Alterações na população de neurônios nitrérgicos do intestino delgado de hamsters infectados experimentalmente com *Leishmania (L.) chagasi*

Karine Soares de Olivera[1], Sarah Kymberly Santos de Lima[1], Luiz Felipe Domingues Passero[1], Márcia Dalastra Laurenti[2], Jéssica Adriana de Jesus[2], Renata de Britto Mari[1]

[1] Universidade Estadual Paulista, Campus do Litoral Paulista (UNESP/CLP).
[2] Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).
Email: kakabioroots@gmail.com

Resumo: A leishmaniose visceral é uma zoonose de importância para a saúde pública, que atinge diversos órgãos, incluindo o trato gastrointestinal. Este é controlado pelo sistema nervoso entérico que é composto por neurônios e células da glia. Dentre os neurônios existentes, a subpopulação nitrérgica produz o óxido nítrico, responsável pela inibição da musculatura lisa local, além de ter caráter neuroprotetor. O objetivo desse trabalho é analisar a quantificação dos neurônios nitrérgicos de hamsters infectados experimentalmente com *Leishmania chagasi* em diferentes períodos. Para este estudo foram utilizados hamsters dourados onde o grupo experimental recebeu por via intraperitoneal promastigotas de *L. chagasi*, e o grupo controle recebeu pela mesma via solução fisiológica. Após os períodos de infecção de 30, 60 e 90 dias os animais foram eutanasiados e as porções do jejuno e íleo que foram coletadas e submetidas a histoquímica de NAPH-dp para a evidenciação dos neurônios nitrérgicos. Foi observado um aumento significativo ($p<0,05$) de 196% e 160% respectivamente, no período de 30 dias, já nos períodos de 60 e 90 dias o aumento foi observado, porém não significativamente. Contudo o estudo apresenta um aumento significativo apenas nos primeiros 30 dias, apresentando também um aumento nos demais períodos (60 e 90), porém esses não são significativos.

Palavras-chaves: Leishmaniose visceral - Sistema Nervoso Entérico - Neurônios Nitrérgicos

Changes in the populations neurons nitrergic of the small intestine of hamsters experimentally infected with *Leishmania (L.) chagasi*

Abstract: Visceral leishmaniasis is a zoonosis of public health importance, affecting several organs, including the gastrointestinal tract. This is controlled by the enteric nervous system which is composed of neurons and glial cells. Among the existing neurons, the nitrergic subpopulation produces nitric oxide, responsible for the inhibition of the local smooth muscle, besides being neuroprotective. The objective of this work is to analyze the quantification of nitrergic neurons of hamsters experimentally infected with Leishmania chagasi in different periods. For this study, golden hamsters were used where the experimental group received intraperitoneal promastigotes from L. chagasi, and the control group received the same via physiological solution. After 30, 60 and 90 days of infection, the animals were euthanized and portions of the jejunum and ileum were collected and submitted to NAPH-dp histochemistry for the detection of nitrergic neurons. A significant increase ($p <0.05$) of 196% and 160%, respectively, in the period of 30 days, in the periods of 60 and 90 days, was observed, but not significantly. However, the study shows a significant increase only in the first 30 days, also showing an increase in the other periods (60 and 90), but these are not significant.

Keywords: Visceral Leishmaniasis - Enteric Nervous System - Nitrergic Neurons

Introdução

Os protozoários pertencentes à espécie *Leishmania (L.) chagasi* (sinônima *L. (L.) infantum*), são os causadores da leishmaniose visceral (LV). Esta espécie de protozoário está presente em diversas espécies de vertebrados, sendo eles os animais silvestre, domésticos e também o homem [1-2-3]. A LV é uma doença de caráter zoonótico de grande importância para a saúde pública, pois o aumento no número de casos está relacionado ao processo de urbanização e das alterações nos ambientes naturais, onde o desmatamento e o avanço da população para o habitat natural dos hospedeiros, levam a proximidade do homem com a doença. Além de que a migração de animais infectados, principalmente cães, acaba aproximando o contato com o homem e levando os protozoários para outros ambientes que não tinham a doença [4].

De modo geral a LV pode acometer diversos órgãos, sendo como alvos principais o baço e o fígado, mas por ser considerada uma enfermidade generalizada, também acomete o trato gastrointestinal (TGI) [5-6].

O TGI é controlado pelo sistema nervoso entérico (SNE), que responsável por controlar e coordenar o fluxo sanguíneo, a motilidade e as secreções de todo o TGI [7] esse controle é realizado por neurônios e células gliais que são organizados em plexos que ficam localizados na parede do órgão [8-9].

Dentre os neurônios do SNE, a subpopulação nitrérgica, expressa óxido nítrico (ON), que tem função inibitória na musculatura lisa local [10-11]. O ON é um neurotransmissor que tem sido implicado tanto nos processos patológicos quanto nos fisiológicos [12], que possui caráter neuroprotetor, tendo também um papel contra as infecções parasitárias, criando uma barreira que protege as células do tecido. O comprometimento dessas células nervosas pode acarretar em diversos problemas gastrointestinais [13-14].

