

Karine Soares de Oliveira

**LEISHMANIOSE VISCERAL EXPERIMENTAL: DINÂMICA
DAS ALTERAÇÕES INTESTINAIS NA INFECÇÃO POR
*Leishmania (L.) chagasi***

São Vicente - SP

- 2018 -

LEISHMANIOSE VISCERAL EXPERIMENTAL: DINÂMICA DAS ALTERAÇÕES INTESTINAIS NA INFECÇÃO POR

Leishmania (L.) chagasi

Karine Soares de Oliveira

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Renata de Britto Mari

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Domingues Passero

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus do Litoral Paulista, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Aquática.

São Vicente – SP

-2018-

616.96 Oliveira, Karine Soares de
Ol41 Leishmaniose visceral experimental: dinâmica das alterações
intestinais na infecção por *Leishmania (l.) chagasi*/ Karine Soares
de Oliveira. - São Vicente, 2018.
50 p.: il, figs., gráfs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Campus do Litoral Paulista - Instituto de Biociências.

Orientadora: Renata de Britto Mari

Co-orientador: Luiz Felipe Domingues Passero

1. Parasitologia 2. Leishmaniose visceral. 3. *Leishmania
chagasi*. 4. Intestino delgado. 5. Sistema nervoso entérico.

I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da UNESP
Instituto de Biociências - Campus do Litoral Paulista

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Leishmaniose visceral experimental. Dinâmica das alterações intestinais na infecção por Leishmania (L.) chagasi

AUTORA: KARINE SOARES DE OLIVEIRA

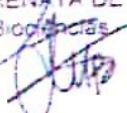
ORIENTADORA: RENATA DE BRITTO MARI

COORIENTADOR: LUIZ FELIPE DOMINGUES PASSERO

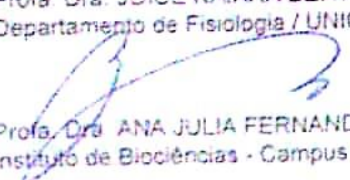
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIODIVERSIDADE AQUÁTICA, área: BIODIVERSIDADE pela Comissão Examinadora:



Prof. Dra. RENATA DE BRITTO MARI
Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista / UNESP



Prof. Dra. JOICE NAIARA BERTAGLIA PEREIRA
Departamento de Fisiologia / UNICSUL



Prof. Dra. ANA JULIA FERNANDES
Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista / UNESP

São Vicente, 31 de julho de 2018

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Leishmaniose visceral experimental: dinâmicas das alterações intestinais na infecção por *Leishmania chagasi*", Protocolo **05/2017 - CEUA**, sobre a responsabilidade da **Profa. Dra. Renata de Britto Mari e Karine Soares de Oliveira**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA, do Instituto de Biociências do Campus do Litoral Paulista, em reunião de 08/05/2017.

Vigência do Projeto:	01/08/2016 a 01/08/2018
Espécie/linhagem:	Hamster dourado (<i>Mesocricetus auratus</i>)
Número de animais:	30 exemplares
Peso/Idade:	43g em média / 08 meses
Sexo:	Machos
Origem:	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)

São Vicente, 08 de maio de 2017.


Prof. Dr. Rafael Mendonça Duarte
Presidente - CEUA

Agradeço a Deus,

por todas as minhas conquistas até o momento.

Mas peço a Ele que continue me dando sabedoria

para conquistar muito mais.

A minha família...

*Em especial meus pais Andréa e Tony, meu irmão Tony Jr
E minhas avós Purificação e Maria Ivone*

*Obrigada por sempre me apoiarem e nunca medir esforços
para que eu pudesse realizar meus sonhos
Sem vocês do meu lado nada disso seria possível.*

*Obrigada por me ajudarem a enfrentar
todos os obstáculos da vida.
Obrigada por me ajudarem a
me tornar a pessoa que sou hoje.*

Esse trabalho eu dedico a todos vocês!

AGRADECIMENTOS

A professora Dr.^a Renata de Britto Mari, pela orientação, pelas conversas, esclarecimentos e ensinamentos. Obrigada por sempre me fazer buscar o meu melhor. Obrigada por ter me aceitado e me ajudado por esses anos. Graças a você eu descobri um novo amor dentro da minha profissão. Graças a você todo esse trabalho foi realizado. Muito obrigada por tudo!

Ao professor Dr. Luiz Felipe Domínguez Passero, por todos os ensinamentos e esclarecimentos. Obrigada por toda a ajuda na realização desse trabalho.

A Nathalia, Ítalo, Gabriela, Sarah, Alexandre e Thaís. Obrigada por toda troca de experiências e de conhecimentos que tivemos nesses anos. Obrigada por toda a convivência diária no LABMA. Obrigada por toda ajuda para a realização desse trabalho e também por todos os momentos de descontração.

Aos meus amigos Sarah, Louise e Alexandre. Obrigada pelos conselhos, conversas, desabaços. Vocês chegaram em minha vida e a tornaram muito mais alegre, levarei vocês para sempre em meu coração.

A Cláudia por toda ajuda e ensinamento na realização desse trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Aquática e a todos os docentes do campus, pela contribuição na minha formação.

A Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial a professora Dr.^a Márcia Dalastra Laurenti por permitir que utilizasse seu laboratório para realizar parte desse trabalho.

A todos do Laboratório de Patologias infecciosas do LIM 50, em especial a Jéssica, Thaí e Eduardo por toda a ajuda prestada nesses anos e por toda a troca de conhecimento.

*A todos que contribuíram de alguma forma na realização desse trabalho,
muito obrigada!*

SUMÁRIO

Resumo.....	7
Abstract.....	8
1. Introdução.....	9
2. Objetivo.....	17
3. Materiais e Métodos.....	17
3.1. Delineamento experimental.....	17
3.2. Técnicas para evidenciação da carga parasitária.....	18
3.2.1. Análise de Leishman-Donovan (LDU).....	18
3.2.2. Análise de Imunoistoquímica (IHC).....	19
3.3. Técnicas de evidenciação neuronal.....	20
3.3.1. Detecção dos neurônios mioentéricos nitrégicos (NADPH-diaforase positivos) (SCHERER-SINGLER et al., 1983).....	20
3.3.2. Detecção dos neurônios mioentéricos metabolicamente ativos (NADH- diaforase positivos) (GABELLA, 1969).....	20
3.4. Obtenção de preparados de membrana.....	20
3.5. Análises morfoquantitativas dos neurônios mioentéricos.....	21
3.5.1. Quantificação neuronal.....	21
3.5.2. Área dos perfis do corpo celular e nuclear (μm^2).....	21
3.6. Análise estatística.....	21
4. Resultados.....	22
5. Discussão.....	32
6. Conclusão.....	37
7. Referências Bibliográficas.....	38

RESUMO

A leishmaniose visceral é considerada a forma clínica mais grave das leishmanioses. É causada pelo parasita da espécie *Leishmania chagasi* que pode ser transmitida para animais silvestres, animais domésticos e também para o homem e que vem expandindo seu território. A infecção atinge principalmente o baço, o fígado e a medula óssea, porém, a infecção também atinge outros sistemas do organismo, como o trato gastrointestinal (TGI). O TGI é controlado pelo sistema nervoso entérico (SNE) que tem como função controlar o fluxo sanguíneo, relaxamento e contração da musculatura lisa local, agindo de maneira independente do sistema nervoso central, mas mantendo contato através do eixo cérebro-intestinal. Além disso, tem relação com o sistema imunológico, visto que o intestino é considerado o maior órgão imune do corpo. Os neurônios mioentéricos do SNE são responsáveis por toda motilidade do TGI sofrendo alterações sempre que sofrem algum tipo de estresse, como por envelhecimento, dietas e até mesmo doenças. Essas alterações mostram a plasticidade neuronal para que seja mantida sempre a homeostase do intestino. Portanto, visto a importância do SNE para o funcionamento adequado do organismo, o objetivo desse trabalho foi observar como o parasitismo causado por *L. chagasi* atinge o intestino delgado de hamsters em diferentes períodos, avaliando a plasticidade neuronal ao decorrer da infecção parasitária. Para isso foram utilizados hamsters dourados que foram divididos em grupo controle e experimental. Os animais foram eutanasiados após 30, 60 e 90 dias de infecção e foram coletados fragmentos do baço, fígado e intestino delgado para realizar análises de carga parasitária através de LDU (Unidades de Leishman-Donovan) e imunoistoquímica. Também foram coletadas porções do duodeno, jejuno e íleo que foram submetidas as técnicas de marcação neuronal NADPH-dp e NADH-dp e após realizadas as análises morfoquantitativas dos neurônios mioentéricos. Através das análises de carga parasitária foi possível observar que as formas amastigotas do parasita chegam ao intestino desde o primeiro período estudado. Os neurônios mioentéricos NADPH-dp e NADH-dp apresentaram alterações morfoquantitativas durante todos os períodos de infecção estudados, indicando que essas alterações foram decorrentes das ações imunológicas do organismo. A relação entre o sistema imune e o SNE são fundamentais para o equilíbrio da homeostase intestinal. Portanto, concluímos que a infecção parasitária causada por *L. (L.) chagasi* provocam alterações na plasticidade dos neurônios mioentéricos do intestino delgado.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral – Intestino delgado – Sistema Nervoso Entérico

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is considered the most severe clinical form of leishmaniasis. It is caused by the parasite of the species *Leishmania chagasi* that can be transmitted to wild animals, domestic animals and also to the human and, it has been expanding its territory. The infection mainly affects the spleen, liver and bone marrow, but the infection can also affect other systems of the body, such as the gastrointestinal (GI) tract. GI tract is controlled by the enteric nervous system (ENS), whose function is to control blood flow, relaxation and contraction of the local smooth muscle, acting independently of the central nervous system, but maintaining contact through the cerebellar-intestinal axis. In addition, it is related to the immune system, since the intestine is considered the largest immune organ in the body. The myenteric neurons of the ENS are responsible for all the motility of the GI tract undergoing changes whenever they suffer some type of stress, such as by aging, diets and even illnesses. These changes show the neuronal plasticity so that intestinal homeostasis is always maintained. The objective of this work was to observe how the parasitism caused by *L. chagasi* reaches the small intestine of hamsters in different periods, evaluating the neuronal plasticity during the parasitic infection. For this purpose, golden hamsters were used, which were divided into control and experimental groups. The animals were euthanized after 30, 60 and 90 days of infection and fragments of spleen, liver and small intestine were collected to perform parasite load analysis through LDU (Leishman-Donovan Units) and immunohistochemistry. Portions of the duodenum, jejunum and ileum were also collected, which were submitted to NADPH-dp and NADH-dp neuronal marking techniques and after morph-quantitative analysis of the myenteric neurons. Through the analysis of parasite load it was possible to observe how the amastigote forms of the parasite reach the intestine from the first period studied. The myenteric neurons NADPH-dp and NADH-dp plus morpho-quantitative changes during all years of infection, given that the occurrences were the body's immune actions. The relationship between the immune system and the ENS is fundamental for the balance of intestinal homeostasis. Therefore, we conclude that parasitic infection by *L. (L.) chagasi* causes changes in the plasticity of myenteric neurons of the small intestine.

Keywords: Visceral leishmaniasis – Small intestine – Enteric Nervous System

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias de caráter zoonótico, causadas por protozoários pertencentes à Ordem Trypanosomatida do gênero *Leishmania*, e sua principal forma de transmissão se dá através do repasto sanguíneo de dípteros fêmeas, do gênero *Lutzomyia* (figura 1) (GRAMICCIA, 2011; AKHOUDI *et al.*, 2016).



Figura 1. Vetor da leishmaniose visceral, pertencente ao gênero *Lutzomyia*. Fonte: Site - Ourofino Saúde Animal.

O parasita apresenta duas formas distintas durante seu desenvolvimento. Quando encontrado no hospedeiro invertebrado, é conhecido como promastigota, que é extracelular e possui um formato fusiforme com um longo flagelo (figura 2A). Já quando encontrado no hospedeiro vertebrado, chama-se amastigota, possuindo uma forma parasitária intracelular, principalmente em macrófagos, onde perde o flagelo e adquire um formato ovoide (figura 2B) (MONTEIRO, 2012).

