; SHERLOCH et al., 1984; OLIVEIRA et al., 2005; QUARESMA et al., 2011; BRAZIL; NASCIMENTO E MACAU, 1987; PENNISI et al., 2004; SOUZA, 2005; AGUILAR et al., 1986; GONTIJO; MELO, 2004; DEANE, 1956; DEANE, 1961; ASHFORD, 2000; QUINNELL; COURTENAY, 2009; MAIA; CAMPINO, 2011; FIGUEIREDO; MADEIRA, 2014). Com os processos de urbanização e periurbanização ocorridos, o cão (*Canis familiaris*) tem sido reportado como principal reservatório natural doméstico da doença, sendo infectado por diferentes espécies de *Leishmanias* e constituindo-se fonte de infecção para os vetores nas áreas endêmicas com grande importância para manutenção do ciclo zoonótico da LV (GONTIJO; MELO, 2004; DEANE, 1956; DEANE, 1961; ASHFORD, 2000; QUINNELL; COURTENAY, 2009; MAIA; CAMPINO, 2011; FIGUEIREDO; MADEIRA, 2014), conforme Figura 2.

Figura 2 - Ciclo heteroxênico da Leishmania

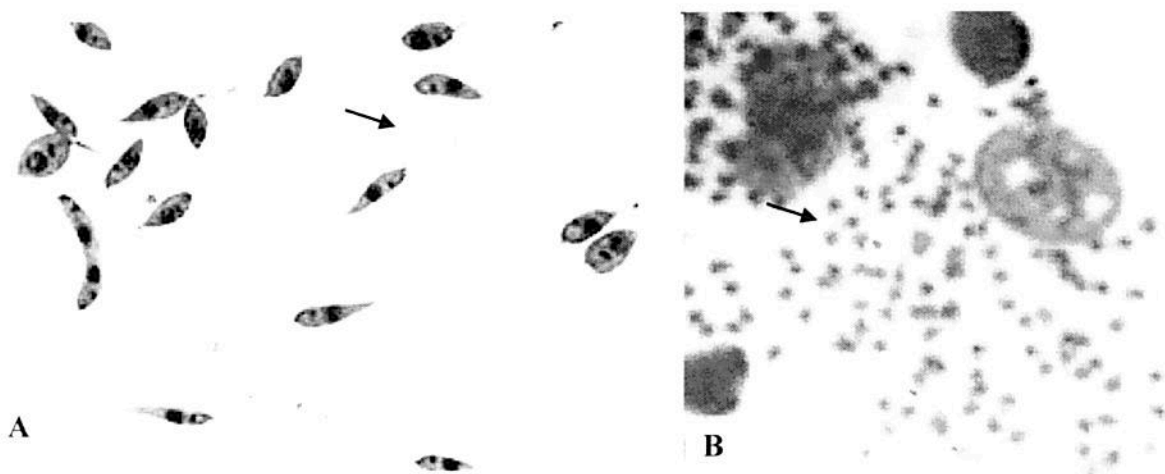
## CICLO DA DOENÇA



Fonte: Adaptado do Ministério da saúde, 2012.

O protozoário da leishmaniose apresenta duas formas evolutivas distintas durante seu desenvolvimento: quando encontrado do hospedeiro invertebrado, especificamente do trato digestório do inseto vetor, é conhecido como promastigota, que é extracelular e possui um formato fusiforme com um longo flagelo (figura 3A). Já quando encontrado no hospedeiro vertebrado, é denominado amastigota (figura 3B), que é o parasita intracelular obrigatório, aflagelado, portanto, imóveis e com formato ovóide, encontrada no interior de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), principalmente em macrófagos, e atinge o sistema retículo-endotelial em vários tecidos, infiltrando-se principalmente no baço, medula óssea, fígado e linfonodos (MIRANDA et al., 2007; GRIENSVEN et al., 2014; BRAZIL; NASCIMENTO E MACAU, 1987).

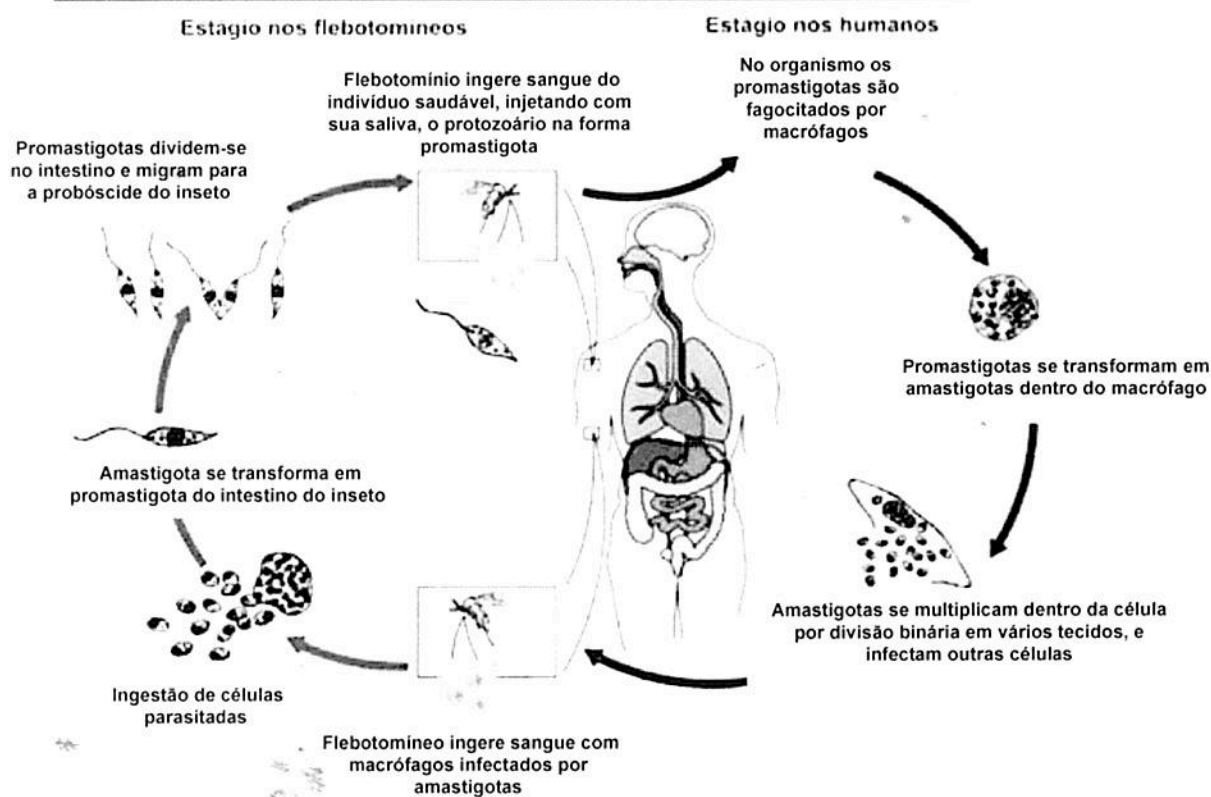
**Figura 3-** Formas da *Leishmania (L.) infantum chagasi* – promastigota (A), fusiforme, possui flagelo (→) e amastigota (B) – circular, sem flagelo (→→)



Fonte: <http://fpslivroaberto.blogspot.com/2009/12/parasitas-leishmania-spp.>

A transmissão do protozoário no homem ocorre durante o repasto sanguíneo das fêmeas de flebotomíneos e a infecção inicia-se quando o inseto vetor regurgita formas promastigotas do parasito na derme dos hospedeiros vertebrados. Estas são fagocitadas pelos macrófagos da pele, onde sofrem transformação para formas amastigotas que se multiplicam dentro dos endossomos das células do SFM por divisão binária até ocuparem todo o citoplasma e, quando os macrófagos estão densamente parasitados, rompem-se liberando novas amastigotas que irão parasitar novos macrófagos tornando o hospedeiro infectado (RUSSEL; ALEXANDER, 1988). Em novo repasto sanguíneo, as fêmeas ingerem formas amastigotas do parasito que sofrem várias transformações, migram para as porções anteriores do tubo digestório, onde sofrem modificação para a forma promastigota e subsequentemente são inoculados em um novo hospedeiro reiniciando o ciclo da infecção conforme Figura 4 (CHANG, 1978; LIMA, 2007).

Figura 4- Ciclo biológico da *Leishmania spp.*



Fonte: adaptado de CDC, 2015.

A LV continua sendo um desafio para a saúde porque requer um grande esforço técnico, operacional e político para manter o desenvolvimento sistemático das ações de vigilância, prevenção e controle da infecção. Neste enfoque, como a presença do vetor e de hospedeiro/reservatório susceptível são determinantes para que a doença ocorra em determinada área (GONTIJO; MELO, 2004; ARONSON; HERWALDT; LIBMAN, 2017), o programa de vigilância, prevenção e controle das leishmanioses é baseado na detecção de casos e tratamento da doença, combinado com outras medidas de educação em saúde por meio da realização de atividades para conscientização da população e, sobretudo, melhorias nas condições de trabalho, moradia e infraestrutura, principalmente da população que reside e trabalha em condições de maior exposição à doença (CHAPPUIS et al., 2007; BATISTA et al., 2014; LARANJEIRA et al., 2014; OPAS/OMS, 2019), somadas a medidas dirigidas ao vetor e ao reservatório, como a redução da população de flebotomíneos através da distribuição de repelentes, telas/mosquiteiros; e a eutanásia de cães infectados em áreas endêmicas, condutas que devem ser incorporadas ao dia-a-dia dos moradores e priorizadas pela Secretária Estadual

de Saúde (CARDOSO, 2009; SOUSA; NUNES; FREIRE, 2019; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

No Brasil, o cenário da doença é complexo e apresenta elevada incidência, por isso, estudos sobre esta enfermidade são imprescindíveis para fornecer subsídios a políticas públicas como adoção de medidas preventivas, diagnóstico precoce e conscientização dos profissionais da saúde para que possam traçar protocolos de tratamentos cada vez mais direcionados às necessidades da população atingida, visando à redução do número de internações hospitalares e do índice de mortalidade causada pela enfermidade (SOUSA; NUNES; FREIRE, 2019).

No nordeste brasileiro, a caracterização epidemiológica da doença foi realizada por Lucena e Medeiros em 2018. Estes pesquisadores realizaram um estudo de uma série de casos de LV notificados no SINAN entre 2010 a 2017, do qual 16.063 casos foram confirmados em indivíduos residentes na região, o que representa 50,7% do total de casos do país. Nos estados do Maranhão, Ceará, Bahia e Piauí se concentram a maior totalidade dos casos e o Piauí apresenta a maior taxa de incidência da doença (10,69/100.000 habitantes). Estes números encontrados não mudaram significativamente ao longo dos últimos anos, apresentando apenas pequenas variações, o que indica que são necessárias mais ações preventivas por parte dos órgãos responsáveis e mais estudos sobre a enfermidade que possam influenciar estratégias de mais efetivas para que seja alcançado um maior controle da infecção, melhorando a qualidade de vida da população (LUCENA; MEDEIROS, 2018).

Particularmente, no Estado do Piauí, os números da doença continuam elevados, indicando que o estado é endêmico (PONTES, 2008; SILVA et al., 2011; SANTOS et al., 2017). Em 2019, Sousa, Nunes e Freire realizaram um estudo para descrever o perfil epidemiológico dos pacientes com LV em Teresina – PI, durante o período entre 2007 a 2016 e encontraram 3032 notificações de pacientes atendidos com a doença neste período pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), não registrando redução significativa do número de notificações no transcorrer destes anos. Do total de casos, 71,3% são residentes na zona urbana, sendo que a maioria é da cidade de Teresina, mais de 50% são menores de 10 anos de idade e o sexo masculino possui maior frequência. Também foi observado que existe uma relação de infecção pela LV com soropositivos, acentuada pelo sexo, idade e baixa escolaridade (SOUSA; NUNES; FREIRE, 2019), mostrando a necessidade de políticas públicas locais direcionadas para prevenção, controle e tratamento efetivo da doença.