Objetivos

O objetivo deste trabalho é avaliar a relação entre o parasitismo causado por *L. chagasi* e os neurônios nitrérgicos de jejuno e íleo de hamsters infectados experimentalmente em diferentes períodos.

Materiais e Métodos

Para tanto, foram utilizados (n=33) machos de hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*), onde o grupo experimental (GE) foi infectado intraperitonealmente com 10^7 formas

promastigotas em fase estacionária de crescimento, e o grupo controle (GC) recebeu pela mesma via solução fisiológica. Após os períodos pré-estabelecidos de 30, 60 e 90 dias pós-infecção (PI), os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2, conforme aprovado pelo comitê de ética (CEUA/USP - nº 056/16). Logo após, porções de jejuno e íleo foram coletados e submetidos à tecnicahistoquímica de NADPH-diaforase para a evidenciação dos neurônios nitrérgicos. Os resultados foram avaliados pelo teste de Turkey e expressos por média ± desvio padrão.

Resultados

A densidade de neurônios (mm²) aumentou nos dois segmentos intestinais, nos diferentes períodos de infecção, quando comparados com seus respectivos controles. A densidade dos neurônios do jejuno, quando comparados os animais de 30 PI apresentou aumento significativo ($p<0,05$) de 196%, nos períodos de 60 PI e 90 PI foi observado aumento na densidade neuronal, porém sem diferença significativa ($p>0,05$). No íleo observou-se o mesmo padrão, sendo no grupo com 30 PI evidenciado aumento significativo ($p<0,05$) de 160%, enquanto que nos grupos de 60 PI e 90 PI não se observou diferenças estatísticas ($p>0,05$) (Tab. 1).

Tab. 1 - Densidade neuronal (mm²) nos segmentos intestinais dos animais controles (GC) e dos animais infectados intraperitonealmente (GE), expressos por média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa ($p<0,05$)

Segmento	Jejuno		Íleo	
	GC	GE	GC	GE
Período (PI)				
30	$37,27 \pm 5,44^{a}$	$110,39 \pm 10,27^{b}$	$56,03 \pm 2,9^{a}$	$145,72 \pm 7,54^{b}$
60	$56,02 \pm 0,9^{a}$	$96,33 \pm 8,47^{a}$	$69,01 \pm 10,32^{a}$	$96, 04 \pm 1,58^{a}$
90	$42,19 \pm 3,93^{a}$	$61,76 \pm 6,75^{a}$	$41,15 \pm 6,75^{a}$	$97,73 \pm 11,8^{a}$

** Letras diferentes na mesma linha dos segmentos intestinais diferem pelo teste de Turkey*

Discussão

O SNE sofre de diversas influências, como por envelhecimento, restrição calórica, medicamentos e doenças. Essas interferências causam modificações na morfologia do plexo mientérico, como alterações na densidade neuronal, aumento ou diminuição das áreas dos perfis celulares e nucleares, além de modificações na estrutura da rede nervosa [15-16].

Neste estudo, os animais infectados com *L. chagasi* tiveram um aumento significativo ($p<0,05$) dos neurônios nitrérgicos no período de 30 PI em ambos segmentos intestinais. Já nos períodos seguintes (60 e 90 dias), o aumento observado não foi significativo ($p>0,05$).

Em outros trabalhos que relatam as alterações estruturais do SNE e do TGI decorrentes de infecções parasitárias, não apresentam resultados semelhantes. Ratos infectados com os protozoários *Toxoplasma gondii* e *T. cruzi*, apresentaram redução neuronal na infecção de curto período [17-18]. Já em trabalhos que relatam a cronicidade da toxoplasmose em ratos observaram aumento significativo dos neurônios nitrérgicos [15].

A crescente produção de ON pode estar relacionada ao estresse causado pelo parasita no SNE que leva ao aumento da atividade metabólica, pois ele também é um neurotransmissor e protetor do trato gastrointestinal [19-20-21]. Porém o aumento da expressão do ON pode resultar em mudanças fenotípicas no plexo mioentérico, como aumento na densidade neuronal, observado no presente trabalho, onde os neurônios começam a expressar a enzima NADPH-d para ajudar a combater o parasitismo [22].

Conclusão

A infecção parasitária causada pelo protozoário da espécie *L. chagasi* no período inicial de 30 dias, mostrou aumento na densidade neuronal em ambos os segmentos intestinais, quando comparados com seus respectivos controles. Nas fases mais crônicas da infecção (60 e 90 PI), observou-se também um aumento desta subpopulação, porém já não apresentam diferenças significativas em relação aos seus controles.