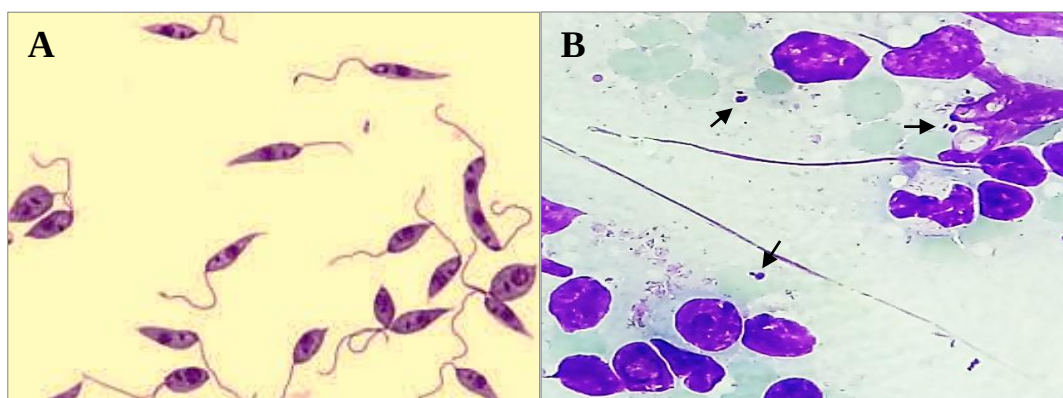


Figura 2. Formas promastigotas do parasita (figura A). Formas amastigotas do parasita, indicados pela seta de cabeça (figura B). Fonte figura A: LookForDiagnosis.

São conhecidas quatro formas clínicas da doença, a forma cutânea localizada, mucocutânea, anérgica difusa e a visceral, sendo essa última considerada a forma mais grave (CAMARGO *et al.*, 2007; WHO, 2015). A leishmaniose visceral (LV) ou Calazar, encontra-se nos cinco continentes, sendo endêmica em 70 países, incluindo o Brasil (figura 3) (HOTEZ; FUJIWARA, 2014; MARTINS-MELO *et al.*, 2016). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a LV é uma das doenças causadas por protozoário mais preocupante, considerada uma das seis endemias do mundo e fatal em 90% dos casos. A LV afeta cerca de dois milhões de pessoas por ano, onde 96% dos casos registrados em humanos, ocorrem no Brasil (figura 4) (BELO *et al.*, 2014; OPAS/ WHO, 2017).

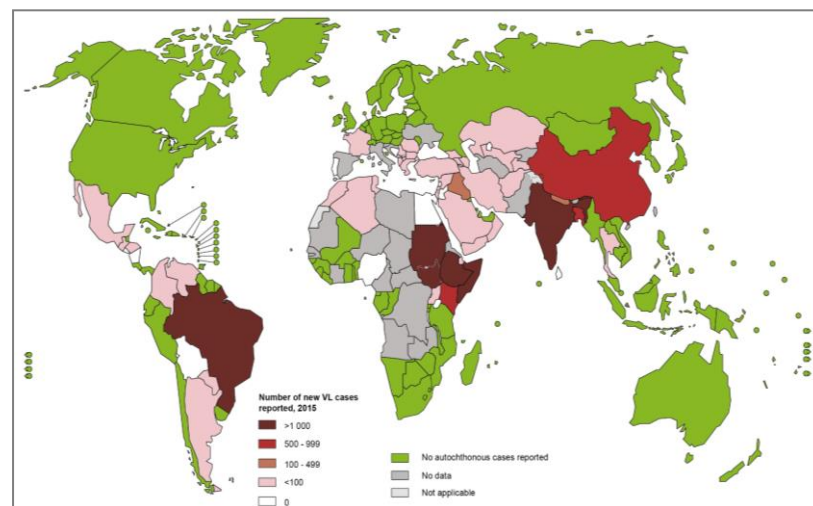


Figura 3. Mapa ilustrando quais locais existentes da leishmaniose visceral. Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2018.

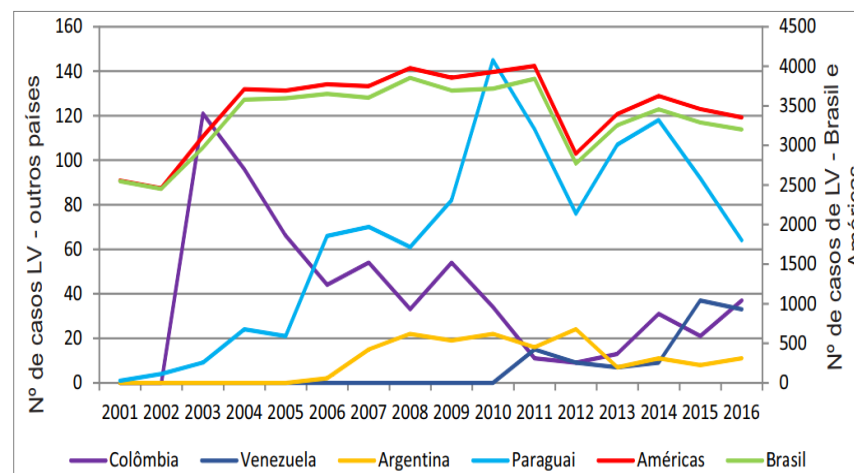


Figura 4. Gráfico indicando o número de casos de leishmaniose visceral na América do Sul. Fonte: SisLeish-OPAS/OMS 2018.

A LV é considerada uma doença negligenciada que afeta principalmente indivíduos que vivem em condições socioeconômicas baixas, por habitarem lugares com falta de saneamento básico, como rede de esgoto e coleta de lixo. As condições desses ambientes, principalmente pelo acúmulo de matéria orgânica, são propícias para a proliferação dos vetores, sujeitando esses indivíduos ao maior risco de infecção (COSTA *et al.*, 2005; BOELAERT *et al.*, 2009; MALAFAIA, 2010).

Anteriormente, a LV era considerada uma doença característica de zonas rurais, porém, desde a década de 1980 ela vem se tornando endêmica em cidades mais urbanizadas (SILVA *et al.*, 2014; DI MUCCIO *et al.*, 2015) mostrando o nítido processo de transição epidemiológica. Além disso, vale ressaltar que a LV não existia no estado de São Paulo, e os primeiros casos foram detectados em cães presentes na região noroeste do estado, durante a construção da rodovia Marechal Rondon (CARDIM *et al.*, 2013; OLIVEIRA, 2016). Outro fato que contribuiu com a expansão e mudança na epidemiologia da doença no estado, foi a construção do gasoduto Bolívia-Brasil, pois após sua construção, foram relatados casos de LV em mais 51 municípios de São Paulo. A expansão geográfica da doença está diretamente relacionada a migração de pessoas de diversas regiões onde a LV é endêmica (SEVÁ *et al.*, 2017).

Nos últimos anos há uma crescente incidência de casos de LV nas regiões do Sul do Brasil, como nos casos que ocorreram no Paraná, Florianópolis e Porto Alegre (FIGUEIREDO *et al.*, 2012; DIAS *et al.*, 2013; MATSUMOTO *et al.*, 2013; STEINDEL *et al.*, 2013; REIS *et al.*, 2017). Também é observado o avanço da doença para o litoral de São Paulo, onde nos anos de 2016 e 2017 ocorreram três casos em humanos na cidade de Guarujá (QUEIROZ, 2016; FIORAVANTI, 2018; MATTEOLI, 2018).

A mudança do perfil epidemiológico está também relacionada às ações antrópicas, como o processo de urbanização e o desmatamento, que causam desequilíbrio ambiental. Alterações ambientais e distúrbios ecológicos têm grande influência na proliferação de doenças (PATZ *et al.*, 2000; JÚNIOR *et al.*, 2015). A redução da biodiversidade devido ao desmatamento resulta principalmente, na disseminação de doenças transmitidas por vetores, aumentando o risco de pessoas que vivem perto de áreas desmatadas. Essa relação entre o desequilíbrio ambiental e a mudança no perfil epidemiológico de doenças parasitárias já foram bastante descritas, principalmente sobre malária e leishmaniose (ALHO, 2012; GOTTWALT, 2013; CONFALONIERI *et al.*, 2014). As alterações ambientais afetam os flebotomíneos, levando a adaptação desses vetores, visto que estes são altamente adaptáveis aos ambientes periurbanos, urbanos e até mesmo domiciliares, podendo levar ao aumento de surtos da doença nessas áreas (NIEVES *et al.*, 2014).

Sabe-se que o litoral de São Paulo, principalmente a Baixada Santista é uma região ambientalmente muito degradada devido à ocupação urbana e industrial. Porém, muitos dos habitantes são desprovidos de moradia em que haja saneamento básico adequado, tornando esses indivíduos susceptíveis a adquirir muitas doenças (PEREIRA *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2017). Dos casos de LV que ocorreram na região da Baixada Santista, são um indicativo que os números de casos do litoral paulista podem aumentar significativamente.

A recente expansão juntamente com as altas taxas de mortalidades fazem com que essa doença seja considerada de grande importância para a saúde pública nacional (GONZALES *et al.*, 2010; WERNECK, 2010; TONINI *et al.*, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2014; MARTINS-MELO, 2014; MS, 2014; WHO, 2017; SILVA *et al.*, 2018).

Sua infecção ocorre pela espécie *L. (L.) chagasi* (sinonímia *L. (L.) infantum*) e possui dois ciclos distintos (figura 5), sendo eles definidos em silvestre e doméstico. O ciclo silvestre da doença ocorre quando seus principais reservatórios são: o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), a raposa do campo (*Chrysocyon brachyurus*) e o gambá (*Didelphis albiventris*). Já no ciclo doméstico possui como reservatório os cães (*Canis familiaris*) e os gatos (*Felis catus*), além do homem. A proximidade que os animais domésticos têm com o homem faz com que eles ocupem uma posição de grande destaque na cadeia epidemiológica (AZEVEDO *et al.*, 2011; DE QUEIROZ *et al.*, 2011; OPAS, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2015; GODOI *et al.*, 2016). O cão, principalmente, é visto como o responsável pela persistência da LV em ambientes tropicais e neotropicais (DANTAS-TORRES *et al.*, 2012).

No Brasil, a maioria dos casos descritos estão associados à presença de cães contaminados, incluindo os casos que ocorreram no litoral paulista, pois os casos de LV humana precedem aos casos que ocorrem nesses animais. A alta taxa de reprodução e o crescente número de abandono de cães, juntamente com o desmatamento acentuado são considerados determinantes para a ocorrência de LV nos grandes centros urbanos (FURLAN, 2010; OPAS, 2012; BRASIL, 2014; PAULA *et al.*, 2014; LAZARI *et al.*, 2016).

Os principais órgãos acometidos pela LV são: baço, fígado e medula óssea, que são órgão do sistema imunológico (SILVEIRA *et al.*, 2010). Porém, alterações causadas em outros órgãos podem ocorrer, como aqueles pertencentes ao sistema nervoso, urinário e trato gastrointestinal (TGI), levando ao comprometimento sistêmico observado nas infecções naturais e experimentais (BLAVIER *et al.*, 2001; ALVAR *et al.*, 2004).

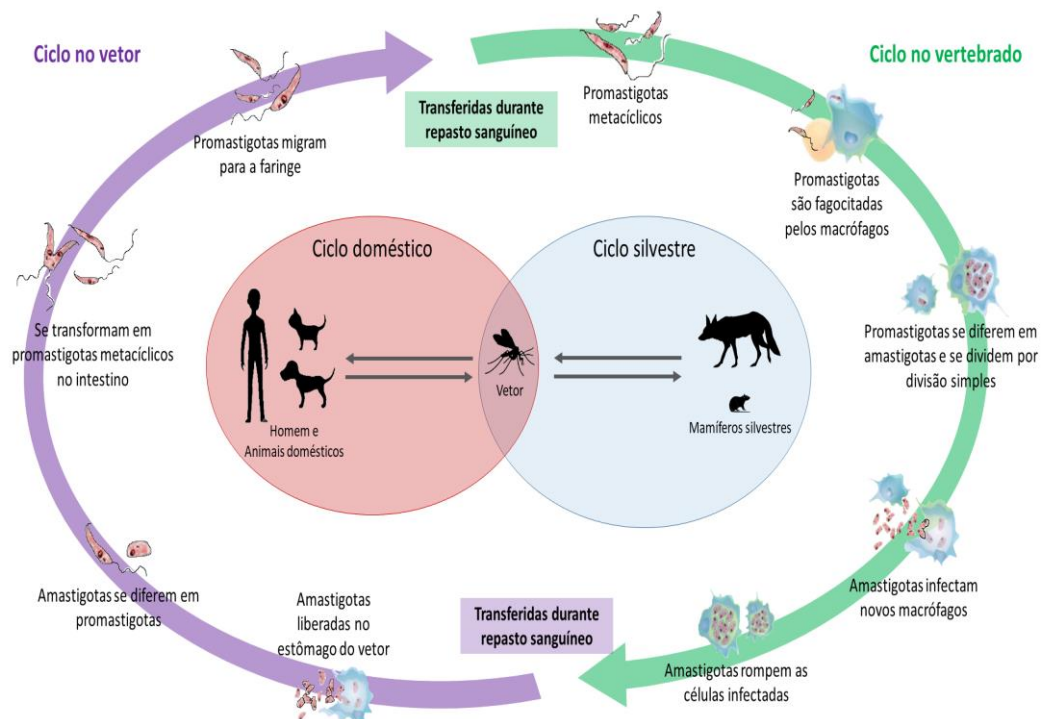


Figura 5. Ciclo da leishmaniose visceral indicando como ocorre no vertebrado e no invertebrado. Fonte: Adaptado de Silva, 2012.