## 2.2 – CLÍNICA DA LEISHMANIOSE VISCERAL

O intestino delgado, em humanos, é composto por três regiões anatômicas: duodeno, jejuno e íleo. O duodeno é a parte inicial, mais curta e fixa do órgão, de localização retroperitoneal, estendendo-se do óstio pilórico até a junção duodenojejunal e que descreve um trajeto em forma de C ao redor da cabeça do pâncreas com quem possui importantes relações anatômicas por que recebe o suco pancreático produzido pelo órgão (MOORE; DELLEY; AGUR, 2012). Em continuidade, encontra-se o jejuno, segundo segmento do intestino delgado e junto ao íleo formam as alças intestinais, parte móvel do intestino delgado, fixada a parede posterior do abdome pelo mesentério. Apesar do jejuno não apresentar limite nítido com o íleo, possui pregas circulares mais numerosas em sua parte proximal, enquanto no segmento distal se tornam menores e menos numerosas, é mais calibroso, possui coloração vermelho mais vivo e paredes mais espessas quando comparado ao íleo (DÂNGELO; FATTINI, 2011). Este, constitui a porção final do intestino delgado ao nível da junção ileocecal e estabelece continuidade com o intestino grosso. (DÂNGELO; FATTINI, 2011; MOORE; DELLEY; AGUR, 2012). Estas três partes do intestino delgado possuem constituição histológica semelhante, apresentando estrutura de parede típica dos órgãos do tubo digestório, formada pelas camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa (MONTANARI, 2016; GARTNER; HIATT, 2003; DÂNGELO; FATTINI, 2011; MOORE; DELLEY; AGUR, 2012), e a compreensão dos constituintes de cada uma delas é importante para o entendimento da instalação e desenvolvimento da Leishmaniose Visceral.

A mucosa intestinal apresenta projeções denominadas vilosidades intestinais revestidas por epitélio cilíndrico simples, onde se observam células absorptivas, os enterócitos, as células caliciformes (produtoras de muco), células de Paneth (atividade antibacteriana), células enteroendócrinas - DNES (secretam hormônios polipeptídeos) e células M com funções imunitárias. (MONTANARI, 2016; GARTNER; HIATT, 2003; GUYTON; HALL, 2006; KOEPPEN et al., 2008). Especificamente, as vilosidades jejunais são relativamente altas e ocupam mais da metade da mucosa, possuem configuração em forma de folha e tornam-se mais digitiformes conforme o íleo se aproxima (ROSS; WOJCIECH; BARNASH, 2012). Um tecido conjuntivo frouxo com glândulas de Lieberkuhn (tubulares retas) forma a lâmina própria, seguida pela muscular da mucosa que separa a túnica mucosa da submucosa (MONTANARI, 2016; GARTNER; HIATT, 2003; GUYTON; HALL, 2006; KOEPPEN et al., 2008).

A túnica submucosa é constituída por tecido conjuntivo denso não modelado com vasos sanguíneos, linfáticos e nervos. No duodeno, esta camada apresenta glândulas túbulo-alveolares compostas mucosas com secreção alcalina (de Brunner) cuja finalidade é neutralizar a acidez do quimo. Estas glândulas atravessam a muscular da mucosa e a lâmina própria, e seus ductos abrem-se na base das glândulas de Lieberkuhn ou entre as vilosidades. Já na submucosa do íleo pode-se observar um conjunto de nódulos linfáticos denominado de placas de Peyer, recobertas por células M que capturam antígenos da luz intestinal por endocitose e os transportam para os macrófagos e linfócitos T situados entre as invaginações (MONTANARI, 2016; GARTNER; HIATT, 2003; GUYTON; HALL, 2006; KOEPPEN et al., 2008).

A camada muscular é composta por músculo liso com forma circular (interna) e longitudinal (externa), que estão separadas por um plexo nervoso mioentérico (de Auerbach), que juntamente com o plexo submucoso (de Meissner) formam uma rede interconectada de neurônios e células da glia, denominado sistema nervoso entérico (SNE), responsável pelo controle nervoso do TGI. O plexo submucoso controla as secreções, absorção e o fluxo sanguíneo local, já o plexo mioentérico regula o peristaltismo intestinal (FURNESS, 2008).

Externamente o órgão é recoberto por uma membrana serosa, constituída por tecido conjuntivo revestido por epitélio pavimentoso simples, o mesotélio que confere uma superfície lisa e úmida (MONTANARI, 2016; GARTNER; HIATT, 2003; GUYTON; HALL, 2006; KOEPPEN et al., 2008). Particularmente, o duodeno é envolvido por serosa e adventícia, enquanto jejuno e íleo são revestidos somente por serosa (ROSS; WOJCIECH; BARNASH, 2012; GARTNER; HIATT, 2002).

Quando agentes nocivos atingem o intestino delgado, como o protozoário *Leishmania (L.) infantum chagasi*, uma reação inflamatória é desencadeada que consiste de uma reação vascular e uma reação celular, caracterizada por migração e ativação de leucócitos com o objetivo de eliminar a causa inicial da lesão celular e suas consequências (ROBBINS; COTRAN, 2010). A primeira resposta a lesão celular e tecidual é a inflamação aguda, caracterizada por aumento da permeabilidade vascular e migração de leucócitos, principalmente de neutrófilos, no intuito de eliminar o agente agressor, ocorrendo frequentemente destruição tecidual, resposta com duração relativamente curta, só alguns dias que progride para resolução completa, para cicatrização pela substituição do tecido conjuntivo (fibrose) ou para a cronificação da inflamação (ROBBINS; COTRAN, 2010). Neste caso, o



agente agressor não é destruído prontamente ou o material necrótico não é reabsorvido ou eliminado, e se observa infiltrado inflamatório por células mononucleares (macrófagos, linfócitos e plasmócitos), destruição tecidual e tentativa de reparo com produção de tecido conjuntivo (ROBBINS&COTRAN, 2010).

No conjunto, a barreira gastrointestinal compreende vários mecanismos de defesa, tais como bactérias comensais, a camada de muco, a morfologia das túnicas intestinais, neurônios entéricos e defesas imunológicas, associadas aos tecidos linfóides e placas de Peyer, encontradas principalmente no íleo (KEITA; SÖDERHOLM, 2010; BAILEY et al., 2011), que protegem o organismo do ambiente externo contra bactérias, toxinas e parasitas (TURNER, 2009). A resposta imunológica no intestino delgado é acelerada a medida que células de defesa estão especificamente localizadas, agindo primeiro na infecção e depois na liberação de citocinas para estimular a resposta imune que pode ocorrer no órgão (BUZONIGATEL; WERTS, 2006; MOREIRA, 2013).

Para estudar os aspectos relacionados com a imunidade frente a infecção por *Leishmania*, estudos foram realizados em modelos murinos e demonstraram que, na modulação da resposta imune, macrófagos parasitados e outras células apresentadoras de antígeno (APC) apresentam antígenos de *Leishmania* aos linfócitos T do tipo CD4+. Estes linfócitos são estimulados a produzir interleucinas (IL) e dependendo do perfil estimulado, ocorre o desenvolvimento de duas subpopulações de linfócitos TH (T helper): TH do tipo 1 (TH1) que secreta grande quantidade de TNF- $\gamma$  associado a produção de citocinas pró-inflamatórias para controlar a infecção e TH do tipo 2 (TH2) que produz grande quantidade de IL-4 associada a citocinas promotoras da produção de anticorpos produzidos por linfócito B, mais correlacionada com o processo progressivo da doença (NEVES, 2012).

A indução preferencial das células TH1 ou TH2 depende de fatores como por exemplo a dose infectante, o padrão genético do hospedeiro e o estado imunológico e nutricional do indivíduo (NEVES, 2012). A depender destes fatores, pessoas que contraem a infecção podem reagir de diferentes maneiras: evoluir para a cura espontânea ou, a partir da pele, os parasitas podem migrar para linfonodos, para as vísceras e apresentar os sintomas característicos da doença (NEVES, 2012).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGUILAR, C.M.; RANGEL, E.F.; DEANE, L.M. Cutaneous leishmaniasis in frequent in equines from an endemic area in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 81, n.4, p. 471-472, out./dez. 1986.
2. ALVARENGA, D. G. de et al. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, n. 2, p.194-197, mar./abr. 2010.
3. ALVAR, J. et. al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **Journal.pone**, v.7, n.5, p: e35671, maio. 2012.
4. ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol.** v.30, n.12-13, p.1269-81, nov. 2000.
5. ARONSON, N.; HERWALDT, B.L.; LIBMAN, M. et al. Diagnóstico e tratamento da leishmaniose: diretrizes de prática clínica pela Sociedade de Doenças infecciosas da América (IDSA) e pela Sociedade Americana de medicina Tropical e Higiene (ASTMH). **Am J Trop Med Hyg**, v. 96, n. 1, p. 24 – 45, dez. 2017.
6. BADARÓ, R. et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in endemic area of Brazil. **J. infect. Dis.**, v. 154, n.1, p. 639-49, out. 1986.
7. BAILEY, M.T.; et al. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: Implications for stressor-induced immunomodulation. **Brain, Behavior, and Immunity**; v. 25, n.3, p. 397-407. 2011.
8. BARRETT, M.P; CROFT, S.L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **British Medical Bulletin**, v.104, p. 175–96, Nov. 2012.
9. BARRETO, M.L. at al. Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. **Lancet**, v. 377, p. 1877-1889, maio/jun. 2011.
10. BATISTA, F.M.A. et al. Leishmaniose: perfil epidemiológico dos casos notificados no estado do Piauí entre 2007 e 2011. **Revista Univap**, v. 20, n. 35, jul. 2014.
11. BOELAERT, M. et al. **Testes rápidos para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral em pacientes com suspeita de doença, 2014.** Disponível em: <https://www.cochrane.org/pt/CD009135/testes-rapidos-para-o-diagnostico-da-leishmaniose-visceral>. Acesso em: 19 jul.2019.
12. BRAZIL, R.P.; NASCIMENTO, M.D.S.B.; MACAU, R.P. Infecção natural do porco (*Sus scrofa*) por *Leishmania* em foco recente de leishmaniose tegumentar na Ilha de São Luís, Maranhão. **Mem Inst Oswaldo Cruz**.v. 82, n.1, p. 145. 1987.
13. BUZONI-GATEL, D.; WERTS, C. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. **Trends and Parasitology**, v. 22, n.10, p. 448-52. 2006.
14. CARDOSO, J.F. **Estratégias para o Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina em Ações de Vigilância.** 2009. 36f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários), Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.
15. CHAGAS, E. **Primeira verificação em indivíduo vivo, da leishmaniose visceral no Brasil.** Rio de Janeiro: Brasil Médico,1936.

16. CHAPPUIS, F. et al. A metanalysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. **BMJ**, v. 723, n. 333, nov. 2007.
17. CHANG K.P. Leishmania infection of human skin fibroblasts in vitro: absence of phagolysosomal fusion after induced phagocytosis of promastigotes, and their intracellular transformation. **Am J Trop Med Hyg**, v. 27, n. 6: p.1084-96. 1978.
18. COSTA, J.M.L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Gazeta Medica da Bahia**, v. 75, n.1, p.3-17. 2005.
19. DÂNGELO, J.G.; FATTINI, C.A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2011.
20. D'ÁVILA – LERY et al. Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 8, nov. 2015.
21. DEANE, L.M. **Leishmaniose Visceral no Brasil**: Serviço Nacional de Educação Sanitária. Rio de Janeiro, 1956.
22. DEANE, L. M. Reservoirs of Leishmania donovani in Brazil. **Rev. Assoc. Med. Bras**, n.7, p.161-169, jun. 1961.
23. DE ALMEIDA, A. S.; WERNECK, G. L.; RESENDES, A. P. C. Classificação orientada a objeto de imagens de sensoriamento remoto em estudos epidemiológicos sobre leishmaniose visceral em área urbana. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 8, p. 1639-1653, ago. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/csp/v30n8/0102-311X-csp-30-8-1639.pdf>. Acesso em: 26 jul. 2019.
24. DEBROY, S. et al. Challenges in modeling complexity of neglected tropical diseases: a review of dynamics of visceral leishmaniasis in resource limited settings. **Emerging Themes in Epidemiology**, v.14, n. 1, p. 1-14, set. 2017.
25. FEASEY, N. et al. Neglected tropical diseases. **British Medical Bulletin**, v. 93, n.1, p. 179–200. 2009.
26. FIGUEIREDO, F.B.; MADEIRA, M.F. **Os parasitas e a questão da infecção em animais domésticos e domiciliados**: leishmanioses do continente americano. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014.
27. FIOCRUZ: **Leishmaniose**. 2013. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/leishmaniose>. Acesso em: 02 jul.2019.
28. FUERTES, M. A. et al. Anticancer Compounds as Leishmanicidal Drugs: Challenges in Chemotherapy and Future Perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 433-439. 2008.
29. FURNESS, J.B. The enteric nervous system: normal functions and enteric neuropathies. **Neurogastroenterology e Motility**, v. 20, n.1, p. 32-38. 2008.
30. GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de Histologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2003.

31. GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Atlas colorido de Histologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002.
32. GONTIJO C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Revista Brasileira de Epidemiologia, SciELO Public Health**. 2004.
33. GRIENSVEN, J. V. et al. Leishmaniose em indivíduos imunossuprimidos. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 4, p. 286 – 299, abril. 2014.
34. GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
35. GUERRA, J. M. et al. Avaliação do exame imuno-histoquímico para o diagnóstico da *Leishmania* spp. em amostras de tecidos caninos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 75, p. 01-10, fev. 2016.
36. HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v.2, n.354, p. 1191-9. 1999.
37. INFOLEISH, 2018. **Boletim informativo da LEISH** – Resumo das atividades de 2017 e perspectivas para 2018. 2017. Disponível em: <https://document.onl/documents/infoleish-boletim-informativo-da-redeleish-3a-edicao-leishmaniose-mucosa.html>. Acesso em: 09 jul.2019.
38. KEITA, A.V.; SÖDERHOLM, J.D. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. **Neurogastroenterology & Motility**,v. 22, n.1, p.718-733. 2010.
39. KOEPPEN, B.M. et al. **Physiology**. 6ª ed. Philadelphia: Elsevier, 2008.
40. LAINSON, R.; SHAW, J.J. Observations on the development of *Leishmania* (L.) *chagasi*. Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). **Ann Parasitol Hum Comp**, v.63, n.2, p.134-45, mar. 1988.
41. LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.100, n.8, p.811-27, dez. 2005.
42. LARANJEIRA, D. F. *et al.* Serological and infection statuses of dogs from a visceral leishmaniasis-endemic area. **Rev Saúde Pública**. v. 48, n. 4, p. 563-570, ago. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4181098/>. Acesso em: 25 jul. 2019.
42. LIMA, W.G. et al. Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b/CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. **Vet Immun. And Immunopathol**, v. 117, n.1-2, p.129-136.2007.
44. LUCENA, R.V; MEDEIROS, J.S. Caracterização epidemiológica da leishmaniose visceral humana do nordeste brasileiro entre 2010 e 2017. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 14, n.4, p.285-298, out/dez. 2018.
45. LUKES, J. et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **PANS**, v.104, n.22, p.9375-9380, maio. 2007.

46. MACDONALD, T.T.; MONTELEONE, G. Immunity, Inflammation, and Allergy in the Gut. **Science**, v. 307, n.1, p. 1920-1925. 2005.
47. MAIA, C.; CAMPINO, L. Os gatos domésticos podem ser considerados hospedeiros reservatórios da leishmaniose zoonótica? **Tendências Parasitol**, v. 27, n.8, p. 341-344, ago. 2011.
48. MARCILI, A. et al. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in South America. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 25, p. 44-51, jul. 2014.
49. MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, p. 341-352, out. 2013.
50. MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A.R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **Qjm**, v.107, n.1, p.7-14, Jan. 2013.
51. MAURICIO, I. L., J. R. STOTHARD, et al. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today**, v.16, n.5, p.188-9, maio. 2000.
52. MENDONÇA, C. et al. Description of Visceral, Lymphatic and Central Nervous System Lesions in Dogs Infected with *Leishmania* spp. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.6, n.3, p.89-94, set. 2017.
53. MINISTÉRIO DA SAÚDE: **Leishmaniose Visceral: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção**. 2010. Disponível em: <http://www.saude.gov.br>. Acesso em: 02 jul.2019.
54. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Ministério da Saúde, n. d. Leishmaniose visceral, 2019**. [ www Document]. URL [http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose visceral](http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral), acessado em 8 jan. 2020.
55. MIRANDA, et al. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v.73, n. 6, p. 843-7, dez. 2007.
56. MONTANARI, T. **Histologia Texto, atlas e roteiro de aulas práticas**. 3ª ed. Porto Alegre: Edição do Autor, 2016.
57. MOREIRA, P. R. **Resposta imune diferenciada no fígado e no baço de cães com leishmaniose visceral**. 2013. 77f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, 2013.
58. MOORE, K.L.; DALLEY, A.F.; AGUR, A.M.R. **Anatomia orientada para a clínica**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
59. NERY-GUIMARÃES, F.; DAMASCENO, R.; AZEVEDO M. Leishmaniose tegumentar – zoonose de roedores silvestres na Amazônia. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 66, n.2, p. 151-168, ago. 1968.
60. NEVES, D.P. et al. **Parasitologia Humana**. 11ª ed. São Paulo: Atheneu, 2012.



61. NUNES, W. S. *et al.* Epidemiological profile of leishmaniasis at a reference service in the state of Alagoas, Brazil, from January 2000 to September 2008. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 14, n. 4, p. 342-345, ago. 2010.
62. OLIVEIRA, G. G. de S.; SANTORO, F.; SADIGURSKY, M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 2, p. 243-248, abr./jun. 1993.
63. OLIVEIRA, F.S. *et al.* PCR based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. **Vet Parasitol**, v.129, n. 1, p.219-227, maio. 2005.
64. OLIVEIRA, L.F. *et al.* Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment em the New World. **Acta Tropical**, v. 118, n.1, p. 87-96, maio. 2011.
65. ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE - OPAS/OMS. **Leishmanioses. Informe Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas**, n. 4, Julho, 2016. Disponível em: [www.paho.org/leishmaniasis](http://www.paho.org/leishmaniasis). Acesso em: 02 jul.2019.
66. ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE - OPAS/OMS. **Leishmanioses, Informe de Leishmanioses**, n. 6 - Fevereiro, 2018 Informe Epidemiológico das Américas. Disponível em: [www.paho.org/leishmaniasis](http://www.paho.org/leishmaniasis). Acesso em: 06 jul.2019.
67. ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE - OPAS/OMS. **Leishmanioses, Informe Epidemiológico das Américas Informe de Leishmanioses**, n.7 - Março, 2019. Disponível em: [www.paho.org/leishmaniasis](http://www.paho.org/leishmaniasis). Acesso em: 06 jul.2019.
68. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION – PAHO - WHO. **Informe epidemiológico das Américas. Leishmanioses**. 2018. Disponível em: [www.paho.org](http://www.paho.org). Acesso em: 18 jul.2019.
69. PEARSON, R. **Leishmaniose**. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Disponível em : [bvsms.saude.gov.br](http://bvsms.saude.gov.br). Acesso em:11 dez.2018.
70. PENNISI, M.G. Case report of Leishmaniasis in four cats. **Veterinary Research Communications**, v.28, n.1, p.363-366. 2004.
71. PENNA, H.A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Bras Méd**, v. 48, p. 949-50. 1934.
72. PONTES, M.C.Q. **Estudo dos Vetores da Leishmaniose na região fitogeográfica de Saquarema**. 2008. 106f. (Monografia em Saúde Pública)- Faculdade São José, Rio de Janeiro, 2008.
73. QUARESMA, P.F. *et al.* Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in na endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.105, n.10, p. 579-85, out. 2011.
74. QUINNELL, R.; COURTENAY, O. Transmissão, hospedeiro do reservatório e controle da leishmaniose visceral zoonótica. **Parasitologia**, v.136, n.14, p. 1915-1934. Dez. 2009.
75. RIBEIRO, V.M. Leishmanioses. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v.3, n. 11, p. 13-14. 1997.

76. ROBBINS; COTRAN. **Patologia: Bases patológicas das doenças**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
77. ROSS, R. Note on the Bodies Recently Described by Leishman and Donovan. **Br Med J**, v.2, n.2237, p.1261-2. Nov. 1903.
78. ROSS, M.H.; WOJCIECH, P.; BARNASH, T.A. **Atlas de Histologia Descritiva**. Porto Alegre: Artmed. 2012.
79. RUSSELL, D.G.; ALEXANDER, J. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes. **J Immunol**, v. 15, n.140(4): p.1274-9. 1988.
80. SANTOS et al. Aspectos epidemiológicos e clínicos da leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil. **C&D-Revista Eletrônica da FAINOR**, v.10, n.2, p.142-153, jun./ago. 2017.
81. SHERLOCK, I.A. et al. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.79, n.4, p. 511, out./dez.1984.
82. SILVA, A.V.M. et al. Estudo ecológico e mapeamento de risco de leishmaniose em uma área endêmica do Brasil com base em uma abordagem de sistemas de informação geográfica. **Geospat Health**, v. 6, n. 1, p. 33-40. 2011.
83. SOUZA, A.L. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonenses* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.128, n.1-2, p. 41-45, mar. 2005.
84. SOUSA, R.L.T. DE; NUNES, M.I.; FREIRE, S.M. Perfil epidemiológico de pacientes com leishmaniose visceral notificados em hospital de referência em teresina-PI. **RIES, Caçador**, v.8, nº 1, p. 126-135, mar. 2019.
85. TORRES-GUERRERO, E. et. al. Leishmaniasis: a review. **F1000 Research**, v.6, maio. 2017.
86. TURNER, J.R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9; n.1, p. 799–809. 2009.
87. VERÇOSA, B. L. A. **Resposta inflamatória, apoptose e fibrose renal na Leishmaniose visceral canina: estudo histomorfométrico e molecular**. 106f. 2015. (Tese Doutorado em Biologia Celular). Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais. 2015.
88. WHO. **Leishmaniasis**. 2018. Disponível em: [https://www.who.int/gho/neglected\\_diseases/Leishmaniasis/en/](https://www.who.int/gho/neglected_diseases/Leishmaniasis/en/). Acesso: 17 jul.2019.
89. WHO. **Leishmaniasis**. 2019. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso: 18 jun.2019.
90. WERNECK, G.L. Disseminação geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Cad Saude Publica**, v. 26, n. 4, p. 644-5, abr. 2010.
91. YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzmyia* sand flies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memoirs of the American Entomological Institute**, v. 1, n.1, p. 669, mar. 1994.

### 3. CAPÍTULO I:

HISTOPATOLOGIA DO JEJUNO DE CAMUNDONGOS BALB/c  
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania (L.) infantum chagasi*.

**Revista Acta Tropica**

**ISSN: 0001-706x**



## HISTOPATOLOGIA DO JEJUNO DE CAMUNDONGOS BALB/c EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania (L.) infantum chagasi*.

\*Selma Maria Santos Moura<sup>1</sup>, Airton Mendes Conde Júnior<sup>2</sup>.

1 - Departamento de Morfologia. Universidade Federal do Piauí. Teresina, Piauí, Brasil.

2 - Departamento de Morfologia. Universidade Federal do Piauí. Teresina, Piauí, Brasil.

e-mail: airton.conde@ufpi.edu.com.br

\*Autor correspondente: selmamoura@ufpi.edu.br. +55(86) 999454219.

Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela – Ininga, Teresina/PI

### RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecto-parasitária, grave, causada por um protozoário do gênero *Leishmania*. A LV sintomática é considerada fatal quando não tratada. Conhecimentos sobre os efeitos da leishmaniose no trato gastrintestinal são escassos, por isso, se realizou este estudo para avaliar as alterações histológicas causadas pela *Leishmania (L.) infantum chagasi* na morfologia do jejuno de camundongos BALB/c provocadas pela Leishmaniose visceral aguda e crônica. Para esta pesquisa, foram utilizados trinta e seis (36) animais, divididos aleatoriamente, em três (3) grupos, sendo um controle, sem a inoculação da *Leishmania* (GC) e dois Grupos Experimentais I e II (GEI/GEII): animais infectados com *Leishmania (L.) infantum chagasi* e após 7 e 50 dias da infecção, respectivamente. As amostras biológicas foram coletadas seguindo-se os protocolos de anestesia e eutanásia, em sequência foram imersas em solução de formaldeído e realizado o processamento histológico de rotina com coloração por Hematoxilina e Eosina. A análise histopatológica foi realizada com auxílio de um microscópio óptico comum e observou-se a desorganização das criptas e vilosidades intestinais com a presença de processo inflamatório com predominância de linfócitos e plasmócitos. Os dados foram tabulados em Microsoft Excel, analisados pelo programa PROC GLM (General Linear Models) do Software SAS (Statistical Analysis System) for Windows versão 9.0. e o teste de Duncan foi utilizado para análise estatística. Alterações histopatológicas no jejuno dos animais estudados foram encontradas, como a modificação na morfologia e na quantidade de células da parede jejunal.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral, intestino delgado, jejuno, histologia.

## HISTOPATHOLOGY OF THE JEJUNUM OF BALB / c MICE EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *Leishmania (L.) Infantum chagasi*.

### ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a serious infectious-parasitic disease caused by a protozoan of the *Leishmania* genus. Symptomatic VL is considered fatal when left untreated. Knowledge about the effects of leishmaniasis on the gastrointestinal tract is scarce, therefore, this study was carried out to evaluate the histological changes caused by *Leishmania (L.) infantum chagasi* in the morphology of the jejunum of BALB / c mice caused by acute and chronic visceral Leishmaniasis. For this research, thirty-six (36) animals were used, randomly divided into three (3) groups: being a control, without inoculation of *Leishmania* (CG) and two Experimental Groups I and II (GEI / GEII): animals infected with *Leishmania (L.) infantum chagasi* remaining 7 and 50 infected, respectively. The biological samples were collected following the anesthesia and euthanasia protocols, then they were immersed in a formaldehyde solution and the routine histological processing with hematoxylin and eosin staining was performed. The histopathological analysis was performed with the aid of a common optical microscope and the disorganization of the intestinal crypts and villi was observed with the presence of an inflammatory process with a predominance of lymphocytes and plasma cells. The data were tabulated in Microsoft Excel, analyzed by the PROC GLM program (General Linear Models) of the SAS Software (Statistical Analysis System) for Windows version 9.0. and the Duncan test was used for statistical analysis. Histopathological changes in the jejunum of the animals studied were found, such as changes in the morphology and number of cells in the jejunal wall.