Referências Bibliográficas

1. SOUZA AI; JULIANO RS; GOMES TS; ARAUJO DINIZ S; BORGES AM; TAFURI WL; SANTOS RL (2005). Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog**.** Veterinary Parasitology. v.129(1-2), p.4-51.
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION (2010). Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO reported on neglected tropical diseases. In: WHO Geneva, p.184.
3. MINISTÉRIO DA SAÚDE (2015). Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfecção leishmania-HIV / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. 1ª edição revista e ampliada. Brasília, p.109.
4. OLIVEIRA AM (2016). Estudo da expansão da Leishmaniose visceral no estado de São Paulo e de fatores intervenientes. Tese de Doutorado. São Paulo.
5. BLAVIER A; KEROACK S; DENEROLLE P; GOY-THOLLOT I; CHABANNE L; CADORE JL; BOURDOISEAU G (2001). Atypical forms of canine leishmaniosis. The Veterinary Journal, v.162(2), p.108-120..
6. ALVAR J; CAÑAVATE C; MOLINA R; MORENO J; NIETO J (2004). Canine leishmaniasis. Advances in parasitology. v.57, p.1-88.
7. GABELLA G (1989). Fall in the number of myenteric neurons in aging guinea pigs. Gastroenterology, Baltimore. v.96(6), p.1487-1493.
8. SAVIDGE TC (2014). Importance of NO and its related compounds in enteric nervous system regulation of gut homeostasis and disease susceptibility. Curr. Opin. Pharmacol.

p.54–60.
9. SHARKEY KA; SAVISGE TC (2014). Role of enteric neurotransmission in host defense and protection of the gastrointestinal tract. Auton. Neurosci. v.182, p.70–82.
10. BULT, H. et al. Nitric oxide as na inhibitory nonadrenergic, non-cholinergic neurotransmitter. Nature, London, v.345, p.346-347, 1990.
11. JARVINEN MK; WOLLMANN WJ; POWROZEK TA; SCHULTZ JA; POWLEY TL (1999). Nitric oxide syntase-containing neurons in the myenteric plexus of the rat gastrointestinal tract: distribution and regional density. Anat Embryol, Berlin, v.199, p.99-112.
12. GARSIDE S; WOULFEA J; MAZUREKABC MF (1997). The ontogeny of NADPH-diaphorase neurons in serum-free striatal cultures parallels in vivo development. Neuroscience, Kidlington, v.76(4), p.1221-1230.
13. DA SILVEIRA ABM; D'AVILA REIS D; OLIVEIRA EC; NETO SG; LUQUETTI AO; POOLE D; CORREA-OLIVEIRA R; FURNESS JB (2007). Neurochemical coding of the enteric nervous system in chagasic patients with megacolon. Dig Dis Sci, v.52(10), p.2877-83.
14. VICENTINO-VIEIRA SL; MELO GAN; GÓIS MB; MOREIRA NM; PEREIRA LGA; ARAÚJO EJA; GARCIA JL; SANT'ANA DMG (2015). Oral dependent-dose toxoplasmic infection model induced by oocysts in rats: Myenteric plexus and jejunal wall changes. Experimental Parasitology. v.156, p.12–18.
15. FREGONESSI CEPT; MOLINARI SL; NETO MHM (2004). Avaliação da população de neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos do corpo do estômago de ratos com diabetes crônicos induzidos pela estreptozootocina. Acta Scientiarum. Biological Sciences. Maringá, v.26(1), p.107-112.
16. MAJOR JAA; CLEBIS NK; MARI RB; GAGLIARDO KM; GUIMARÃES JP; SOUZA RR; STABILLE S.R; DIAS NSO; GERMANO RM (2015). Efeito da atividade física moderada sobre neurônios mioentéricos nitrérgicos do íleo de ratos de meia idade. Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama, v.18(3), p.141-147.
17. SANT'ANA DMG; GOIS MB; HERMES-ULIANA C; PEREIRA-SEVERI LS; BAPTISTA EM; MANTOVANI LC; SILVA AV; ARAÚJO EJA (2017). Acute infection with an avirulent strain of *Toxoplasma gondii* causes decreasing and atrophy of nitrergic myenteric neurons of rats. Acta Histochemica. v.119(4), p.423-427
18. MEYER IF; KANESHIMA EN; SOUZA-KANESHIMA AM (2007). Alterações no sistema digestivo desencadeadas pelo quadro infeccioso do *Trypanosoma cruzi*. Iniciação Cientifica Cesumar. v.8.1, p.11-23.
19. BELAI A; Cooper S; Burnstock G (1995). Effect of age on NADPH-diaphorase-containing myenteric neurones of rat ileum and proximal colon. Cell and tissue research. v.279(2), p.379-383.
20. FURNESS, JB (2008). The enteric nervous system: normal functions and enteric neuropathies. Neurogastroenterology & Motility. v.20, p.32-38.
21. O'TOOLE G; A; KOLTER R (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development. Molecular microbiology. v.30.2, p.295-304.
22. ODORIZZI L (2010). Quantitative and morphometric changes of subpopulations of myenteric neurons in swines with toxoplasmosis. Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical, v. 155, n. 1, p. 68-72.