A LV é considerada uma enfermidade generalizada e crônica, sendo o primeiro sintoma da visceralização, a febre baixa recorrente, frequentemente, com dois ou três picos diários que persistem com remissões durante todo o curso da infecção da doença. A segunda manifestação, em importância, no desenvolvimento do quadro é a esplenomegalia, que costuma ser em maior escala que a hepatomegalia, a qual, por sua vez, também persiste nos achados clínicos. Há, ainda, na maioria dos casos, micropoliadenia (aumento generalizado dos linfonodos), além de uma série de eventos que se iniciam à medida que os órgãos são acometidos, desencadeando alterações de ordem fisiológica e histopatológica, as quais se agravam com o decorrer da doença, como vômitos, diarreia e dor abdominal (OLIVEIRA *et al.*, 2006; QUEIROZ *et al.*, 2004; SILVEIRA *et al.*, 2010). Os sintomas da leishmaniose canina são diversos, podendo observar-se linfadenomegalia, onicogrifose, anemia, hepato e esplenomegalia, lesões cutâneas, trombose, epistaxe, lesões oculares e poliartrites, dentre outros (FARIA; ANDRADE, 2012).

O TGI possui função altamente seletiva, respondendo aos agentes causadores de doenças os patógenos ao mesmo tempo em que é insensível aos antígenos alimentares e microbiota comensal (MACDONALD; MONTELEONE, 2005). A barreira gastrointestinal compreende vários mecanismos de defesa, tais como bactérias comensais, a camada de muco, a

morfologia das tûnicas intestinais e neurônios entéricos (KEITA; SÖDERHOLM, 2010; BAILEY *et al.*, 2011), que protegem o organismo do ambiente externo contra bactérias, toxinas e parasitas. Sendo assim, o intestino é considerado o maior órgão imune do corpo, correlacionando as funções digestivas e absorptivas, com as defesas imunológicas (FASANO; SHEA-DONOHUE, 2005; MCCOLE; BARRETT, 2007; TURNER, 2009).

O intestino possui cerca de 80% das células imunológicas do corpo e mais de 100 milhões de neurônios (KAGNOFF, 1987; FURNESS *et al.*, 2014). As estruturas imunes estão associadas principalmente aos tecidos linfoides e placas de Peyer, que são encontradas principalmente no jejuno e íleo. A lâmina própria também contém células imunes inatas e adaptativas que ajudam o organismo a combater patógenos causadores de infecções ou doenças além de serem importantes para o funcionamento entérico (NIJHUIS *et al.*, 2010; DE JONGE, 2011; MATTEOLI *et al.*, 2014; YOO; MAZMANIAN, 2017).

A resposta imunológica do TGI é acelerada à medida que as células de defesa estão especificamente localizadas. Essas células atuarão primeiro, no caso da infecção e depois na liberação de citocinas para estimular e regular a resposta imune que pode ocorrer no órgão (BUZONI-GATEL; WERTS, 2006). As infecções intestinais por parasitas acarretam alterações nos mastócitos e células nervosas, onde a regulação da fisiologia intestinal é uma resposta aos antígenos dos parasitos (MCKAY; BIENENSTOCK, 1994; SILVA, 2016).

O controle nervoso do TGI é realizado pelo sistema nervoso entérico (SNE), responsável pelas atividades inibitórias e excitatórias da musculatura, secreção e fluxo sanguíneo (FURNESS, 2006). O SNE atua de forma independente aos comandos do sistema nervoso central, porém mantém conexões com as aferências centrais pelas vias simpáticas e parassimpáticas formando o eixo cérebro-intestinal (BHATIA; TANDON, 2005; ROSTAGNO, 2009). Além disso, mantém interação com células entero-endócrinas e com o sistema imunológico (BURNS *et al.*, 2009). Quando o organismo sofre interferência por algum estresse, estimula a liberação de neuropinefrina alterando o funcionamento do SNE, no controle de secreção e motilidade do intestino (LOMAX *et al.*, 2010; BAILEY *et al.*, 2011).

O SNE apresenta-se organizado em forma de uma rede interconectada de neurônios e células da glia que se agrupam em dois grandes plexos principais: o plexo submucoso e o plexo mioentérico. O plexo submucoso está presente a partir do intestino, onde exerce a função de controle das secreções, absorção e fluxo sanguíneo. Já o plexo mioentérico localiza-se entre as tûnicas musculares circular e longitudinal em todo TGI, sendo responsável pelo controle dos movimentos peristálticos (FURNESS, 2008).

Dentre os diversos tipos de neurônios do SNE existem os neurônios sensoriais, os interneurônios e os neurônios motores. Os neurônios motores são responsáveis pelos movimentos inibitórios e excitatórios do músculo liso do TGI através da liberação de seus neurotransmissores, existindo mais de 30 tipos conhecidos no plexo mioentérico (FURNESS, 2008; WOOD, 2012).

Diversas técnicas histoquímicas são utilizadas para marcar os neurônios do SNE, dentre elas, está a técnica que utiliza a enzima NADPH-diaforase, que marca Óxido Nítrico (NO) dos neurônios (HOPE *et al.*, 1991). Os neurônios que utilizam o NO como neurotransmissor principal são chamados neurônios nitrérgicos e possuem como principal função promover a resposta inibitória da musculatura lisa local. O NO é de natureza gasosa que age se ligando aos radicais livres e protegendo as células dos efeitos reativos do oxigênio, sendo assim, considerado um neuroprotetor, onde as células que se utilizam dele se tornam mais resistentes à morte (BURMESTER; HANKELN, 2009). Outra técnica histoquímica muito utilizada, é a técnica que utiliza a enzima NADH-diaforase, que marca os neurônios metabolicamente ativos. Essa técnica permite evidenciar somente 80% da densidade total de neurônios (MIRANDA-NETO *et al.*, 2000; YOUNG *et al.*, 1993).

Estudos mostram que as infecções parasitárias que atingem o TGI alteram o SNE de forma direta ou indireta, tendo relação com o sistema imunológico. Porém, esse é o primeiro estudo a respeito de infecções causadas por *L. (L.) chagasi* no SNE.

Dentre as infecções, as causadas por protozoários são a toxoplasmose, a doença de chagas e a giardíase. Infecções causadas pelo protozoário *Toxoplasma gondii* causam alterações no metabolismo dos neurônios mioentéricos, provoca aumento na produção de NO na tentativa de proteger e combater o parasitismo, porém quando as infecções são causadas por cepas muito virulentas ou grande carga parasitária, os neurônios mioentéricos sofrem atrofia celular podendo chegar à morte (SUGAUARA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2011).

Outra infecção causada por protozoário é causada pela espécie *Trypanossoma cruzi*. As alterações observadas ocorrem principalmente no cólon, onde o aumento expressão de NO pelos neurônios leva a disfunção do órgão, apresentando problemas na secreção e absorção. Em consequência a esses problemas, tanto em infecções experimentais quanto naturais é observado sintomas como constipação resultando em um quadro clínico conhecido como Megacólon (NASCIMENTO *et al.*, 2010). A infecção causada pelo protozoário *Giardia sp.* também provocam aumento na produção de NO em resposta ao parasitismo, apresentando um maior trânsito intestinal e aumento das vilosidades do intestino (PAVANELLI *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011).

De um modo geral, as infecções causadas por protozoários alteram os neurônios do plexo mioentérico, provocando alterações na absorção, secreção e motilidade do TGI, apresentando principalmente deficiência no peristaltismo e no transporte de íons e fluídos. Além disso, existe uma correlação entre a resposta imune do hospedeiro, os mediadores inflamatórios e a atividade da SNE que já foi demonstrada para vários parasitas que atingem o TGI, mostrando a importância do eixo intestino-imune (HALLIEZ; BURET, 2015; MAWE, 2015; ODA *et al.*, 2017; PALUS *et al.*, 2017; VILLALOBOS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2017; BAI *et al.* 2018; CHETIA; DAS, 2018; PAVANELLI *et al.*, 2018; TIRONI *et al.*, 2018).

A relação entre o SNE e o sistema imunológico é bidirecional, pois, as células imunes são afetadas pelas ações dos neurônios entéricos, assim como os neurônios também são afetados pelos sinais emitidos pelas células imunológicas. O processo inflamatório causado pelo parasitismo na parede intestinal desencadeia mudanças na plasticidade dos neurônios mioentéricos, podendo levar a distúrbios no funcionamento de todo o TGI (BARBOSA *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2014; NOGUEIRA-PAIVA *et al.*, 2014; HALLIEZ; BURET, 2015; SANT'ANA *et al.*, 2017). Assim, o SNE e o sistema imunológico, juntamente com o sistema endócrino, estão intimamente relacionados com a fisiologia do intestino, para manter homeostase do órgão (TEM BOKUM *et al.*, 2000; KABOURIDIS; PACHNIS, 2015).

Portanto, visto a importância do SNE para o funcionamento do TGI, e a escassez de informações sobre a interferência do parasitismo causado pelo protozoário da espécie *L. (L.) chagasi* sobre o SNE, se faz necessário avaliar o comprometimento morfofisiológico dos neurônios mioentéricos de hamsters infectados experimentalmente durante os períodos agudo, intermediário e crônico.

2. OBJETIVO

Analisar as alterações morfoquantitativas dos neurônios do plexo mioentérico do intestino delgado de hamsters infectados experimentalmente por *L. (L.) chagasi*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

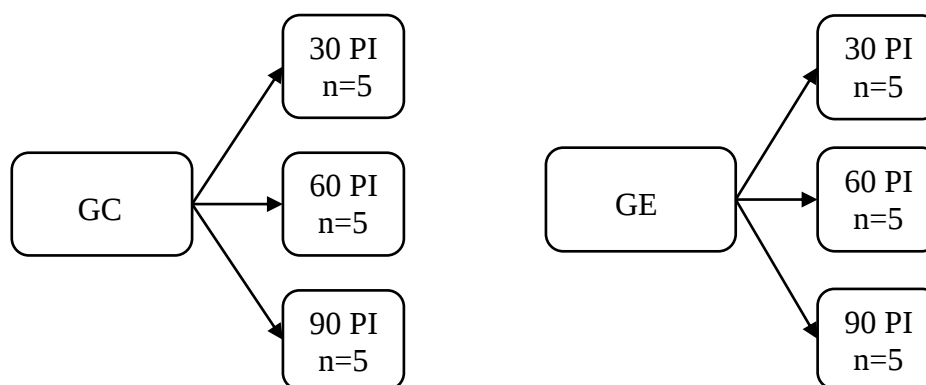
Para a realização dos experimentos foram utilizados hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*), em virtude de serem animais modelos para infecções experimentais com *L. chagasi*, uma vez que mimetizam as infecções naturais que ocorrem em humanos, cães, gatos e raposas.

3.1. Delineamento experimental

Para tanto, foram utilizados 30 animais de 8 semanas de vida, separados em dois grupos, sendo eles o grupo experimental (GE) e o grupo controle (GC). Cada grupo foi dividido em três períodos experimentais de acordo com o período de infecção (PI) contendo cinco animais em cada grupo.

Períodos de infecção (PI):

- Agudo com 30 dias de infecção (30 PI)
- Intermediário com 60 dias de infecção (60 PI)
- Crônico com 90 dias de infecção (90 PI)



Os animais GE foram infectados por via intraperitoneal, com 2×10^7 de promastigotas em fase estacionária da espécie *L. (L.) chagasi*. Já os animais GC receberam pela mesma via de inoculação 100µL/animal de solução fisiológica. Após cada período de infecção (PI), os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂.

Após a eutanásia, foram coletados fragmentos do baço, fígado, duodeno, jejuno e íleo, onde parte desse material foi destinado imediatamente à técnica de Unidades Leishman-Donovan (LDU) e outra parte foi fixada em formol 10% que posteriormente foram utilizados

para a análise imunoistoquímica (IHC). O restante dos segmentos intestinais (duodeno, a região proximal do jejuno e distal do íleo) foram destinadas as técnicas de evidênciação neuronal.

3.2. Técnicas para evidênciação de carga parasitária

3.2.1. Análise de Unidades Leishman-Donovan (LDU) - IMPRINT

Fragmentos do baço, fígado, duodeno, jejuno e íleo após a coleta foram pesados e a posição destes fragmentos foram feitas em lâminas, as quais foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa (figura 6).



Figura 6. Técnica para evidênciação de carga parasitária *imprint*.