Keywords: Visceral Leishmaniasis, small intestine, jejunum, histology.

## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária vetorial causada por um protozoário do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903) que se manifesta nas formas cutânea, mucosa e visceral, causando várias sequelas clínicas que dependem da espécie do parasita e das relações parasita-hospedeiro (WHO,2019). Sua principal forma de transmissão se dá através da picada de flebotomíneos fêmeas hematófagos infectadas, sendo *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie responsável pela transmissão no Brasil com ampla distribuição geográfica no país (PEARSON, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019; WHO, 2019). As formas promastigotas do parasita invadem o sistema fagocítico mononuclear e podem permanecer em órgãos associados desenvolvendo a doença (PEARSON, 2018; MARCILI et al., 2014; WHO, 2018).

A Leishmaniose Visceral (LV) é a forma mais grave da infecção e acomete as vísceras, sobretudo fígado, baço, gânglios linfáticos e medula óssea, (FIOCRUZ, 2013), no entanto, poucos são os conhecimentos dos efeitos da infecção por *Leishmania* no trato gastrintestinal. Por isso, realizou-se técnicas histológicas para caracterizar as alterações provocadas pela leishmaniose visceral aguda e crônica no jejuno de camundongos BALB/c experimentalmente infectados com *Leishmania (L.) infantum chagasi*.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Este estudo está em conformidade com as exigências éticas do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) com parecer nº 506/18, seguindo os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998, e com normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), com a execução da resolução normativa nº 38, de 17 de abril de 2018, referente a restrição do uso de animais em ensino. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Histotécnica e Embriologia do Departamento de Morfologia (DMOR) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí– UFPI.

### **2.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

Foram utilizados trinta e seis (36) camundongos BALB/c, isogênicos, machos, com seis a oito semanas de idade, pesando entre 20 a 30 gramas (g), obtidos do Biotério Setorial da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram alimentados e hidratados a vontade e mantidos em gaiolas com cama maravalha.

#### **2.2.1 Vermifugação**

Todos os animais foram previamente vermifugados pela administração oral (método de gavagem) de Albendazol a 0,05mL/KL (Ricobendazole oral 1000mL - 6,0 g de sulfóxido de albendazole em 100mL de veículo q.s.p.), repetido 15 dias após para garantir que todo ciclo de verminoses fosse atingido. Uma semana após a última vermifugação, os animais foram liberados para o experimento. Na sequência, foi realizada a padronização experimental com a finalidade de treinamento para melhorar a prática do protocolo experimental.

### 2.2.2 Delineamento experimental

Foram utilizados trinta e seis (36) animais divididos aleatoriamente em três (3) grupos, denominados da seguinte forma: Grupo Controle (GC), Grupo Experimental I (GEI) e Grupo Experimental II (GEII), de acordo com a Tabela 1.

Os animais pertencentes ao GC não receberam o protozoário, apenas foi administrado 0,15 ml de solução fisiológica 0,9% (Adv, São Paulo, Brasil) e decorridos 7 dias e 50 dias a coleta do órgão de interesse foi realizada. Os camundongos pertencentes aos grupos experimentais I e II foram inoculados com  $5 \times 10^6$  promastigotas purificadas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, (MHOM/BR/ 72/ cepa 46), na fase estacionária, em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) (MENDES et al., 2016) suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) e passados 7 dias, tempo para apresentação da fase aguda da LV (GEI) e 50 dias, período para desenvolvimento da fase crônica da doença (GEII), o intestino delgado foi coletado para análise.

**Tabela 1-** Delineamento experimental dos grupos de animais

GRUPOS	ADMINISTRAÇÃO (por camundongo)	PERÍODO (pós inoculação)	SUBGRUPOS	Nº de Animais
GC-18 animais	Solução fisiológica	7 dias	GC/Fase Aguda	9
		50 dias	GC/Fase Crônica	9
GE - 18 animais	Promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>	7 dias	GEI/Fase Aguda	9
		50 dias	GEII/Fase Crônica	9
<b>Total</b>				<b>36</b>

Fonte: Elaborada pelo autor

### 2.2.3 DISSECAÇÃO DOS ÓRGÃOS, HISTOLOGIA E MICROSCOPIA

Após 7 e 50 dias da administração das soluções, os animais pertencentes aos GC, GEI e GEII foram anestesiados com Lidocaína (Cloridrato de Lidocaína® Cotia, São Paulo, Brasil) 10mg/kg (Fig. 1<sup>a</sup>) e colocados em um período de latência de 10 minutos (Fig. 1B). Em seguida, foram eutanasiados com injeção de Tiopental Sódico (Thiopentax®, Cristália, São Paulo, Brasil) 35 mg/kg por via intraperitoneal (Fig. 1C). Após a confirmação da ausência dos parâmetros vitais, iniciou-se a dissecação com uma incisão mediana-torácica-abdominal para remoção do intestino delgado (Fig. 1D). Estes, foram posicionados na forma de rocambole (Fig. 1E) e colocados em coletores individuais imersos em solução de formaldeído 10% tamponado para fixação, pH 7,6, em volume vinte vezes maior que o volume das amostras, por 48 horas, conforme figura 1F. Nesta etapa também foi realizada a obtenção da medula óssea através da aspiração femoral para ratificar a instalação da infecção. Logo após, realizou-se o emblocamento dos intestinos (1G), processamento histológico de rotina (JÚNIOR et al., 2016) e coloração com Hematoxilina e Eosina, finalizando com a produção das lâminas histológicas (1H). Na sequência, foi realizada a análise histológica das lâminas através do microscópio óptico comum (Leica DM 2000) e fotodocumentação com o auxílio da câmera digital de alta resolução (iPhone 10XS MAX acoplado por Smart Phone Adapter – PCK®).

### 2.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

A partir das imagens obtidas foram mensurados os seguintes parâmetros: altura ( $\mu\text{m}$ ) e área ( $\mu\text{m}^2$ ) das vilosidades e criptas jejunais, assim como a largura da parede submucosa ( $\mu\text{m}$ ). A histomorfometria do jejuno dos animais foi avaliada na objetiva de 20X, selecionando-se 09 campos randômicos, registrado-se 5 campos por lâmina/animal e feito as dimensões para análise morfométrica que foi realizada com a utilização do programa computadorizado de análise de imagens Leica DM4.

## 2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tabulados em Microsoft Excel e analisados pelo programa PROC GLM (General Linear Models) do Software SAS (Statistical Analysis System) for Windows versão 9.0. Foram obtidas as médias e desvio-padrão, e procedido a análise de variância dos parâmetros estudados nos diferentes períodos e grupos analisados. A análise quantitativa dos resultados obtidos, da análise histopatológica e da morfometria em relação ao acometimento dos tecidos pela *Leishmania (L.) infantum chagasi*, foi realizada pelo teste de Duncan para comparação das médias de acordo com o coeficiente de variação obtido, ao nível de 5% de significância ( $p > 0.05$ ).



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O intestino apresentava coloração, espessura e comprimento normais, textura firme ao manuseio e a punção da medula óssea realizada permitiu identificar amastigotas de *Leishmania* nos macrófagos ratificando a efetividade da infecção.

#### 3.2 MORFOMETRIA

Cada parâmetro histomorfométrico jejunal estudado: altura, área das vilosidades e criptas intestinais e largura da túnica submucosa foi analisado separadamente em relação as fases de infecção. De acordo com os dados obtidos, observa-se variações entre as médias dos grupos controle e experimentais com relação aos parâmetros estudados, Tabela 2.

**Tabela 2 - Parâmetros observados no jejuno de camundongos BALB / c infectados experimentalmente por *Leishmania (L.) infantum chagasi* e não infectados.**

PARÂMETRO	GRUPO			
	CG – 7 Dias	GEI	CG – 50 Dias	GEII
Altura da vilosidade ( $\mu\text{m}$ )	277,26 $\pm$ 79,21a	320,27 $\pm$ 122,8a	269,2 $\pm$ 122,9a	253,95 $\pm$ 73,38a
Altura da cripta ( $\mu\text{m}$ )	94,13 $\pm$ 35,31a	79,89 $\pm$ 31,7ab	80,93 $\pm$ 30,9ab	60,06 $\pm$ 26,02b
Área da vilosidade ( $\mu\text{m}^2$ )	181125 $\pm$ 16848b	40200 $\pm$ 13427a	29356 $\pm$ 8863ab	31154 $\pm$ 4768a
Área da cripta ( $\mu\text{m}^2$ )	4684 $\pm$ 3884,5a	5981 $\pm$ 863,60a	5569 $\pm$ 1314a	3925 $\pm$ 756,87a
Largura submucosa ( $\mu\text{m}$ )	392,54 $\pm$ 224,71a	286,3 $\pm$ 83,1a	444,4 $\pm$ 216,84a	290,3 $\pm$ 131,85a

Médias com a mesma letra, nas linhas, não diferem entre os testes de Duncan ao nível de 5% de significância ( $P > 0,05$ ). GC = grupo Controle; GEI = Grupo experimental I; GEII = Grupo experimental II.

No grupo controle (FIGURA 2A e B), observa-se criptas de Lieberkühn e vilosidades intestinais preservadas, com a relação núcleo/citoplasma mantida. Presença de órgão cavitário clássico com mucosa definida com tecido epitelial cilíndrico simples apresentando enterócitos e células caliciformes, tunicas submucosa e muscular revestidas por delgado epitélio de simples pavimentoso (mesotélio).

Nos grupos experimentais (GEI e GEII) observa-se desorganização nas bordas superiores das vilosidades com perda da sua arquitetura habitual, moderado aumento de espaço entre as mesmas, displasia e metaplasia dos enterócitos, assim como alteração na vascularização capilar e infiltrado inflamatório com predomínio de linfócitos e plasmócitos, contudo no GEI ou seja, na fase aguda da infecção, (FIGURA 3A, B e C), estas alterações ocorreram de forma mais expressivas do que na fase crônica (GEII), nesta, é possível verificar degeneração vacuolar tecidual, conforme figura 11D, contudo, observa-se melhor organização na região jejunal podendo estar associada ao fato de que na infecção aguda ocorreu a simbiose parasita-hospedeiro causando danos mais expressivos ao hospedeiro e na fase crônica já houve uma resposta imunológica satisfatória que manteve a homeostase intestinal (FIGURA 4 A, B e C). Estas alterações estão de acordo com a pesquisa de Santos et al., em 2018, que encontraram alterações na parede do íleo de camundongos após inoculação com *Leishmania*, com aumento do número de grânulos, muco e linfócitos e, aumento na espessura da camada submucosa pela proliferação e recrutamento de células imunes para o intestino, no entanto, neste experimento, apenas uma hipertrofia celular foi verificada, o que pode ser justificado pelo fato das regiões intestinais estudadas possuírem diferentes constituintes celulares, como as placas de Peyer que é uma característica específica do íleo, região não observada neste experimento. Também corrobora com o estudo de González et al., em 1986, que correlacionou a infecção por *Leishmania* com alterações intestinais realizados em hamsters e encontraram degeneração vacuolar das células epiteliais que revestem o lumen intestinal nos estágios finais da doença, igual resultado foi observado no presente trabalho que observou degeneração vacuolar no estágio crônico da doença (GEII), vistos histologicamente como pequenos vacúolos citoplasmáticos.

Nesta pesquisa, comparando os grupos experimentais compostos por animais com leishmaniose aguda e crônica, observa-se que na fase aguda (GEI) a desorganização nas

bordas superiores das vilosidades, displasia e metaplasia dos enterócitos, aumento na celularidade dentro da vilosidade e a presença de células inflamatórias foram mais expressivas do que na fase crônica (GEII), nesta, verifica-se uma melhor organização na região jejunal podendo-se associar ao fato de que na infecção aguda ocorreu a simbiose parasita-hospedeiro causando danos mais expressivos ao hospedeiro e na infecção crônica já houve uma resposta imunológica satisfatória que manteve a homeostase intestinal. Também, assim como os trabalhos de Santos et al., 2018 e Pereira et al., em 2009, o parasita não foi encontrado no tecido de interesse, no entanto, a inflamação desencadeada pela inoculação por *Leishmania* pode ser responsável pelas alterações observadas neste estudo. Diferente do estudo de Salgueiro et al., (2018), que observaram amastigotas dentro das células de Kupffer ao analisarem granulomas hepáticos de BALB/c infectados com *Leishmania* e Muigai et al., 1983 que detectaram a presença do parasita nas pontas das vilosidades da mucosa jejunal estudando pacientes humanos com a doença. Os diferentes períodos de tempo da infecção nos estudos citados, pode ter sido a causa dos resultados encontrados nos experimentos.