A análise da carga parasitária foi realizada através de unidades Leishman-Donovan (FREITAS *et al.*, 2015) avaliando o número de amastigotas evidenciadas em 1000 células nucleadas, normalizando de acordo com o peso do fragmento analisado.

3.2.2. Análise de Imunoistoquímica (IHC)

Após o período de fixação em formol 10% os órgãos foram desidratados em ordens crescentes de álcoois 70%, 80%, 90% e absoluto, posteriormente diafanizados em xilol. Após foram inclusos em parafina histológica e submetidos a cortes transversais de 5µm.

Para evidenciar as formas amastigotas, cortes dos órgãos foram submetidos à reação de IHC de acordo com Jesus *et al.* (2016). Para isso, as lâminas com os respectivos cortes histológicos foram desparafinizadas em xilol por 15 minutos à temperatura ambiente, e depois

hidratados passando por cubas de álcool absoluto, 70%, 50%, 30% e água destilada, seguida por recuperação antigênica com tampão citrato 10 mM, pH 6,0 a 95°C por 30 minutos em banho Maria, seguido de mais 30 minutos para resfriamento, cerca de 50°C. As lâminas foram retiradas do tampão citrato e passaram por seis incubações de cinco minutos com peróxido de hidrogênio 3% para bloqueio da peroxidase endógena. Para bloqueio de ligações inespecíficas foi realizada uma incubação com leite desnatado (Molico-Nestlé) por uma hora a 37°C. Posteriormente, foram adicionados aos tecidos os seguintes anticorpos primários: anticorpo policlonal anti-*Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* produzido em camundongos BALB/c na diluição de 1/1000 em solução de albumina bovina 49 a 1% em PBS, anticorpo monoclonal anti-iNOS produzido em cabra, anticorpo monoclonal anti-L-9 arginase produzido em coelho (Santa Cruz Biotechnologies). As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 1 hora à 37°C.

As lâminas foram lavadas três vezes por cinco minutos cada com PBS e 0,05% de Tween 20 (PBS-T), em seguida foi utilizado reagente de bloqueio pós-primário do Novolink (RE7260-K–Novocastra), seguindo com a incubação por 45 minutos a 37°C. Após este período, foram feitas três lavagens de cinco minutos com PBS-T, seguido pela adição de polímero Novolink (RE7260-K–Novocastra), e incubou-se por 45 minutos a 37°C. Após esse período foram realizadas mais três lavagens com PBS-T por cinco minutos, seguido por incubação de 1 minuto a temperatura ambiente com uma solução de diaminobenzidina (DAB) com sistema cromógeno substrato – K3468 – DakoCytomation). A reação foi interrompida pela adição de água destilada, sendo lavadas com mais água destilada para retirar o excesso da solução de DAB. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris por quatro minutos a temperatura ambiente, desidratadas passando por cubas de álcool 50%, 80%, 95%, álcool absoluto e xilol, e em seguida montadas com lamínulas utilizando-se Entellan.

3.3. Técnicas de evidenciação neuronal

3.3.1. Deteccção dos neurônios mioentéricos nitrérgicos (NADPH-diaforase positivos) **(SCHERER-SINGLER *et al.*, 1983).**

Os segmentos intestinais foram lavados e preenchidos com PBS (pH 7,4). Em seguida, os segmentos foram submetidos a duas lavagens em solução de PBS (10 minutos cada) seguidas de permeabilizados em PBS contendo Triton X-100 a 0,3% diluídos em tampão fosfato de sódio (pH 7,3) por 10 minutos. Depois, mais duas lavagens em PBS durante 10 minutos cada. Para evidenciar os neurônios mioentéricos NADPH-dr positivos (NADPH-dp), após as lavagens, os

segmentos foram incubados em meio de reação constituído por 50 mg de NBT, 100 mg de β -NADPH e 0,3% de Triton X-100 em tampão Tris-HCl (0,1M pH 7,6) por 2 horas. Posteriormente as extremidades foram liberadas e os intestinos imersos em solução de paraformaldeído a 4% para a fixação e armazenagem.

3.3.2. Detecção dos neurônios mioentéricos metabolicamente ativos (NADH-diaforase positivos) (GABELLA, 1969).

As porções intestinais foram lavadas e preenchidas com solução de Krebs (pH 7,3). Após a lavagem, os segmentos foram submetidos ao procedimento para evidencição dos neurônios. Para tanto, os segmentos passaram por duas lavagens de dez minutos cada em solução de Krebs, e foram incubados em solução de Krebs contendo Triton X-100 a 0,3% durante cinco minutos. Mais duas lavagens de dez minutos em cada solução de Krebs foram realizadas, para posterior incubação em meio de reação constituído por 25ml de solução estoque de Nitro Blue Tetrazolium (NBT, solução estoque com concentração de 0,5 mg/ml), 25 ml de tampão fosfato de sódio (0,1 M; pH 7,3), 0,05 g de β -NADH em 50ml de água destilada. O tempo de incubação foi padronizado em 1 hora. Após os segmentos foram fixados em solução de formolaldeído a 10% em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,3).

3.4. **Obtenção de preparados de membrana**

Após o período de fixação de cada técnica, os segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) foram seccionados ao longo do eixo longitudinal na margem mesentérica e microdissecado sob estéreomicroscópio para a retirada das túnicas mucosa e submucosa, preservando as túnicas muscular e serosa. Os preparados de membrana obtidos passaram por cubas de álcool 90%, álcool absoluto e xilol e foram montados entre lâmina e lamínula de vidro com resina sintética Permout®.

3.5. **Análises morfoquantitativas dos neurônios mioentéricos**

3.5.1. Quantificação neuronal

A quantificação neuronal foi realizada por meio dos preparados de membrana obtidos do intestino delgado dos animais. A densidade neuronal foi obtida com o auxílio do microscópio de luz (aumento de 200X), sendo as imagens capturadas pela câmera digital

MoticImage[®] e transferidas para o computador. Para cada preparado foram capturados 40 gânglios na técnica de evidenciação neuronal NADPH-dp e 50 gânglios na técnica de evidenciação neuronal NADH-dp, amostrando todas as regiões (mesentérica, intermediária e antimesentérica) do intestino. O número total de neurônios foi estimado por meio da densidade neuronal por gânglio.

3.5.2. Área dos perfis do corpo celular e nuclear (μm^2)

A mensuração da área dos perfis do corpo celular e nuclear dos neurônios mioentéricos do intestino delgado foi realizada com o auxílio do programa de análise de imagem computadorizado Image-Pro-Plus 3.0.1. As imagens dos neurônios capturadas para a análise quantitativa foram utilizadas na análise morfométrica.

Foram mensurados o perfil celular e o perfil nuclear dos mesmos 100 neurônios por animal e os resultados obtidos foram distribuídos em histograma de frequência de acordo com o tamanho em intervalos de $150 \mu\text{m}^2$ para o perfil celular e $50 \mu\text{m}^2$ para o perfil nuclear.

3.6. **Análise estatística**

Os dados obtidos pela análise morfoquantitativa foram submetidos ao teste T. Os resultados foram expressos por média $\pm$ desvio padrão. O nível de significância foi de 5%.

4. **RESULTADOS**

Não foram observadas macroscopicamente ulcerações ou até mesmo disfunção em nenhum segmento intestinal.

As análises de carga parasitária mostraram que as formas amastigotas do parasita chegam ao intestino delgado desde o período agudo da infecção (figura 7). O aumento da carga parasitária no intestino é equivalente ao aumento observado no baço e no fígado (figura 8) durante os períodos experimentais, sendo que do período agudo para o intermediário o aumento foi de aproximadamente 20% e do intermediário para o crônico foi de aproximadamente 2,5% (figura 9).

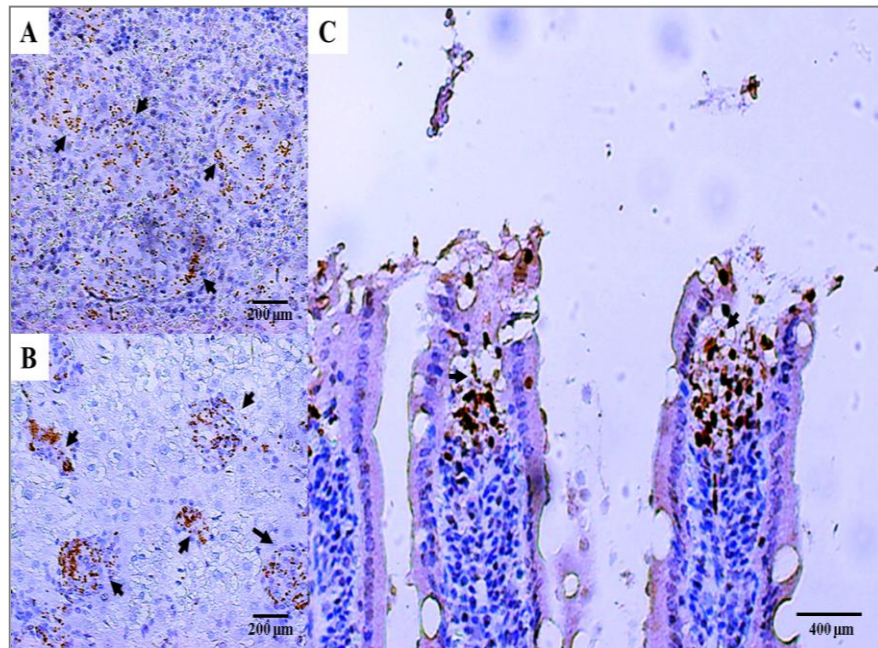


Figura 7. Fotomicrografia evidenciando as formas amastigotas (cabeça de seta) no baço (A), fígado (B) e intestino (C) pela técnica de imunoistoquímica (IHC).

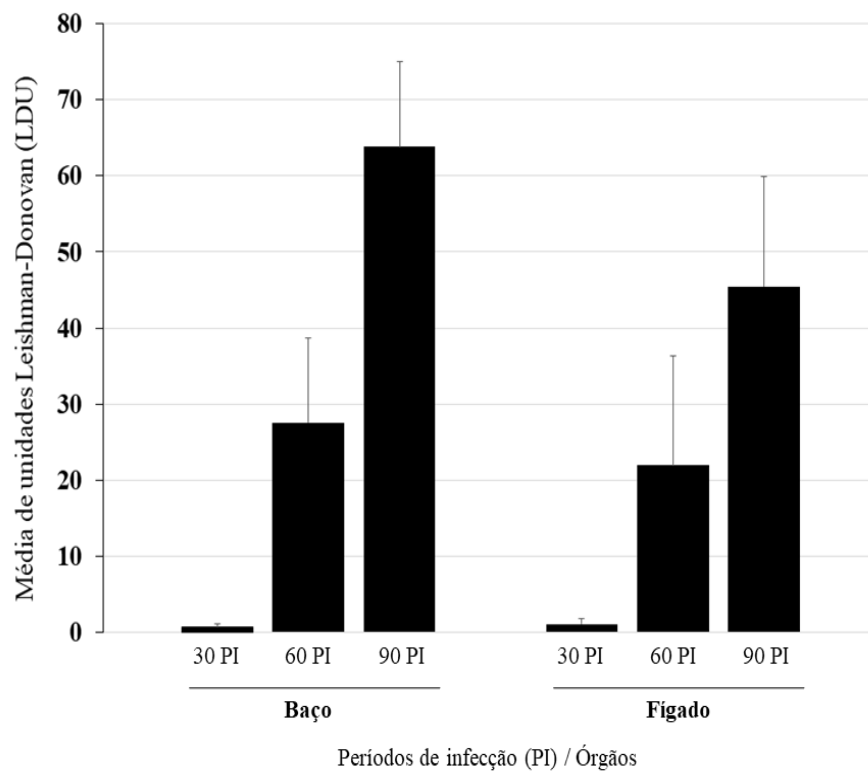


Figura 8. Unidades de Leishman – Donovan (LDU) do baço e fígado de hamsters nos diferentes períodos de infecção (30, 60 e 90 PI)

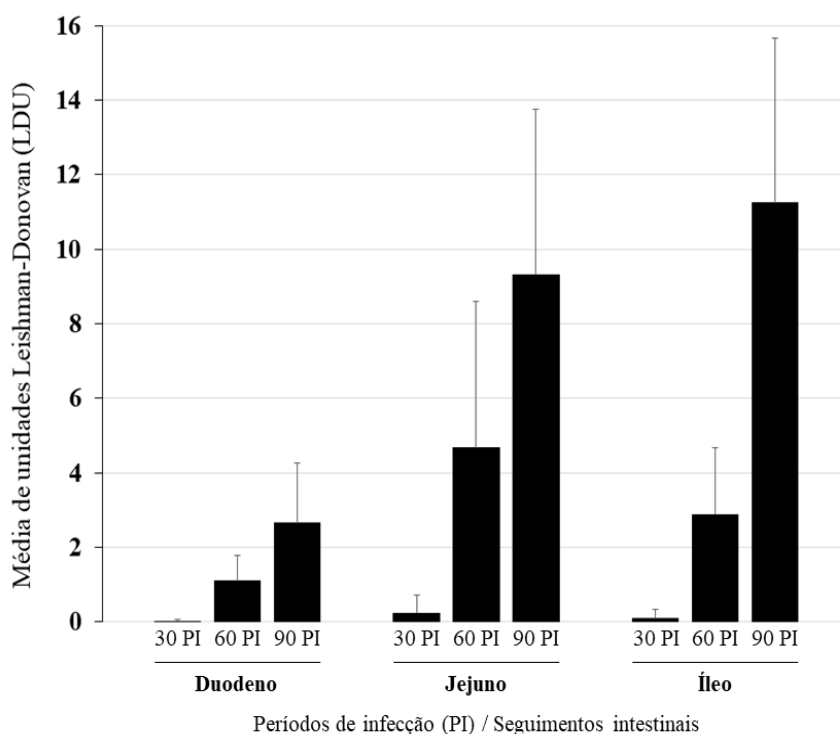


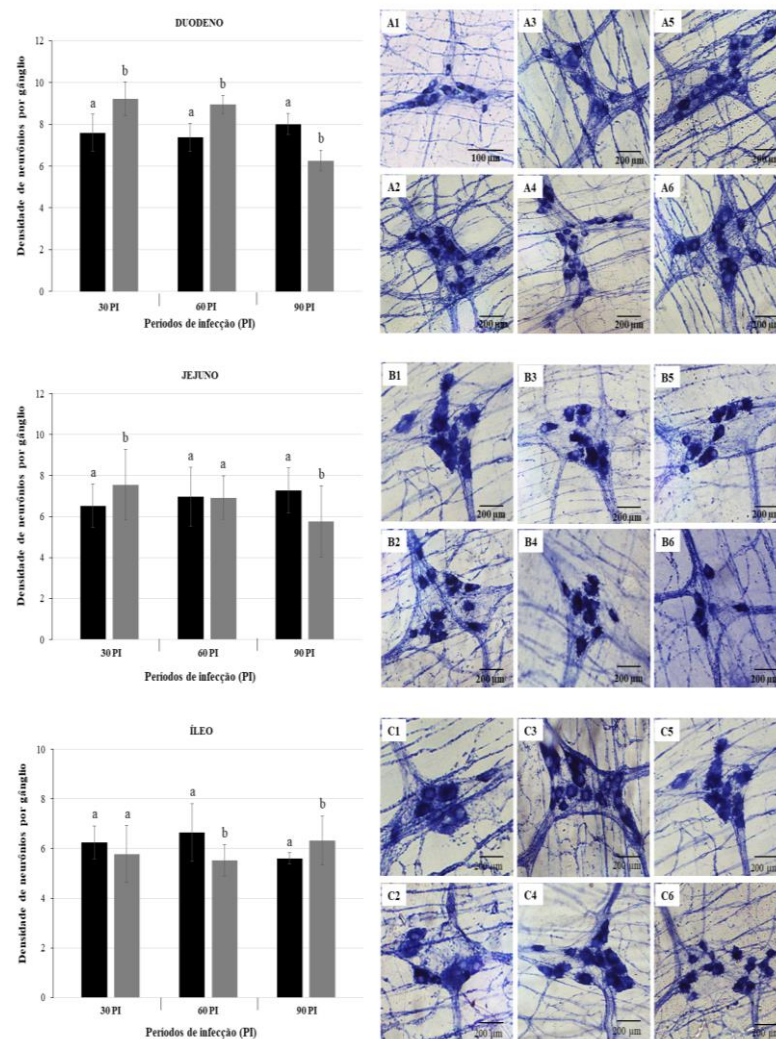
Figura 9. Unidades de Leishman – Donovan (LDU) do intestino delgado de hamsters nos diferentes períodos de infecção (30, 60 e 90 PI)

Ao observarmos a densidade dos neurônios mioentéricos nitrérgicos, do duodeno, foi possível observar aumento significativo ($p < 0,05$) de aproximadamente 21% nos períodos agudo e intermediário de infecção. Quando a infecção é observada no período crônico a densidade desta subpopulação reduz em 21,8% (figura 10). O jejuno também apresentou aumento na densidade dos neurônios mioentéricos nitrérgicos durante o período agudo da infecção de 15,81%, porém esse aumento foi seguido de redução de 20,8% no período crônico (figura 10). As diferenças observadas nos períodos agudo e crônico foram significativas ($p < 0,05$). Já no íleo, a subpopulação nitrérgica apresentou redução significativa ($p < 0,05$) no período intermediário de 16,7%. Já na fase crônica da infecção, foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) de 13% na densidade neuronal (figura 10).

A análise de densidade neuronal dos neurônios mioentéricos da subpopulação metabolicamente ativa, mostrou que o duodeno e o íleo apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) de 12,32% e 33,9% respectivamente, durante o período agudo de infecção. No íleo, esse aumento foi seguido de redução significativa ($p < 0,05$) na densidade nos períodos intermediário e crônico, onde apresentou no período intermediário redução de 29% e no período crônico de 35% (figura 11). No jejuno, foi observado aumento na densidade dos neurônios

mioentéricos metabolicamente ativos nos períodos agudo (21%) e intermediário (30%) da infecção. Porém, no período crônico, a densidade neuronal é reduzida em 12,12% (figura 11).

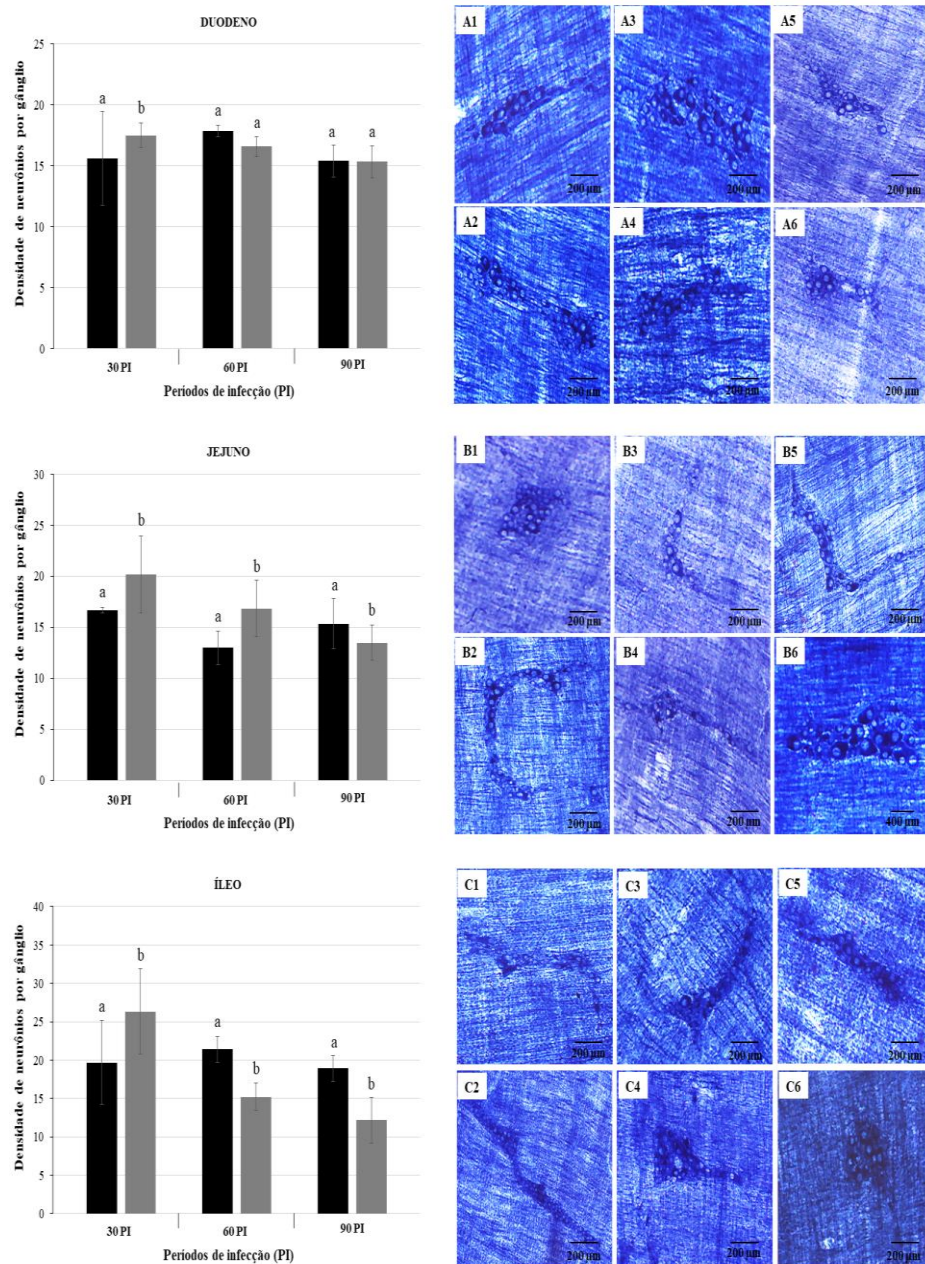
A partir da mensuração da área do perfil celular (PC) dos neurônios mioentéricos nitrérgicos do duodeno e íleo, observamos aumento significativo ($p<0,05$) nos períodos agudo (5,67% e 5,85%) e intermediário (6,65% e 17,5%). Já no período crônico houve redução do PC de aproximadamente 10% no duodeno e 39% no íleo, também significativa ($p<0,05$). O jejuno apresentou redução significativa ($p<0,05$) do PC em todos os períodos de infecção, essas reduções foram de 12,34%, 21,69% e 31,72% respectivamente (figura 12).



aa = Não houve diferença estatística. ab = Houve

Figura 10. Densidade dos neurônios mioentéricos do duodeno (A), jejuno (B) e íleo (C) da subpopulação metabolicamente ativa (NADPH-dp). As colunas pretas representam os GC e as colunas cinzas os GE em cada PI (30, 60 e 90). Fotomicrografias com

números ímpares representam os animais GC, e com os números pares os animais GE.



aa = Não houve diferença estatística. ab = Houve.

Figura 11. Densidade dos neurônios mioentéricos do duodeno (A), jejuno (B) e íleo (C) da subpopulação metabolicamente ativa (NADH-dp). As colunas pretas representam os GC e as colunas cinzas os GE em cada PI (30, 60 e 90). Fotomicrografias com números ímpares representam os animais GC, e com os números pares os animais GE.

A mensuração do PC dos neurônios mioentéricos metabolicamente ativos do duodeno apresentou aumento significativo ($p<0,05$) durante os períodos intermediário e crônico, sendo esses aumentos de 11,5% e 11,2% respectivamente (figura 13).

No jejuno, foi observada redução do PC no período agudo de 19% e no período intermediário de 17%. No período crônico da infecção houve aumento do PC de 8,5% (figura 13). Todas as alterações observadas foram consideradas diferentes estatisticamente ($p<0,05$).

Já no íleo, foi observado aumento do PC dos neurônios mioentéricos metabolicamente ativos no período agudo e intermediário. No período crônico, o PC reduziu (figura 13). Porém nenhuma alteração foi considerada diferente significativamente ($p>0,05$).

No duodeno, os neurônios mioentéricos da subpopulação nitrérgica e da subpopulação metabolicamente ativa, apresentaram tamanho do PC predominando entre 0 e 300 μm^2 (figura 14). O jejuno e o íleo apresentaram tamanho do PC dos neurônios mioentéricos nitrérgicos, predominando entre 150 a 450 μm^2 . Já os neurônios mioentéricos metabolicamente ativos, o tamanho do PC apresentou predominância de 0 a 450 μm^2 (figura 14).