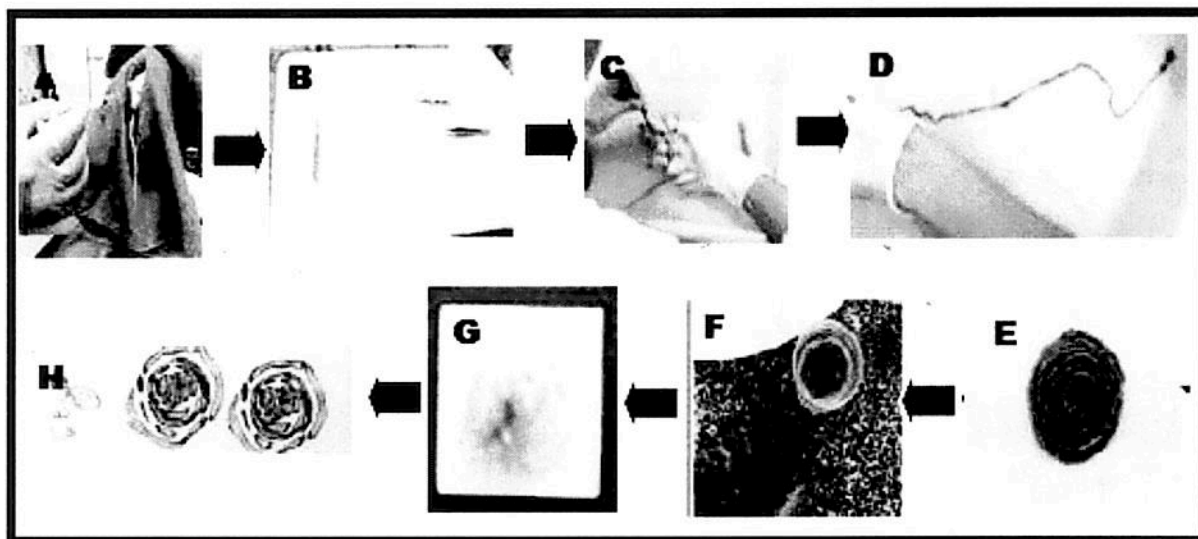
#### 4 CONCLUSÃO

Diante dos resultados encontrados, as alterações histopatológicas observadas no jejuno dos camundongos na fase aguda da Leishmaniose foram mais expressivas do que na fase crônica e podem estar relacionadas as manifestações sistêmicas da infecção. Estes achados contribuem fortemente para estudos relacionados a interação parasito-hospedeiro em órgãos cavitários como o intestino.

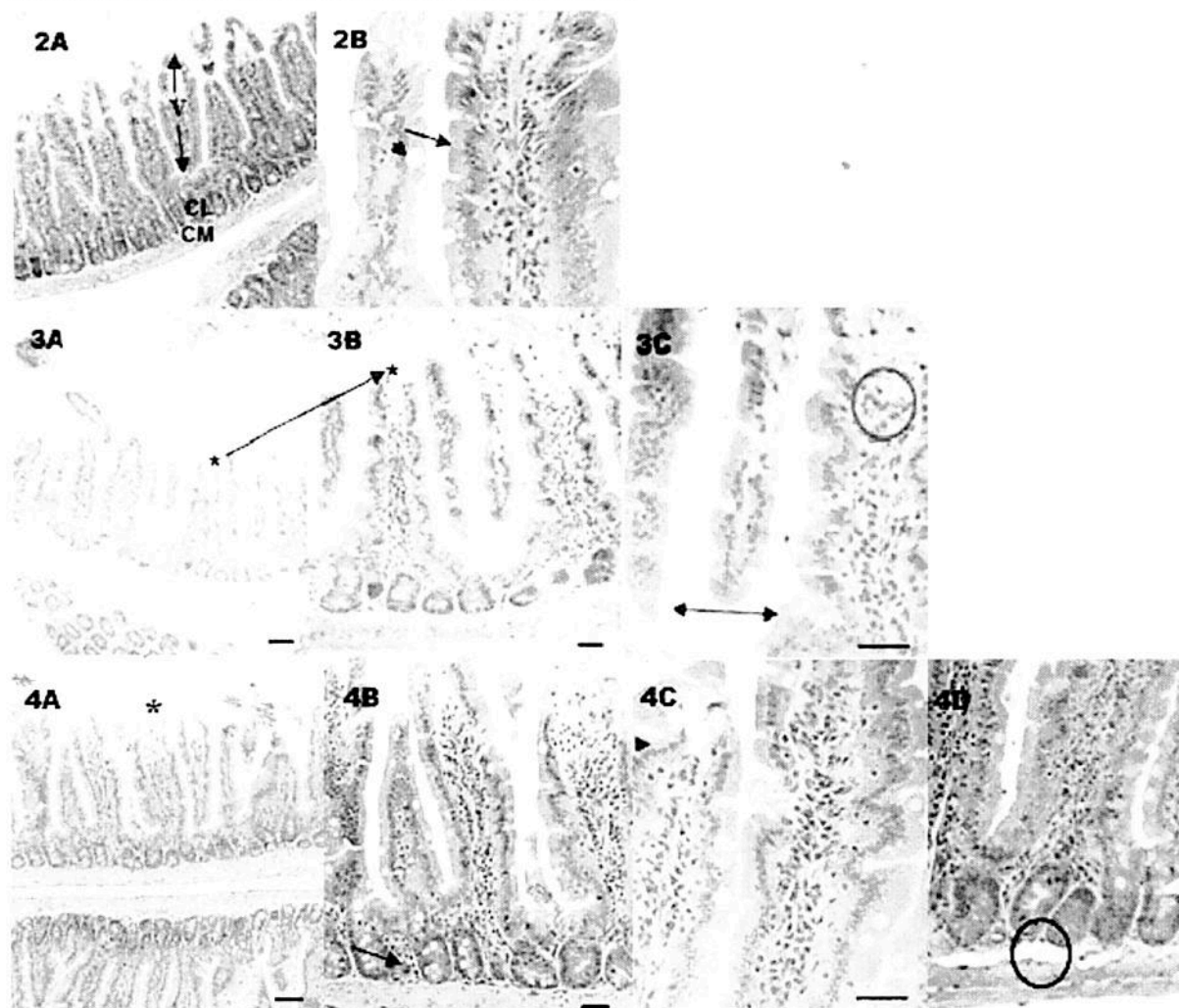
## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FIOCRUZ: **Leishmaniose**. 2013. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/leishmaniose>. Acesso em: 02 jul.2019.
2. GONZÁLEZ, J. L. et al. Intestinal amyloidosis in hamsters with visceral leishmaniasis. **Br. J. Exp. Path**, v. 67, n.1, p. 353-360. 1986.
3. MARCILI, A. et al. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in South America. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 25, p. 44-51, jul. 2014.
4. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Ministério da Saúde, n. d. Leishmaniose visceral, 2019**. [ www Document]. URL [http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose visceral](http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral), acessado em 8 jan. 2020.
5. MUIGAI, R. et al. Jejunal function and pathology in visceral leishmaniasis. **Lancet**, v.27, p.476-79, ago. 1983.
6. PEARSON, R. **Leishmaniose**. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Disponível em : [bvsms.saude.gov.br](https://bvsms.saude.gov.br). Acesso em:11 dez.2018.
7. PEREIRA, C.G. et al. Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. **Vet Parasitol**, v. 165, n. 3-4, p. 231-240. 2009.
8. ROSS, R. Note on the Bodies Recently Described by Leishman and Donovan. **Br Med J**, v.2, n.2237, p.1261-2. 1903.
9. SALGUERO, J. F. et al. Histopathological and immunohistochemical characterisation of hepatic granulomas in *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice: a time-course study. **Parasites & Vectors**, v. 11, n.73. 2018.
10. SANTOS et al. Alterations induced in the ileum of mice upon inoculation with different species of *Leishmania*: a preliminary study. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 51, n. 4, p. 537-541. 2018.
11. WHO. **Leishmaniasis**. 2018. Disponível em: [https://www.who.int/gho/neglected\\_diseases/Leishmaniasis/en/](https://www.who.int/gho/neglected_diseases/Leishmaniasis/en/). Acesso: 17 jul.2019.
12. WHO. **Leishmaniasis**. 2019 Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso: 18 jun.2019.

Figura 1: Obtenção de amostras biológicas de camundongos BALB / c, sequência dos passos realizados: da anestesia (A), resto do animal (B), acesso à cavidade abdominal (C), intestino delgado coletado (D), disposição do intestino delgado em rocambole (E), fixação de órgãos em formaldeído (F), bloqueio (G) e lâmina após coloração com Hematoxilina e Eosina (H)



Figuras 2, 3 e 4 - Fotomicrografia do jejuno de camundongos BALB / c corados com HE, o grupo controle (2A e B); GEI e GEII: 7 e 50 dias, respectivamente, após a infecção com promastigostas de *Lemmania (L.) infantum chagasi*

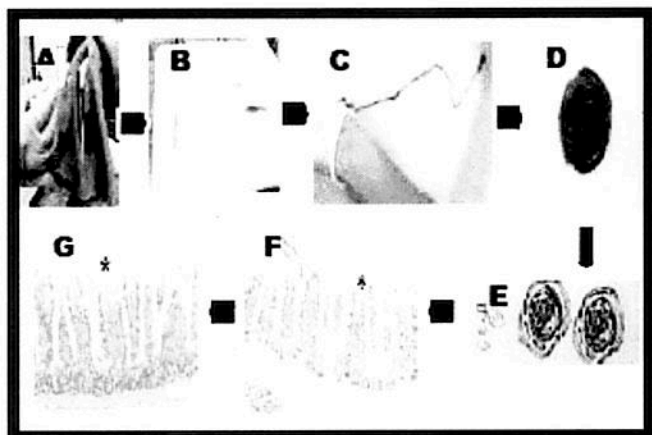


2A: aumento de 10x, barra de escala = 50  $\mu$ m; 2B: ampliação de 40x, barra de escala = 25  $\mu$ m. V = vilos; CL = cripta de Lieberkühn; CM = camada muscular; Enterócitos ( $\rightarrow$ ); Células caliciformes ( $\blacktriangleright$ ).  
 3A: aumento de 100x com barra de escala = 50  $\mu$ m; 3B: aumento de 200x, barra de escala = 25  $\mu$ m (10B) e 400x, barra de escala = 25  $\mu$ m (3C). Desorganização nas bordas superiores das vilosidades jejunais = \*; Espaço entre as vilosidades em jejum ( $\longleftrightarrow$ ); Vascularização celular (círculo).  
 4A: aumento de 100x, barra de escala = 50  $\mu$ m; 4B: aumento de 200x, barra de escala = 25  $\mu$ m e 400x (4C e 4 D), barra de escala = 25  $\mu$ m. Desorganização nas bordas superiores das vilosidades em jejum = \*; Células inflamatórias (seta); Metaplasia (ponta de seta); Degeneração vacuolar (círculo)



### Resumo gráfico

Intestino delgado de camundongo BALB/c (A, B e C) posicionado em rocambole (D). Lâmina histológica corada com HE (E). Fotomicrografias do jejuno, após infecção por *Leishmania(L.) infantum chagasi* após 7 (F) e 50 dias (G) da infecção.



#### **4. CAPÍTULO II**

EXPRESSÃO DE BETA-CATENINA E KI-67 NO JEJUNO DE CAMUNDONGOS BALB/c  
COM *Leishmania (L.) infantum chagasi*.

**Revista JVS – Journal of Veterinary Science**  
**INSS: 1229-845x (impresso) /1976-555x (on-line)**

## EXPRESSÃO DE BETA-CATENINA E KI-67 NO JEJUNO DE CAMUNDONGOS COM *LEISHMANIA (L.) INFANTUM CHAGASI*.

\*Selma Maria Santos Moura<sup>1</sup>, Airton Mendes Conde Júnior<sup>2</sup>.

1 - Departamento de Morfologia. Universidade Federal do Piauí. Teresina, Piauí, Brasil.

2 - Departamento de Morfologia. Universidade Federal do Piauí. Teresina, Piauí, Brasil.

\*Autor correspondente: Selmamoura@ufpi.edu.br. +55(86) 999454219.