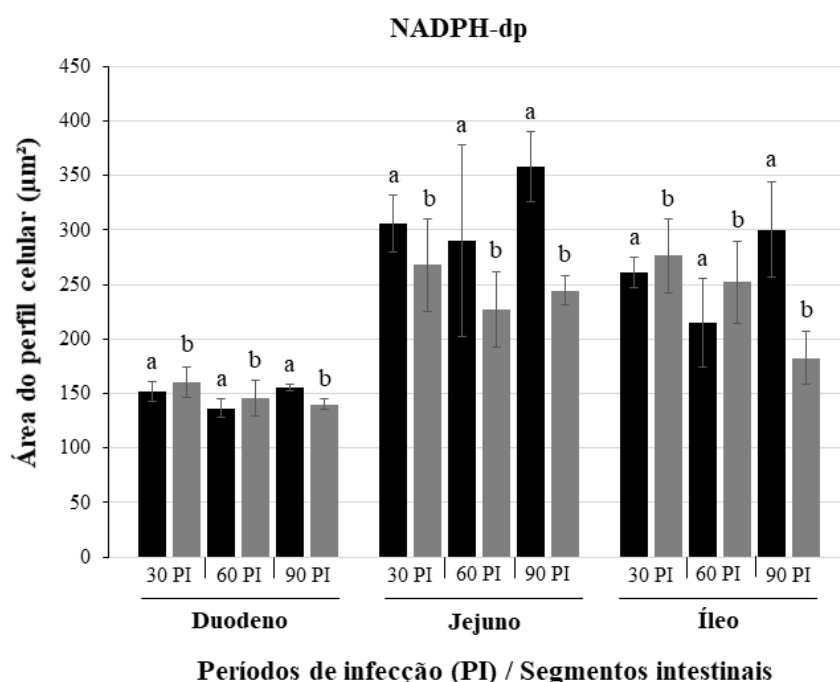


Figura 12. Área do perfil celular (μm^2) dos neurônios mioentéricos do intestino delgado da subpopulação nitrérgica (NADPH-dp). As colunas pretas representam os grupos controles (GC) e as colunas cinzas os grupos experimentais (GE) em cada período de infecção (30, 60 e 90 PI).

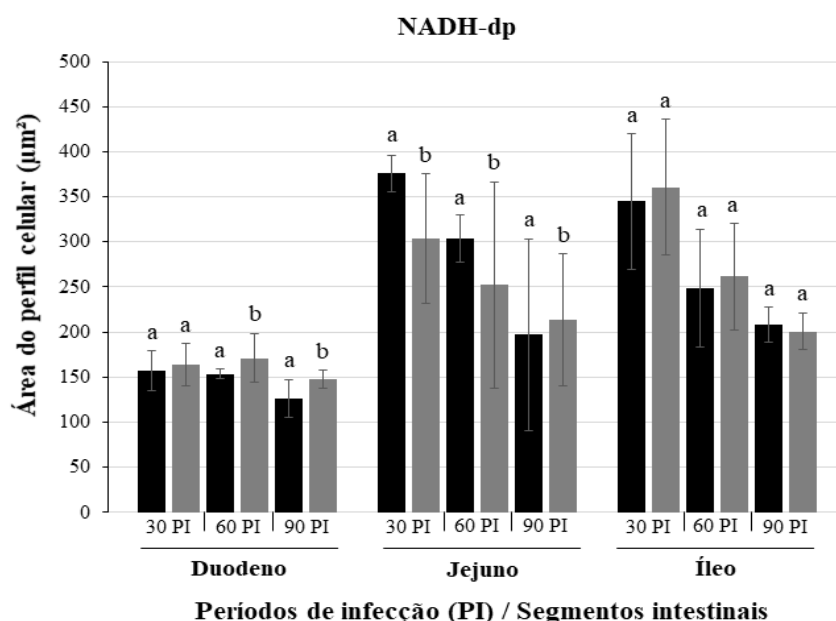


Figura 13. Área do perfil celular (μm^2) dos neurônios mioentéricos do intestino delgado das subpopulações metabolicamente ativas (NADH-dp). As colunas pretas representam os grupos controles (GC) e as colunas cinzas os grupos experimentais (GE) em cada período de infecção (30, 60 e 90 PI).

Através das análises morfométricas da área do perfil nuclear (PN) dos neurônios da subpopulação nitrérgica do duodeno, foi possível observar aumento significativo ($p < 0,05$) nos períodos agudo e intermediário, o aumento foi de 7,5% e 5,7% respectivamente (figura 15). No período crônico o resultado não foi significativo ($p > 0,05$).

No jejuno, as análises da área do PN dos neurônios mioentéricos da subpopulação nitrérgica, mostraram que houve redução em todos os períodos de infecção. Porém a redução foi significativa ($p < 0,05$) apenas nos períodos intermediário (14,74%) e crônico (21%) (figura 15).

O íleo, apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) do PN no período intermediário de 15% dos neurônios mioentéricos nitrérgicos. No período crônico, houve redução significativa ($p < 0,05$) de 23,5% (figura 15).

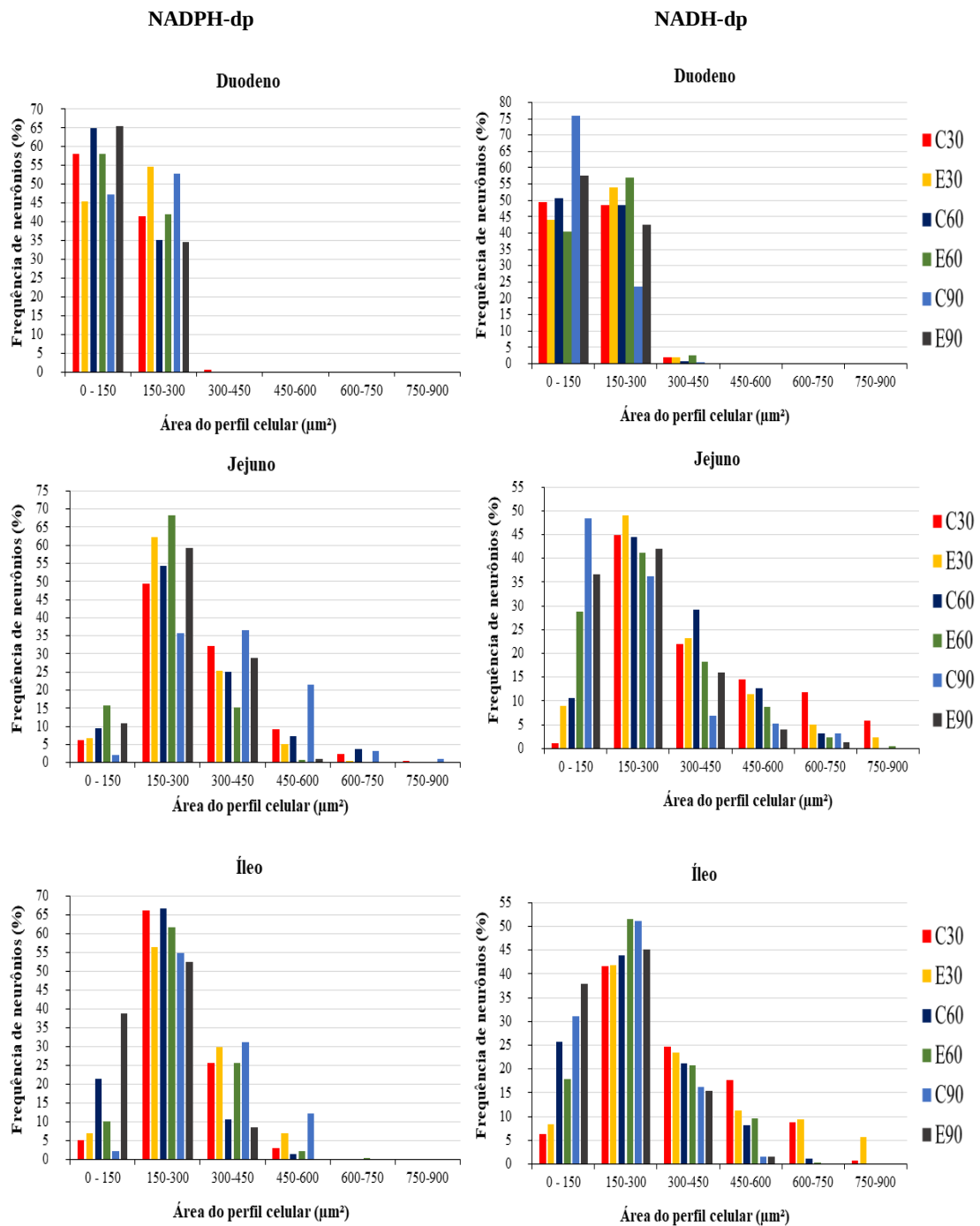


Figura 14. Histograma de frequência da área do perfil celular (PC) dos neurônios mioentéricos do da subpopulação nitrérgica (NADPH-dp) e da subpopulação metabolicamente ativa (NADH-dp). Animais controle (C) e experimental (E) nos diferentes períodos de infecção (30, 60 e 90).

Os neurônios mioentéricos metabolicamente ativos do duodeno apresentaram aumento significativo do PN ($p<0,05$) apenas durante os períodos intermediário (15,6%) e crônico (12%) (figura 15).

O jejuno apresentou redução significativa ($p<0,05$) do PN dos neurônios mioentéricos metabolicamente ativos de 21,3% apenas no período agudo da infecção (figura 16). Já nos períodos intermediário e crônico, as alterações não deram diferenças significativas ($p>0,05$).

No íleo, foi observado aumento significativo ($p<0,05$) do PN dos neurônios mioentéricos metabolicamente ativos, no período intermediário de aproximadamente 18%. Nos demais períodos estudados, as diferenças não foram significativas ($p>0,05$) (figura 16).

O duodeno apresentou o tamanho do PN dos neurônios mioentéricos predominando de 0 a 100 μm^2 , tanto na subpopulação nitrérgica como na subpopulação metabolicamente ativa (figura 17). No jejuno e no íleo, os neurônios mioentéricos nitrérgicos apresentaram tamanho do PN predominando de 50 a 150 μm^2 . Já a subpopulação metabolicamente ativa, em ambos os seguimentos intestinais, apresentou predominância do PN entre 0 e 200 μm^2 (figura 17).

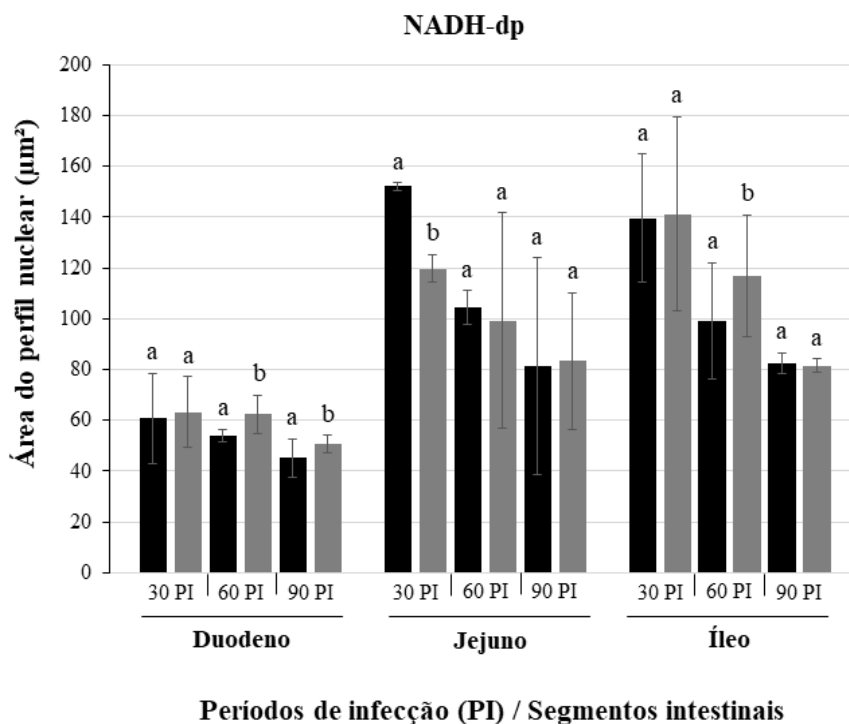


Figura 14. Área do perfil nuclear (μm^2) dos neurônios mioentéricos do intestino delgado da subpopulação nitrérgica (NADPH-dp) e da subpopulação metabolicamente ativa (NADH-dp). As colunas pretas representam os grupos controles (GC) e as colunas cinzas os grupos experimentais (GE) em cada período de infecção (30, 60 e 90 PI).

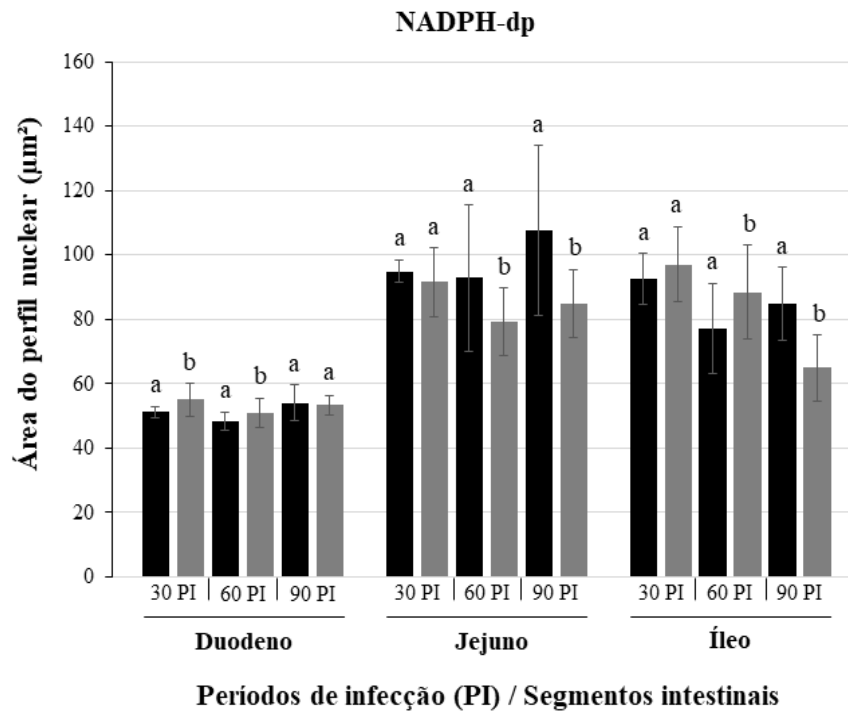


Figura 14. Área do perfil nuclear (μm^2) dos neurônios mioentéricos do intestino delgado da subpopulação metabolicamente ativa (NADH-dp). As colunas pretas representam os grupos controles (GC) e as colunas cinzas os grupos experimentais (GE) em cada período de infecção (30, 60 e 90 PI).

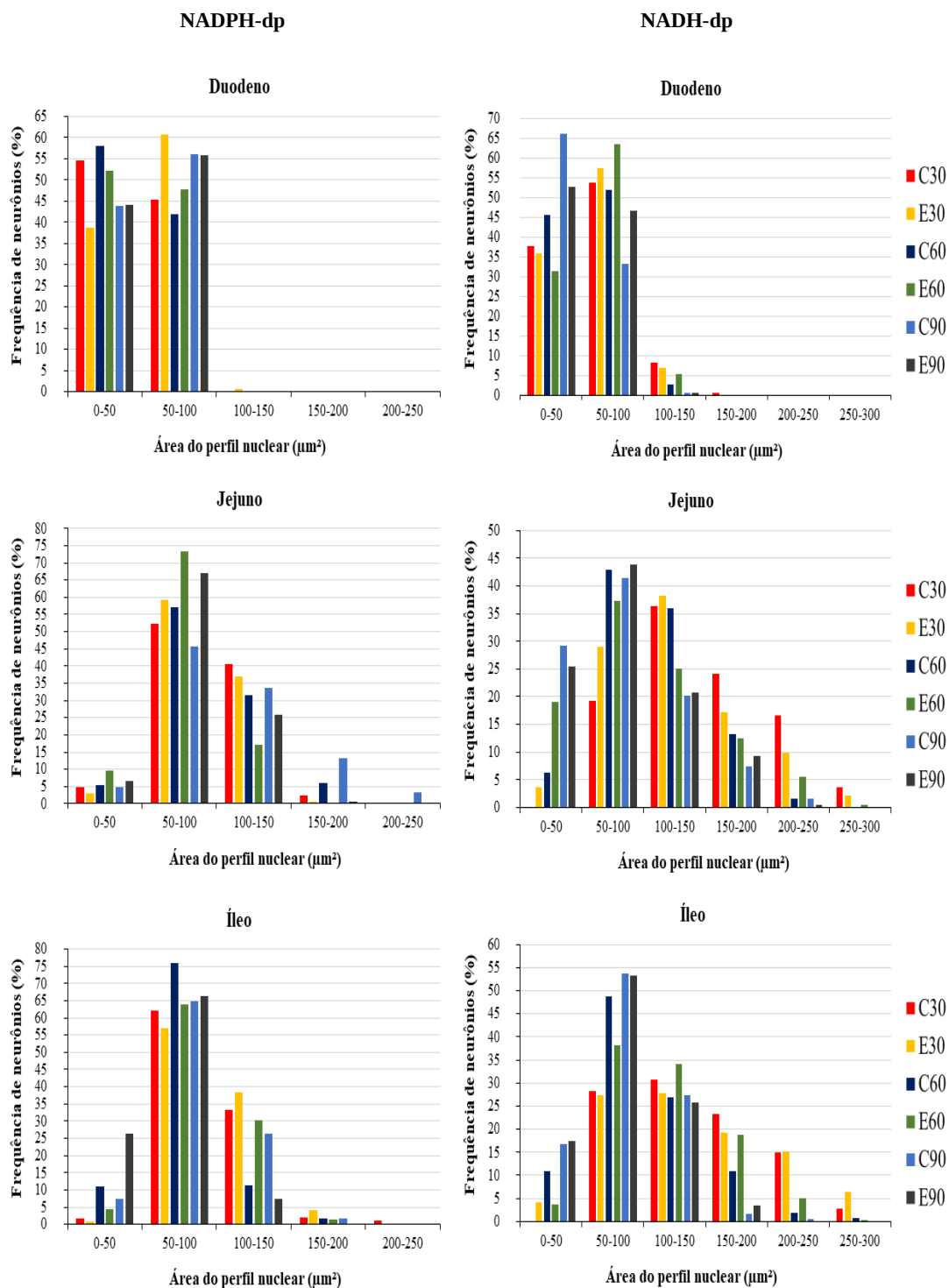


Figura 15. Histograma de frequência da área do perfil nuclear (PN) dos neurônios mioentéricos do intestino delgado da subpopulação nitrérgica (NADPH-dp) e da subpopulação metabolicamente ativa (NADH-dp). Animais controle (C) e experimental (E) nos diferentes períodos de infecção (30, 60 e 90).

5. DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral é uma doença sistêmica por acometer diversos órgãos. Quando atinge o TGI é possível observar a ocorrência de formas amastigotas no intestino dos hospedeiros (LUZ *et al.*, 2010; TOPLU; AYDOGAN, 2011; SAMIULLAH *et al.*, 2013; MENDONÇA, 2017). Animais infectados com *L. (L.) chagasi* sofrem com diversas alterações morfofisiológicas no intestino devido a presença do parasita no músculo liso, mucosa, submucosa, lâmina própria e parede intestinal (SILVA *et al.*, 2002; ADAMAMA-MORAITOU *et al.*, 2007; PINTO *et al.* 2011).

Em estudo realizado no intestino delgado de cães, as amastigotas foram encontradas principalmente no ápice das vilosidades (SILVA *et al.*, 2016), assim como observado no presente estudo. As amastigotas foram encontradas em todo o intestino delgado dos animais infectados desde o período agudo, onde foram observados aumento da carga parasitária de acordo com o aumento do período de infecção, como observado no baço e no fígado desses animais. No jejuno e íleo foram encontradas as maiores concentrações de amastigotas, podendo ser explicado pelo fato de essas regiões do intestino possuírem maiores concentrações de células imunes inatas e as Placas de Peyer (PINTO *et al.*, 2013; MATTEOLI *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2016).

Sabe-se que o plexo mioentérico altera sua plasticidade durante diversos processos que possam causar algum estresse, como envelhecimento, dieta, medicamentos e até mesmo doenças. A mudança da plasticidade do plexo altera o funcionamento dos neurônios com o intuito de manter a homeostase do organismo. As alterações no plexo mioentérico provocam mudanças de código químico, na densidade e área celular dos neurônios, assim como também na estrutura da rede nervosa (MEYER *et al.*, 2007; ROMANO *et al.*, 2010; SANT'ANA *et al.*, 2017).

De acordo com a literatura, infecções causadas por protozoários que atingem o TGI alteram os neurônios mioentéricos de forma direta ou indireta (SUGAUARA *et al.*, 2008; ODORIZZI *et al.*, 2010; HERMES-ULIANA *et al.*, 2011).

Estudos realizados com *Toxoplasma gondii* em ratos relataram aumento na densidade de neurônios mioentéricos nitrérgicos durante o período agudo da infecção, assim como foi observado em nosso trabalho no duodeno e jejuno (VICENTINO-VIEIRA *et al.*, 2015; FEREZIN *et al.*, 2017). Entretanto, durante a infecção na fase crônica, foi observado redução na densidade dessa subpopulação neuronal nesses dois segmentos intestinais. O mesmo foi

observado no intestino delgado de ratos e frangos infectados por *T. gondii* e *Salmonella* sp, respectivamente (HERMES-ULIANA *et al.*, 2011; DO AMARAL *et al.*, 2017). Diferente do ocorrido nos trabalhos citados anteriormente, em que a redução na densidade neuronal ocorreu pela baixa carga parasitária no organismo, em nosso trabalho a redução na densidade provavelmente ocorreu pelo estabelecimento do órgão, já que o aumento na produção de NO é uma reação mais comum durante os períodos agudos de infecções.

O íleo apresentou redução na densidade dos neurônios mioentéricos nitrérgicos durante o período intermediário da infecção seguido de aumento no período crônico, diferente do observado nos outros segmentos intestinais. Esse achado pode estar relacionado ao aumento da carga parasitária nesse segmento intestinal. Outros estudos, sobre as infecções por *T. gondii* e por *Trypanosoma. cruzi* no intestino ratos, relatam que o parasitismo provoca aumento na densidade dos neurônios nitrérgicos em resposta ao aumento das atividades do sistema imunológico (IANTORNO *et al.*, 2007; HALLIEZ; BURET, 2015; SCHNEIDER *et al.*, 2018). O íleo é a região do intestino que possui maior quantidade de Placas de Peyer, portanto as ações do sistema imunológico nessa região são maiores. A liberação de citocinas inflamatórias contribuem para a amplificação da inflamação tecidual interferindo na musculatura local (SUGAUARA *et al.*, 2009).

Quando o organismo sofre com interferências indiretas do parasitismo, o sistema imunológico aumenta a quantidade de citocinas liberadas para combater o parasita, contudo, essa ação promove aumento na densidade de neurônios do SNE que passam a expressar NO. Isso ocorre porque os neurônios que utilizam desse neurotransmissor se protegem das ações do sistema imunológico durante a infecção parasitária, se tornando menos vulneráveis a morte e mantendo a homeostase do intestino (COWEN *et al.*, 2000; HERMES-ULIANA *et al.*, 2011; PHILLIPS *et al.*, 2003; ARANTES, *et al.*, 2004; CHANDRASEKHARAN; SRINIVASAN, 2007; NISHIKAWA *et al.*, 2007).

Portanto o aumento na densidade de neurônios nitrérgicos observados desse estudo, pode estar relacionado ao aumento de citocinas liberadas por células do sistema imune no organismo. O aumento na densidade de neurônios que expressam NO também é um indicativo de que parte dos neurônios que não expressavam esse neurotransmissor passam a produzir em respostas às citocinas liberadas, assim como já foi observado em trabalhos realizados com suínos infectados por *T. gondii* (ODORIZZI *et al.*, 2010).

Ao analisarmos os neurônios mioentéricos da subpopulação metabolicamente ativa, observamos que todos os segmentos intestinais apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) durante o período agudo da infecção. Esse aumento foi seguido de redução ($p < 0,05$) no

período crônico nos segmentos intestinais jejuno e íleo. Corroborando com nossos resultados, trabalhos com infecções parasitárias por *T. gondii* e *T. cruzi* no intestino de ratos e porcos, também apresentaram redução dessa subpopulação neuronal, na fase crônica da infecção (HERMES-ULIANA, 2011; VICENTINO-VIEIRA *et al.*, 2015; SCHNEIDER *et al.*, 2016)

A técnica histoquímica NADH-d utilizada para marcação dos neurônios metabolicamente ativos, se baseia na oxi-redução catalisada pela enzima mitocondrial, assim, evidenciando os neurônios com maior atividade celular. Portanto, estudos sugerem que a redução de neurônios metabolicamente ativos, em condições em que o organismo sofre com infecções causadas por protozoários, afeta negativamente o funcionamento mitocondrial dos neurônios, levando a baixa atividade celular (PEREIRA *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2014). Em nossos resultados observamos que o aumento da inflamação decorrente do período crônico de infecção, alterou o metabolismo dos neurônios mioentéricos.

As alterações na densidade dos neurônios do plexo mioentérico observados nesse estudo, mostram a plasticidade neuronal perante a infecção causada por *L. (L.) chagasi*, indicando que houve alteração fenotípica em parte dos neurônios para manter o funcionamento do organismo. A alteração fenotípica dos neurônios se dá pela mudança de código químico. O mesmo já foi observado em trabalhos similares, indicando que as infecções causadas por protozoários promovem alterações nos neurônios do plexo mioentérico por ações diretas e indiretas (ARAÚJO *et al.*, 2015; BRAGA-SILVA *et al.*, 2016; GÓIS *et al.*, 2016; PAVANELLI *et al.*, 2018).