Universidade Federal do Piauí - Teresina/PI

### RESUMO

A leishmaniose visceral ou calazar é uma doença causada por um protozoário do gênero *Leishmania*, transmitido ao homem através da picada de flebotômicos hematófagos. O espectro da enfermidade depende da espécie do parasita e da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro podendo evoluir para a leishmaniose tegumentar, leishmaniose mucosa e Leishmaniose Visceral, esta, representa a forma mais grave da doença com alta morbidade e mortalidade. Conhecimentos sobre os efeitos da leishmaniose no trato gastrointestinal são escassos, por isso, este estudo foi realizado para avaliar as consequências da *Leishmania (L) infantum chagasi* na proliferação e arquitetura celular no jejuno de camundongos BALB/c experimentalmente infectados. Para esta pesquisa, foram utilizados trinta e seis (36) animais divididos aleatoriamente em três (3) grupos, sendo um controle, sem a inoculação da *Leishmania* (GC) e dois Grupos Experimentais I e II (GEI/GEII): animais infectados por *Leishmania (L) infantum chagasi* e após 7 e 50 dias, respectivamente da inoculação, foram submetidos a protocolo anestésico e de eutanásia para coleta das amostras biológicas, as quais foram imersas em solução de formaldeído e realizada a imunohistoquímica para observar o perfil de proliferação e arquitetura celular do tecido a partir da utilização dos anticorpos primários anti-Ki-67 e anti- $\beta$ -catenina. De acordo com os dados encontrados observou-se que a Leishmaniose visceral altera a morfologia das criptas e vilosidades do jejuno com modificação dos locais predominantes para a proliferação celular e alterações na arquitetura tecidual, podendo contribuir para estudos relacionados a interação parasito-hospedeiro de órgãos cavitários como o intestino.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral, jejuno, Beta-catenina, Ki-67.

## ABSTRACT

Visceral leishmaniasis or kala azar is a disease caused by a protozoan of the genus *Leishmania*, transmitted to man through the bite of blood-sucking sandflies. The spectrum of the disease depends on the species of the parasite and the immune response developed by the host, which can progress to cutaneous leishmaniasis, mucosal leishmaniasis and visceral leishmaniasis, which represents the most serious form of the disease with high morbidity and mortality. Knowledge about the effects of leishmaniasis on the gastrointestinal tract is scarce, therefore, this study was carried out to evaluate the consequences of *Leishmania (L) infantum chagasi* on the proliferation and cellular architecture in the jejunum of experimentally infected BALB / c mice. For this research, thirty-six (36) animals were randomly divided into three (3) groups, one control, without inoculation of *Leishmania* (GC) and two Experimental Groups I and II (GEI / GEII): animals infected by *Leishmania (L) infantum chagasi* and after 7 and 50 days, respectively after inoculation, were submitted to anesthetic and euthanasia protocol to collect biological samples, which were immersed in formaldehyde solution and immunohistochemistry was performed to observe the proliferation profile and cellular tissue architecture using primary anti-Ki-67 and anti- $\beta$ -catenin antibodies. According to the data found, it was observed that visceral leishmaniasis alters the morphology of the crypts and villi of the jejunum with modification of the predominant sites for cell proliferation and changes in tissue architecture, which may contribute to studies related to the parasite-host interaction of cavitary organs like the intestine.

Keywords :Visceral Leishmaniasis, jejunum, Beta-catenin, Ki-67

## 1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma doença infecciosa parasitária zoonótica tropical negligenciada, atingindo principalmente países como África, Ásia e América Latina (ALVAR et al., 2012; DEBROY et al., 2017; OPAS/OMS, 2018). É uma doença grave por produzir formas clínicas severas que podem causar deformidades e incapacidades, sendo fatal em 90% dos casos não tratados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019; ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE – OPAS/OMS, 2018). É causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos ao homem através da picada de flebotomíneos hematófagos, fêmeas infectadas, sendo *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie responsável pela transmissão no Brasil (PEARSON, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; WHO, 2019).

Nas Américas, a espécie prevalente é a *Leishmania (L.) infantum chagasi* e a infecção acontece quando o flebótomo, durante o repasto, injeta saliva contaminada com formas promastigotas que invadem células do sistema fagocítico mononuclear de seres humanos, canídeos domésticos e silvestres, entre outros animais (WHO, 2019).

O espectro patológico depende da espécie do parasita infectante e da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro à infecção (FIOCRUZ, 2013), podendo evoluir para diferentes formas clínicas como a leishmaniose tegumentar (LT) caracterizada por lesões na pele, leishmaniose mucosa (LM) que afeta as mucosas do nariz e da boca e a Leishmaniose Visceral (LV) que é a forma mais grave da infecção e como o nome indica acomete as vísceras, sobretudo fígado, baço, gânglios linfáticos e medula óssea uma vez que *Leishmania (L.) infantum chagasi* possui tropismo pelas células do sistema mononuclear fagocítico, tendo como alvo principal os macrófagos (MORAES; CORREIA FILHO; SANTOS, 1993; MOREIRA, 2013; FIOCRUZ, 2013). Clinicamente se caracteriza por se apresentar como uma enfermidade generalizada crônica, com febre irregular e de longa duração, emagrecimento, anemia, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia, hipoalbuminemia, hemorragias,

imunodeficiência, estado de debilidade progressivo levando a caquexia e ao óbito nos casos sem tratamento adequado e em tempo hábil, possuindo uma estimativa de 50.000 a 90.000 mil novos casos de LV em todo o mundo a cada ano (BARRETT; CROFT, 2012; FIOCRUZ, 2013; MENDONÇA et. al., 2017; WHO, 2019).

Conhecimentos sobre os efeitos da leishmaniose no trato gastrointestinal são escassos, por isso, técnicas imunohistoquímicas foram realizadas para identificar as variações do perfil de proliferação e arquitetura celular frente a infecção pelo parasita por meio dos marcadores Ki-67 e Beta-catenina, além de verificar alterações histológicas no jejuno de camundongos BALB/c experimentalmente infectados com *Leishmania (L.) infantum chagasi*.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Este estudo está em conformidade com as exigências éticas do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) com parecer nº 506/18, seguindo os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998, e com normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), com a execução da resolução normativa nº 38, de 17 de abril de 2018, referente a restrição do uso de animais em ensino. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Histotécnica e Embriologia do Departamento de Morfologia (DMOR) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí – UFPI.

### **2.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

O animal escolhido para o desenvolvimento da doença de forma experimental foi o camundongo BALB/c porque estes animais desenvolvem o curso natural da infecção por *Leishmania*, apresentando sinais clínicos compatíveis com aspectos descritos em pacientes humanos infectados e como possuem uniformidade genética é considerado um bom modelo para o desenvolvimento da doença de forma experimental, permitindo a utilização de menos espécimes e a obtenção de resultados mais precisos (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014; JERONIMO; DE QUEIROZ; PEARSON, 2006). Nesta pesquisa foram utilizados trinta e seis (36) camundongos isogênicos, machos, com seis a oito semanas de idade, pesando entre 20 a 30 gramas (g), obtidos do Biotério Setorial da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram alimentados e hidratados a vontade e mantidos em gaiolas do tipo maravalha cobertas com filó para evitar infecção cruzada por moscas ou outros insetos e proporcionar conforto aos animais.



## 2.3 ETAPAS DE PREPARAÇÃO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS

### 2.3.1 Vermifugação e Delineamento experimental

Todos os animais foram previamente vermifugados pela administração oral (método de gavagem) de Albendazol a 0,05mL/KL (Ricobendazole oral 1000mL - 6,0 g de sufóxido de albendazole em 100mL de veículo q.s.p.). Após 15 dias, o processo foi repetido para garantir que todo ciclo de verminoses fosse atingido. Uma semana após a última vermifugação, os animais foram liberados para o experimento.

Os trinta e seis (36) animais foram divididos aleatoriamente em três (3) grupos, denominados da seguinte forma: Grupo Controle, no qual os animais não receberam inoculação com *Leishmania*, apenas administrado 0,15 ml de solução fisiológica 0,9% (Adv. São Paulo, Brasil) e decorridos 7 dias e 50 dias a eutanásia foi realizada para observação do intestino delgado; Grupo experimental (subdividido em dois grupos: GEI e GEII, cada animal foi inoculado com  $5 \times 10^6$  promastigotas purificadas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, (MHOM/BR/ 72/ cepa 46), na fase estacionária, em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) (MENDES et al., 2016) suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) para cada fase da doença. Os animais grupo Grupo Experimental I (GEI) após 7 dias da inoculação com o protozoário (Leishmaniose visceral aguda) procedeu-se as etapas para coleta das amostras biológicas e, Grupo Experimental II (GEII) permaneceram 50 dias infectados (Leishmaniose visceral crônica) e o intestino delgado foi coletado para análises, de acordo com a Tabela 1. Os animais foram pesados antes da eutanásia e como houve baixa variabilidade dos dados, o coeficiente de variação calculado foi menor que 10% (Coeff Var = 7,253504), o teste de Tukey ao nível de 55 de significância ( $p > 0.05$ ) foi utilizado para comparação dos dados, conforme tabela 2.

### 2.3.2 Dissecção dos órgãos

Decorridos os períodos de tempo de cada grupo, os animais após anestesia e eutanásia, a cavidade abdominal foi acessada pela linha alba e procedeu-se a remoção dos intestinos delgados. Estes, foram posicionados na forma de rocambole e colocados em coletores individuais imersos em solução de formaldeído 10% tamponado para fixação, pH 7,6, em volume vinte vezes maior que o volume das amostras, por 48 horas, conforme figura 1. Nesta etapa também foi realizada a obtenção da medula óssea através da aspiração femoral, esfregaço e coloração com panótico rápido para confirmar a instalação da infecção, segundo Figura 2.

### 2.4 Imunohistoquímica

Com o intuito de determinar a expressão proteica dos antígenos Ki-67 e Beta catenina realizou-se a reação de imunohistoquímica (IHQ) das lâminas contendo o tecido parafinado obtidas a partir dos blocos do intestino delgado coletado (FIGURA 2G). Para tal, as secções foram desparafinadas e reidratadas em banhos de xilol e etanol, de acordo com técnicas clássicas. Posteriormente, foi realizada a recuperação antigênica das amostras em solução tamponada a 90°C por 60 min, e realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 10 volumes e metanol, em quatro banhos de 5 minutos cada. O bloqueio de reações inespecíficas foi realizado com a solução de bloqueio fornecida pelo fabricante do kit Envision Flex da Dako, durante 30 minutos a temperatura ambiente, e posteriormente foram adicionados os anticorpos primários de interesse Ki-67 (Clone MIB-1; Ready-to-Use; Dako; Referência IR626) e beta-catenina (Clone  $\beta$ -Catenin-1; Ready-to-Use; Dako; Referência IR702) no tecido intestinal, durante 60 minutos a 4°C. Após esse período, adicionou-se a solução de polímero, também fornecida pelo fabricante, durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A revelação da imunomarcação foi realizada com Diaminobenzidina (DAB) fornecida pelo fabricante do kit, e a contracoloração realizada com hematoxilina de Harris. Na sequência, as lâminas foram desidratadas e diafanizadas conforme técnica clássica e montadas em lâmina-lamínula utilizando enterllan, conforme a figura 2H, e na sequência foi realizada a análise em Microscópio Óptico no aumento de 10x, 20x e 40x, para avaliar a imunomarcação e a integridade do tecido.

Para validação dos dois anticorpos foram utilizados cortes histológicos de amígdala e cólon para Ki-67 e do beta-catenina, respectivamente. Para controle do anticorpo secundário também foram utilizados cortes histológicos de amígdala e cólon no qual o anticorpo primário, anti-ki-67 e anti-beta catenina foram substituídos por PBS. Como os marcadores de interesse são expressos constitutivamente no modelo murino estudado, foram utilizadas biópsias de intestino delgado (GC) para avaliação das características de expressão das moléculas nos tecidos de interesse.

A interpretação da expressão de Ki-67 e Beta-catenina foram avaliadas de acordo com a intensidade da expressão nas diferentes regiões do tecido.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A via de acesso a cavidade abdominal utilizada neste experimento se mostrou efetiva, sendo viável para coleta do órgão desejado. A disposição em rocambole do intestino delgado, foi eficiente para leitura e processamento do material coletado, possibilitando a adequada visualização de todas as camadas e/ou estruturas do jejuno. Também, o modelo experimental de infecção por leishmaniose é viável, pois, apesar de clinicamente o animal apresentar características condizentes com a normalidade, inclusive com relação ao peso que não foi observado diferença estatisticamente significativa entre a média de pesos em animais da mesma idade, GC (7dias) = GEI (7 dias) e GC (50 dias) não diferiu de GEII (50 dias de infecção), segundo tabela 2. A remoção do intestino delgado foi realizada de forma satisfatória para os grupos controle e experimentais nos diferentes tempos estudados, o órgão apresentava coloração, espessura e comprimento normais, além de textura firme ao manuseio. Contudo, a punção da medula óssea realizada permitiu identificar amastigotas de *Leishmania* nos macrófagos conforme figura 2.

#### 3.2 PERFIL IMUNOHISTOQUÍMICO DAS PROTEÍNAS BETA-CATENINA E KI-67

Para verificar as alterações na arquitetura e proliferação celular do jejuno dos camundongos BALB/c infectados experimentalmente com *Leishmania (L.) infantum chagasi* nos dois períodos de tempo (GEI e GEII) e do grupo controle (GC) foi realizada a imunomarcagem com as proteínas celulares  $\beta$ -catenina e Ki-67, respectivamente.

##### 3.2.1 $\beta$ -catenina

No grupo controle, cujos animais não foram infectados com o parasita, observou-se criptas de Lieberkühn (CL) e vilosidades intestinais preservadas, com a relação

núcleo/citoplasma mantida. Presença de órgão cavitário clássico com mucosa definida com tecido epitelial cilíndrico simples apresentando enterócitos, túnicas submucosa e muscular revestidas por delgado epitélio de simples pavimentoso (mesotélio) e marcação pontual pela proteína com predominância na borda superior da vilosidade, conforme figura 3 A, B, C (7 dias) e 3 G, H, I (50 dias).

Nos animais do GEI, os quais foram infectados com *Leishmania (L.) infantum chagasi* (7 dias), observa-se marcação pela  $\beta$ -catetina de forma pontual com predominância na borda superior em relação a base das vilosidades, porém, diferente do encontrado no GC, verifica-se também a destruição dessas bordas superiores das vilosidades intestinais, conforme figura 3D, E e F.

Já nos animais que desenvolveram a leishmaniose visceral crônica, com 50 dias de infecção (GEII), a marcação pela  $\beta$ -catetina foi completa, contínua, presente tanto nas bordas superiores quanto na base das vilosidades de acordo com a figura 3 J, K e L, observou-se também melhor organização dessas bordas superiores das vilosidades ao se comparar com o encontrado no GEI.

### 3.2.2 Ki-67

Neste estudo, os animais pertencentes ao grupo controle, que não foram infectados com *Leishmania*, mostraram maior parte da marcação pelo Ki-67 na base das vilosidades intestinais (FIGURA 4A seta). A proliferação celular ocorre no sentido do interior das vilosidades para a periferia e a concentração de células em divisão ocorre no meio das vilosidades, um comportamento que se repete em toda a lâmina, conforme figura 4 B e C.

Já nos animais que foram infectados por *Leishmania (L.) infantum chagasi*, tanto Leishmaniose aguda (7 dias de infecção) quanto Leishmaniose crônica (50 dias), GEI e GEII respectivamente, observou-se comportamento igual com relação a marcação pela proteína

estudada, sendo encontrada maior parte da marcação na borda superior das vilosidades, conforme figura 5A, B (GEI) e figura 5 C, D (GEII).

## 4 DISCUSSÃO

Nesta pesquisa, apesar de não ser verificado alteração dos pesos dos animais com relação a presença de leishmaniose aguda ou crônica quando comparado aos respectivos controles, observou-se a desregulação tecidual nos sítios intestinais dos animais inoculados por *Leishmania*, com perda da arquitetura habitual, metaplasia dos enterócitos, mudança na vascularização capilar e presença de infiltrado inflamatório com predomínio de linfócitos e plasmócitos, além de macrófagos, granulócitos e células em mitose, achados que estão de acordo com a pesquisa de Santos et al., em 2018, que encontraram alterações na parede do íleo de camundongos após inoculação com *Leishmania*, com aumento do número de grânulos, muco e linfócitos.

A análise IHQ pela proteína citoplasmática  $\beta$ -catenina neste experimento, mostrou marcação pontual nos animais pertencentes aos grupos controle e experimental I (leishmaniose visceral aguda), mais acentuada na borda superior das vilosidades do que na base, porém, os animais infectados (GEI) apresentaram também a desorganização das bordas superiores das vilosidades do jejuno, sugerindo que a atuação do parasita por 7 dias acarretou uma maior desorganização da arquitetura tecidual marcada pela proteína celular, uma vez que a  $\beta$ -catenina é uma molécula multifuncional com funções de sinalização (via WnT canônica) e estrutural como componente das junções aderentes em epitélios simples sendo elemento essencial para a conexão de várias caderinas ao citoplasma, desempenhando um papel importante na organização do citoesqueleto e na homeostase tecidual, assim como na renovação e regeneração celular (BRACKE; VAN ROY; MAREEL, 1996; LYASHENKO et al., 2011; VALENTA; HAUSMANN; BASLER, 2012). Já no GEII (Leishmaniose visceral crônica) que os animais apresentavam maior tempo de infecção (50 dias) observou-se uma marcação pela  $\beta$ -catenina de forma completa, contínua, observada tanto na borda superior quanto na base da vilosidade intestinal, acredita-se ter sido uma reação do organismo em



manter a estrutura organizada com o maior tempo de presença da *Leishmania*, comportamento não observado no GEI. Este aumento gradual da marcação da proteína com a progressão do tempo de instalação da doença corrobora com os resultados do experimento realizado por Bhattacharya et al. em 2019 que ao investigarem a expressão da  $\beta$ -catenina em neoplasias colorretais observaram um aumento gradual na sequência das várias etapas da tumorigênese colorretal, com menor escore da expressão nas hiperplasias benignas (pólipo), intermediário nas neoplasias pré-malignas (adenoma) e maior expressão de  $\beta$ -catenina nas condições malignas (carcinoma).

A proliferação celular foi observada utilizando-se o antígeno Ki-67, proteína nuclear definida pela sua reatividade com o anticorpo monoclonal do clone Ki-67 que se manifesta durante todas as fases do ciclo celular em atividade (G1, S, G2 e M) e está ausente na fase sem divisão celular, ou seja, quando a célula está em repouso (G0). A expressão antigênica é negativa nas fases G0 e G1 precoce do ciclo celular e positiva durante todo o restante do ciclo, atingindo níveis máximos nas fases G2 e M (GERDES et al., 1984; AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004).

No grupo controle (GC), onde os animais não receberam o parasita, a maior parte da marcação pela proteína foi observada na base das vilosidades intestinais, por isso, acredita-se que no animal sem *Leishmania* a renovação celular ocorra por esta região.

Já nos animais infectados com *Leishmania (L.) infantum chagasi*, nos dois tempos experimentais (GEI/GEII) observou-se que a maior parte da marcação com Ki-67 ocorreu na borda superior das vilosidades intestinais sugerindo assim que o reparo das alterações histopatológicas do tecido inicie por esta parte da estrutura. Acredita-se que a inflamação desencadeada pela inoculação por *Leishmania* pode ser responsável pelas alterações observadas já que o parasita não foi encontrado na região, corroborando com os trabalhos de Santos et al., 2018 e Pereira et al., em 2009 que observaram alterações nos tecidos de

interesse mas não detectaram a *Leishmania* do tecido estudado, diferente da pesquisa Muigai et al., 1983, que ao analisar pacientes humanos com a doença, observaram a presença do parasita causador da LV nos ápices das vilosidades da mucosa jejunal com infiltrado moderado de células inflamatórias e atrofia parcial das vilosidades acarretando prejuízos funcionais pela redução na absorção de substâncias como vitamina A e açúcar d-xilose. Também Silva et al. em 2016, observaram grande quantidade de parasita e infiltrado inflamatório nos ápices das vilosidades do intestino delgado de cães infectados com *Leishmania infantum*.

Comparando-se os grupos experimentais I e II (leishmaniose visceral aguda e crônica), foi observado que as alterações encontradas, como desorganização nas bordas superiores das vilosidades, displasia dos enterócitos, aumento na celularidade dentro da vilosidade e presença de células inflamatórias foram mais expressivas na fase aguda da doença (GEI) que na crônica (GEII), nesta última, verificou-se uma melhor organização do tecido estudado, o que pode estar associado ao fato de que na infecção aguda ocorreu a simbiose do parasita com o hospedeiro com maiores prejuízos para este último e na infecção crônica já houve uma resposta imunológica satisfatória para manter a homeostase intestinal.

## 5 CONCLUSÕES

O presente estudo verificou uma modificação do sítio de expressão das proteínas nas criptas e vilosidades intestinais do jejuno dos camundongos BALB/c infectados por *Leishmania (L.) infantum chagasi*;

As alterações imunohistoquímicas encontradas foram mais expressivas na fase aguda do que na fase crônica da doença e podem estar relacionadas as manifestações sistêmicas da infecção causada pelo parasita;

Os achados deste experimento podem contribuir para estudos relacionados a interação parasito-hospedeiro de órgãos cavitários como o intestino;

Estudos complementares das demais regiões do intestino delgado infectado por *Leishmania (L.) infantum chagasi* são necessários para entender melhor o papel da infecção neste sítio, assim como se comporta a resposta imune do órgão como um todo.

Tabela 1- Delineamento experimental dos grupos de animais

GRUPOS	ADMINISTRAÇÃO (por camundongo)	PERÍODO (dias)	SUBGRUPOS	Nº de Animais
Grupo Controle (GC) - 18 animais	0,15 ml de NaCl 0,9%	7	Controle /Fase Aguda	9
		50	Controle /Fase Crônica	9
Grupo Experimental (GE) - 18 animais	5x10 <sup>6</sup> promastigotas purificadas de <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>	7	Experimental /Fase Aguda (GEI)	9
		50	Experimental / Fase Crônica (GEII)	9
<b>Total</b>				<b>36</b>

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 2: Peso e desvio-padrão dos camundongos Balb/C segundo o tratamento aplicado.

Tratamento (Grupo)	Peso
<b>GC – 7 dias</b>	24,77±0,97 <sup>a</sup>
<b>GEI</b>	26,77±2,11 <sup>a</sup>
<b>GC – 50 dias</b>	35,11±3,25 <sup>b</sup>
<b>GEII</b>	36,00±1,80 <sup>b</sup>

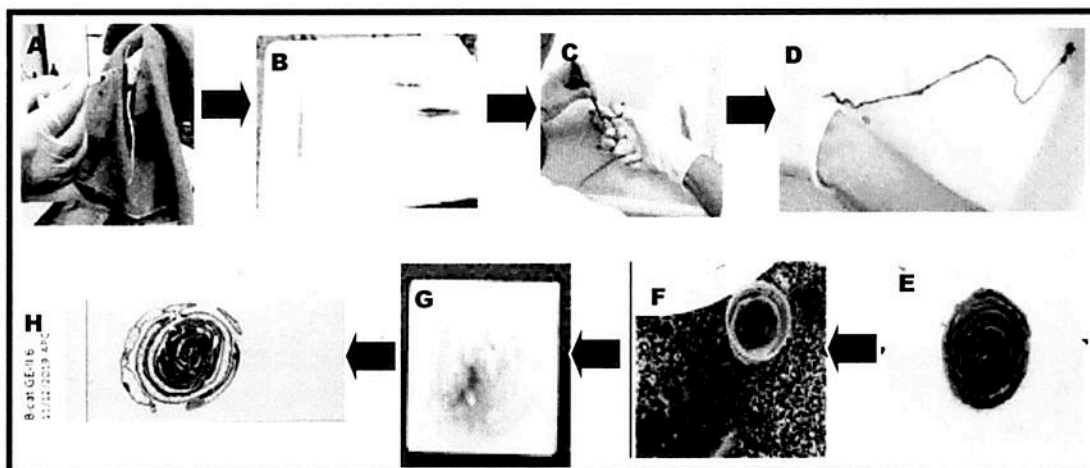
Médias com mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância (P>0,05)

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. Alvar J. et. al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *Journal pone*. 2012;7 (5): 35671.
2. Debroy S. et al. Challenges in modeling complexity of neglected tropical diseases: a review of dynamics of visceral leishmaniasis in resource limited settings. *Emerging Themes in Epidemiology*. 2017; 14 (1): 1-14.
3. Organização Panamericana da Saúde (OPAS/OMS). Leishmanioses, Informe de Leishmanioses Nº 6 [internet]; [www.paho.org/leishmaniasis](http://www.paho.org/leishmaniasis). Atualizado em 2018. Acessado em 2019 06 de julho.
4. Pearson R. Leishmaniose. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [internet]; [www.bvsms.saude.gov.br](http://www.bvsms.saude.gov.br). Atualizado em 2018. Acessado em 2018 10 de dezembro.
5. Brasil. Ministério da Saúde (MS). Leishmaniose Visceral: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção [internet]. Brasília: Brasil; <http://www.saude.gov.br>. Atualizado em 2010. Acessado em 2019 02 de julho.
6. World Health Organization (WHO). Leishmaniasis [internet]; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Atualizado em 2019. Acessado em 2019 18 junho.
7. Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ): Leishmaniose (internet). Rio de Janeiro: Brasil; <https://agencia.fiocruz.br/leishmaniose>. Atualizado em 2013. Acessado em 2019 2 de julho.
8. Moraes MAP, Correia Filho D, Santos JB. Linfadenopatias na leishmaniose tegumentar americana: considerações sobre dois casos. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1993; 26 (3):181-5.
9. Moreira PR. Resposta imune diferenciada no fígado e no baço de cães com leishmaniose visceral. 2013. 77f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, 2013.
10. Barrett MP, Croft SL. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. *British Medical Bulletin*. 2012; 104(1):175–96.
11. Mendonça C. et al. Description of Visceral, Lymphatic and Central Nervous System Lesions in Dogs Infected with *Leishmania* spp. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 2017; 6(3):89-94.
12. Loria-Cervera, Andrade-Narváez FJ. Modelos animais para o estudo da imunologia da leishmaniose. *Rev Inst Med Trop*. 2014; 56(1):1-11.
13. Jeronimo SMB, De Queiroz AS, Pearson RD. Leishmaniose. In: Doenças infecciosas tropicais: princípios, patógenos e prática. Elsevier: Edimburgo; 2006.
14. Brache ME, Van Roy FM, Mareel MM. The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. *Cur Top Microbiolol Immunol*. 1996; 213 (1): 123-61.
15. Mendes CS. et al. Impacto das mudanças climáticas sobre a leishmaniose no Brasil. *Ciênc. saúde colet*. 2016; 21 (1): 1-8.

16. Lyashenko N. et al. Differential requirement for the dual functions of b-catenin in embryonic stem cell self-renewal and germ layer formation. *Nat Cell Biol.* 2011; 13(4): 753–761.
17. Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of b-catenin. *The Emb Journal.* 2012; 31(12): 2714–2736.
18. Bhattacharya I. et al. Avaliação da expressão da beta-catenina por imuno-histoquímica em neoplasias colorretais e seu papel como marcador prognóstico adicional do adenocarcinoma colorretal. *Med Pharm Rep.* 2019; 92(3): 246-252.
19. Gerdes J. et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.* 1984; 133 (2):1710-5.
20. Awasthi, A, Mathur, RK, Saha B. Resposta imune a infecção por *Leishmania*. *Indian J Med Res.* 2004; 119(1): 238-58.
21. Santos AGV. et al. Alterações induzidas no íleo de camundongos após inoculação com diferentes espécies de *Leishmania*: um estudo preliminar. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2018; 51(4): 537-541.
22. Pereira CG. et al. Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. *Vet Parasitol.* 2009; 165(3-4): 231-240.
23. Silva DT. et al. Comparative evaluation of several methods for canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2016; 23(2):179-186.
24. Muigai R. et al. Jejunal function and pathology in visceral leishmaniasis. *Lancet.* 1983; 27(1): 476-79.

**Figura 1** - Obtenção das amostras biológicas de Camundongos BALB/c, sequência das etapas realizadas: da anestesia (A), repouso do animal (B), acesso a cavidade abdominal (C), intestino delgado coletado (D), disposição do intestino delgado em rocambole (E), fixação do órgão em formaldeído (F), emblocamento (G) e lâmina após imunomarcção (H).

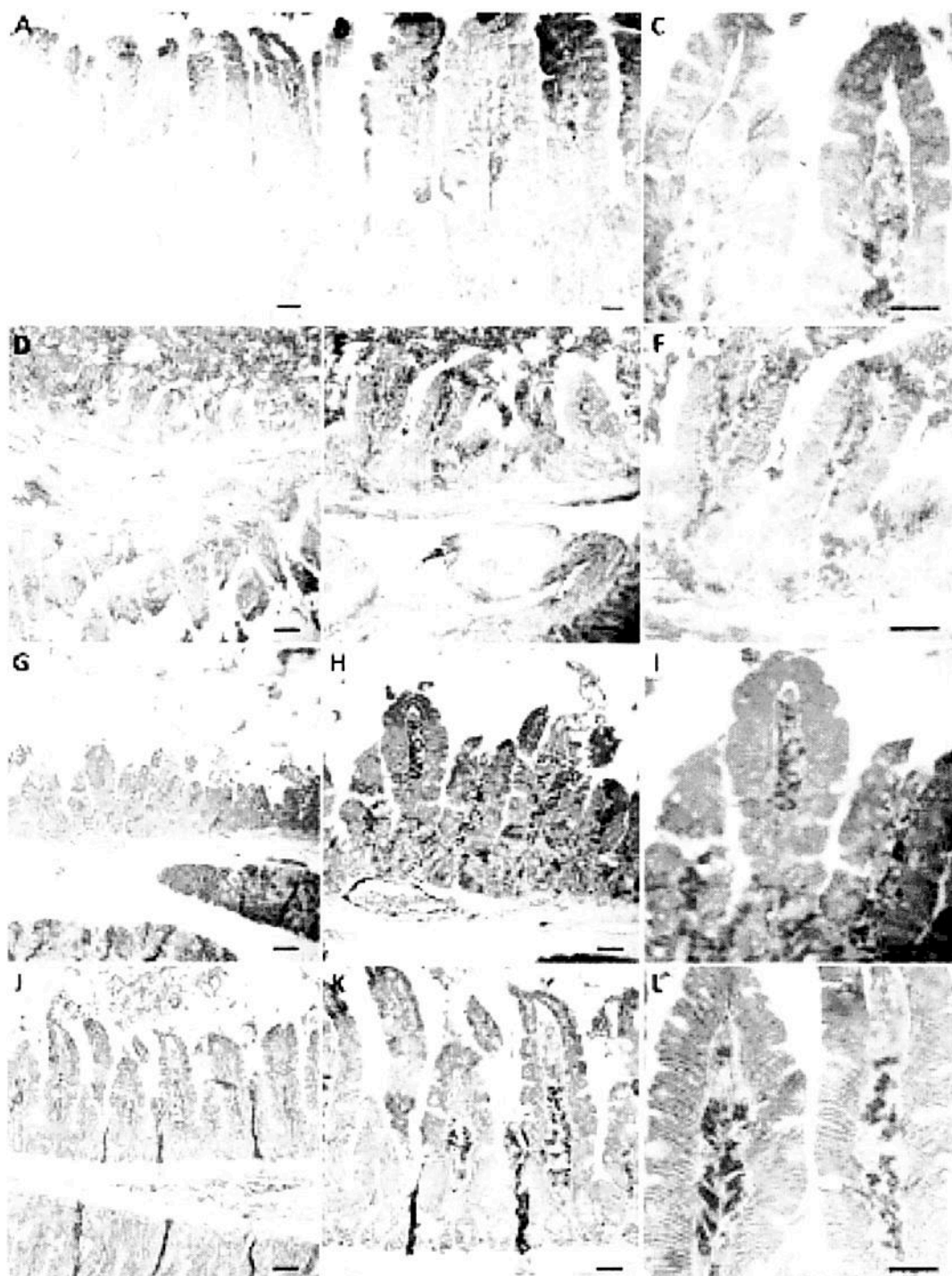


**Figura 2** - Amastigotas presentes em medula óssea de camundongos BALB/c após infecção com *Leishmania (L.) infantum chagasi*, corado com panótico rápido.



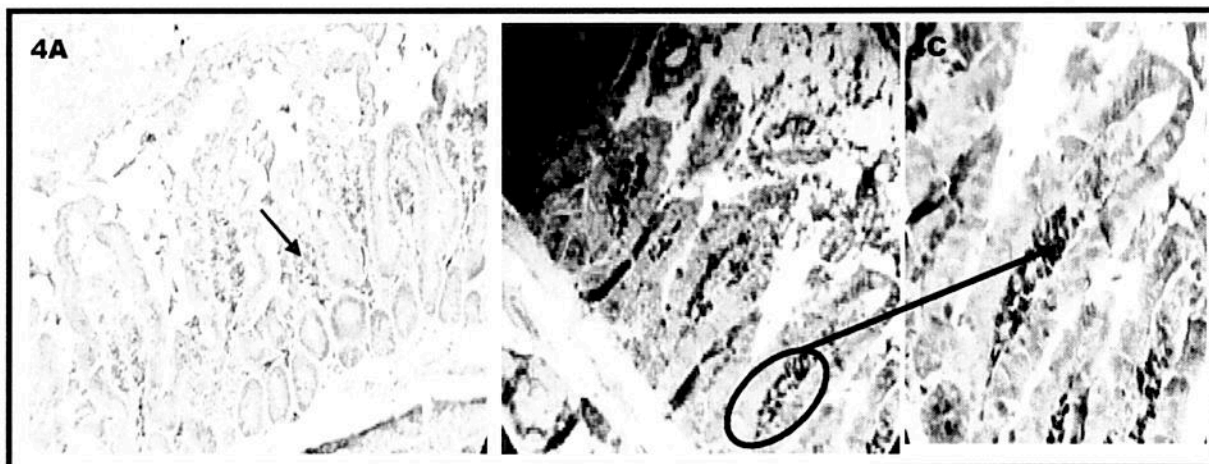
Medula óssea: Macrófago (seta) e amastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*. (ponta de seta).

**Figura 3** - Fotomicrografias das secções longitudinais da parede do jejuno de camundongos BALB/c do Grupo Controle 7 dias (primeira linha - A , B, C); Grupo Experimental I, após 7 dias da infecção com promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* (segunda linha – D, E, F); Grupo Controle 50 dias (terceira linha – G,H,I) e Grupo Experimental II, após 50 dias da infecção com *Leishmania (L.) infantum chagasi* (quarta linha – J, K, L) , corados com  $\beta$ -catetina. Aumento de 100X, barra de escala = 50  $\mu$ m (primeira coluna); Aumento de 200X, barra de escala = 25  $\mu$ m (segunda coluna) e de 400X (C), barra de escala 25  $\mu$ m (terceira coluna).

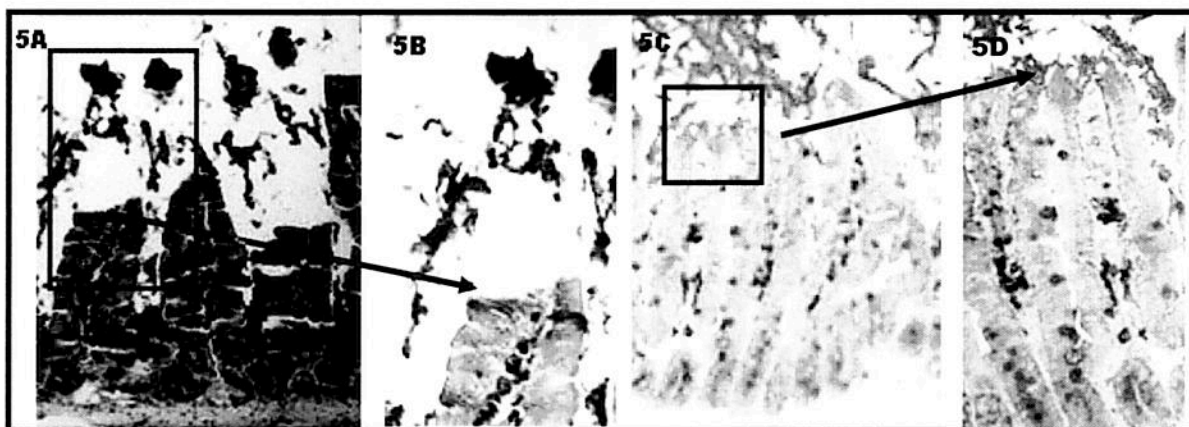




**Figura 4** – Fotomicrografias das secções longitudinais da parede do jejuno de camundongos BALB/c do Grupo Controle corados com Ki-67. Base da vilosidade ( —>), do aumento de 200X em 4A. Proliferação celular no interior da vilosidade intestinal marcada com um círculo no aumento de 200X em 4B e ampliação de e 400X em 4C.



**Figura 5** - Fotomicrografias das secções longitudinais da parede do jejuno de camundongos BALB/c infectados com promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, 7 e 50 dias, (GEI e GEII), respectivamente, corados com Ki-67, mostrando a desorganização da borda superior da vilosidade intestinal (marcado com quadrados e setas) do GEI, aumento de 200X em 5A com ampliação de 400X em 5B e do GEII, aumento de 200X em 5C e ampliação de 400X em 5D. As setas indicam as bordas superiores das vilosidades intestinais.



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas histológica e IHQ realizadas neste experimento evidenciaram alterações importantes no jejuno de camundongos BALB/c infectados por *Leishmania (L.) infantum chagasi*, como a desorganização da arquitetura tecidual, displasia e metaplasia dos enterócitos, modificação do padrão de proliferação celular, aumento da celularidade local e a presença de células inflamatórias. Tal desregulação tecidual foi mais expressiva na fase aguda de doença do que na fase crônica o que pode está associado ao fato de que no início da infecção houve a interação parasito-hospedeiro de forma deletéria ao sítio intestinal, contudo, pela presença de células de defesa existentes no local, a resposta imunológica se deu de forma satisfatória e foi possível observar a reorganização do tecido na fase crônica da doença.

Os achados desta pesquisa podem contribuir sobremaneira para estudos futuros que envolvam manifestações sistêmicas da leishmaniose em órgãos viscerais como o intestino delgado. Assim como podem contribuir para elucidar aspectos fisiopatológicos e do desenvolvimento da doença no organismo humano e dessa forma favorecer a realização de pesquisas complementares que propiciem melhorar a eficiência das políticas públicas relacionadas ao enfrentamento desta Doença Tropical Negligenciada.