A colocalização nos neurônios mioentéricos, já ocorreram diante de diversas situações, como no avanço da idade e até mesmo em condições experimentais. Isso acontece quando há alterações no código químico dos neurônios com a finalidade de promover um rearranjo entre neurônios remanescentes que assumem as funções de neurônios perdidos, refletindo em aumento compensatório de subpopulações neuronais (CSERNI *et al.*, 2007; BECK *et al.*, 2009). Alterações no código químico para expressão de neurotransmissores foram também observadas em casos de colite ulcerativa (NEUNLIST *et al.*, 2003), indicando uma resposta regenerativa do plexo mioentérico nos casos de infecção (SCHNEIDER *et al.*, 2001).

Os neurônios mioentéricos nitrérgicos do duodeno apresentaram hipertrofia ($p < 0,05$) durante os períodos agudo e intermediário. Nossos resultados mostram a alta taxa de produção de NO pelos neurônios nesses períodos de infecção. Quando ocorre o aumento do perfil neuronal, juntamente com o aumento na densidade é um indicativo de que a infecção parasitária está causando alterações em grande parte dos neurônios do plexo mioentérico (ARAÚJO *et al.*, 2015).

Nossos resultados para o íleo indicam que houve aumento de perfil neuronal nos períodos agudo e intermediário. Na infecção crônica os neurônios apresentaram atrofia do perfil neuronal, assim como também foi observado no jejuno em todos os períodos experimentais. Hermes-Uliana *et al.* (2011) também relataram atrofia dos neurônios mioentéricos nitrérgicos no jejuno de ratos com infecção parasitária por *T. gondii*. Alterações na morfologia dos neurônios indicam o processo de adaptação neuronal às necessidades do organismo (MARINO *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2010). A atrofia dos neurônios observados em nosso estudo pode ser explicada pelo fato de que a densidade dessa subpopulação neuronal estava maior no período crônico, portanto não havendo necessidade de maior produção de NO pela célula nervosa (IANTORNO *et al.*, 2007).

A tentativa de modulação neuronal é refletida na morfologia dessas células, como consequência se dá o aumento na densidade de neurônios de tamanhos menores. Neurônios nitrérgicos tendem a reduzir o tamanho com o avanço da infecção parasitária, como observado também em infecções causadas por *T. cruzi* (MAIFRINO *et al.*, 1999).

Na análise dos neurônios mioentéricos metabolicamente ativos observamos que no duodeno houve hipertrofia ($p < 0,05$) neuronal nos períodos intermediário e crônico. O jejuno, apresentou atrofia ($p < 0,05$) nos períodos agudo e intermediário, e hipertrofia ($p < 0,05$) no período crônico. O aumento no tamanho dos neurônios mioentéricos metabolicamente ativos, está relacionado à maior atividade celular, muitas vezes para compensar a perda da densidade neuronal. Quando há redução na densidade ocorre um aumento no tamanho neuronal para que seja compensada a perda dos neurônios, como observado por Pereira *et al.* (2010) no intestino de ratos com *T. gondii*.

Podemos observar que a infecção parasitária causada por *L. chagasi* atinge principalmente os neurônios mioentéricos nitrérgicos do jejuno e íleo quanto maior é o período de infecção, porém, em todos os segmentos intestinais foi possível observar que os neurônios apresentam redução em seu perfil quanto maior o período de infecção em ambas as técnicas de evidenciação neuronal.

Diversos trabalhos já observaram alterações na morfologia dos neurônios em resposta a diferentes infecção, como infecções virais (BIELEFELDT-OHMANN *et al.*, 2008), bacterianas (LUCERO *et al.*, 2012) e parasitárias (PARLOG *et al.*, 2015; GÓIS *et al.*, 2016). Porém, a atividade imunológica também induz a redução da área do perfil neuronal como já observado em estudos por Pollard (2006) e Vicentino-Vieira (2015), indicando que as respostas imunológicas diante das infecções no organismo, levam a alterações na plasticidade dos neurônios do plexo mioentérico.

Nossos resultados mostram que o parasitismo causado pelo protozoário da espécie *L. (L.) chagasi* promove alterações nos neurônios do plexo mioentérico do intestino delgado provavelmente pelas ações indiretas das células imunes. O aumento na liberação de citocinas e mediadores químicos para combater o parasitismo interferem no plexo mioentérico para manter a homeostase do intestino (BORGES *et al.*, 2000; BALEMBA *et al.*, 2001; BAUER, 2008). Em estudo realizado pela infecção crônica de *T. gondii* via intraperitoneal, também foi observado que os neurônios mioentéricos apresentaram alterações decorrentes das ações do sistema imunológico do intestino (SILVA *et al.*, 2011).

Assim, podemos considerar que o parasitismo atingiu o SNE por meio de ações do sistema imunológico do órgão que provocaram alterações morfológicas no plexo mioentérico do intestino delgado, caracterizando a plasticidade neuronal.

Contudo, novos trabalhos que incluam a observação de alterações na morfologia e fisiologia do intestino, como também a relação entre o sistema imune e os neurônios do plexo mioentéricos perante a infecção por *L. (L.) chagasi*, são necessários para contribuir com a compreensão sobre as alterações neuronais e fisiológicas do intestino.

6. CONCLUSÃO

Podemos concluir que a infecção parasitária causada pelo protozoário *Leishmania chagasi* causa alterações morfoquantitativas nos neurônios mioentéricos nitrérgicos e metabolicamente ativos nas fases agudas e crônicas da infecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMAMA-MORAITOU, K.K. et al. Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with: *Leishmania infantum* a prospective study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 76(1): 53-57, 2007.
- AKHOUNDI, M. et al. A historical overview of the classification, evolution and dispersion of leishmania parasites and sandflies. **PLOS- Neglected Tropical Diseases**, 10(6): e0004349, 2016,
- 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. **Caderno Saúde Pública**, 30(8):1639-1653, 2014.
- ALMEIDA-LEITE, C.M.; SILVA, I.C.C.; GALVÃO, L.M.C.; ARANTES, R.M.E. Sympathetic glial cells and macrophages develop different responses to *Trypanosoma cruzi* infection or lipopolysaccharide stimulation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 109: 459–465, 2014.
- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, 57: 1-88, 2004.
- ARANTES, R.M. et al. Interferon- γ -induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi* infected mice. **American Journal of Pathology**, 164(4): 1361-1368, 2004.
- ARAÚJO, E.J.A. et al. *Toxoplasma gondii* causes death and plastic alteration in the jejunal myenteric plexus. **World Journal Gastroenterology**, 21: 4829–4839, 2015.
- AZEVEDO, E. M. R. et al. Estudo da leishmaniose visceral canina no município de Goiânia, Goiás, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, 40(2): 159-168, 2011.
- BAI, J. et al. Octreotide modulates the expression of somatostatin receptor subtypes in inflamed rat jejunum induced by *Cryptosporidium parvum*. **PloS One**, 13(3): e0194058, 2018.

- 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**, 25(3): 397-407, 2011.
- BALEMBA, O. B., SEMUGURUKA, W. D., HAY-SCHMIDT, A., JOHANSEN, M. V.; DANTZER, V. Vasoactive intestinal peptide and substance P-like immunoreactivities in the enteric nervous system of the pig correlate with the severity of pathological changes induced by *Schistosoma japonicum*. **International journal for parasitology**, 31(13), 1503-1514, 2001.
- BARBOSA, B.J.P.; ARAÚJO, E.J.A.; SILVA, A.V.; SANT'ANA, D.M.G. Atrofia neuronal mientérica no íleo de ratos infectados cronicamente por uma cepa genótipo I de *Toxoplasma gondii*. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umurama, 12: 101-108, 2009.
- BAUER, A. J. Mentation on the immunological modulation of gastrointestinal motility. **Neurogastroenterology & Motility**, 20: 81-90, 2008.
- BECK, M.; SCHLABRAKOWSKI, A.; SCHRÖDL, F.; NEUHUBER, W.; BREHMER, A. Chat and nos in human myenteric neurons: co-existence and co-absence. **Cell Tissue Research**, 338(1): 37-51, 2009.
- BELO, V.S. et al. Risk factors for adverse prognosis and death in American Visceral Leishmaniasis: a meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 8(7): 2982, 2014.
- BHATIA, V.; TANDON, R.K. Stress and the gastrointestinal tract. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 20: 332-339, 2005.
- BIELEFELDT-OHMANN, H. et al. Transplacental infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus types 1b and 2: viral spread and molecular neuropathology. **Journal Comp Pathology**, 138: 72–85, 2008.
- BLAVIER, A. et al. Atypical forms of canine leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, 162(2): 108-120, 2001.

- BOELAERT, M. et al. The poorest of the poor: a poverty appraisal of households affected by visceral leishmaniasis in Bihar, India. **Tropical medicine & international health**, 14(6): 639-644, 2009.
- BORGES, J. et al. *Shistosoma mansoni* infection causing diffuse enteric inflammation and damage of the enteric nervous system I the mouse small intestine. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**, 12: 431-440, 2000.
- BRAGA-SILVA, C.F. et al. Biotherapeutic of *Toxoplasma gondii* reduces parasite load, improves experimental infection, protects myenteric neurons and modulates the immune response in mice with toxoplasmosis. **European Journal of Integrative Medicine**, 8: 865–874, 2016.
- BRASIL. Lei nº 1.271 de 6 de junho de 2014. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências. Brasília, DF. 2014.
- BROOKES, S.; COSTA, M. Chapter 21 - Functional Histoanatomy of the Enteric Nervous System. *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Fourth Edition)*, eds L. Johnson, K. Barret, J. L. Merchant, H. Said, and J. Wood (Burlington: Academic Press), p. 577–602, 2006.
- BURMESTER, T.; HANKELN, T. What is the function of neuroglobin? **Journal of Experimental Biology**, 212(10): 1423-1428, 2009.
- BURNS, A.J.; ROBERTS, R.R.; BORNSTEIN, J.C.; YOUNG, H.M. Development of the enteric nervous system and its role in intestinal motility during fetal and early postnatal stages. **Seminars in Pediatric Surgery**, 8(4): 196-205, 2009.
- BUZONI-GATEL, D.; WERTS, C. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. **Trends and Parasitology**, 22(10): 448-52. 2006.
- CAMARGO, J.B.; TRONCARELLI, M.Z.; RIBEIRO, M.G.; LANGONI, H. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle, Brasil. **Clínica Veterinária**, 12(71): 86-92, 2007.

- CARDIM, M.F.M. et al. Introdução e expansão da Leishmaniose visceral americana em humanos no estado de São Paulo, 1999-2011. **Revista de Saúde Pública**, 47(4): 691-700, 2013.
- CHANDRASEKHARAN, B.; SRINIVASAN, S. Diabetes and the enteric nervous system. **Neurogastroenterology & Motility**, 19(12): 951–960, 2007.
- CHETIA, M.; DAS, R. Efeito da (-) - epicatequina, um flavonóide sobre a atividade NO e NOS de *Raillietina echinobothrida*. **Acta tropica**, 178: 311-317, 2018.
- CHIAPELLA, A. Diagnosis and management of chronic colitis in the dogs and cat. In: Kirk R. Current Veterinary Therapy: **IX Small Animal Practice**. Philadelphia: W.B. Saunders: 896-993, 1986
- COSTA, J.M.L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Gazeta Medica da Bahia**, 75(1): 3-17, 2005.
- COWEN, T. et al. Restricted diet rescues rat enteric motor neurones from age related cell death. **Gut**, 47(5): 653-660, 2000.
- CSERNI, T.; PARAN, S.; PURI, P. The effect of age on colocalization of acetylcholinesterase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase staining in enteric neurons in an experimental model. **Journal of Pediatric Surgery**, 42(2): 300-304, 2007.
- DANTAS-TORRES, F. et al. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**, Oxford, 28(12): 531-538, 2012.
- DE JONGE, W.J. Mast cells in intestinal inflammation, barrier function, and postoperative motility. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, 53(2): 56–57, 2011.
- DE QUEIROZ, N.M. et al. Detection of *Leishmania* (L.) *chagasi* in canine skin. **Veterinary Parasitology**, 178(1-2): 1-8, 2011.
- DI MUCCIO, T. et al. Epidemiology of imported leishmaniasis in Italy: implications for a European endemic country. **PLOS One**, 10(6): e0129418, 2015.

- DIAS, R.C.F. et al. Occurrence of anti-Leishmania spp. antibodies in domiciled dogs from the city of Foz do Iguaçu, state of Paraná, Brazil. In: **Fifth World Congress on Leishmaniasis**, Paraná, Brazil, 826, 2013.
- DIAS, R.S.; ZAGARINO JR, S.; COSTA, B.B.F.; LEME, F.A.A. As habitações subnormais na Baixada Santista e seus reflexos à saúde. **Intraciência Revista Científica**, ed. 14, 2017.
- DO AMARAL, P.F.G.P. et al. Salmonella Heidelberg reduces nitrergic neurons in the myenteric plexus of the duodenum of broilers. **African Journal of Microbiology Research**, 11(33): 1315-1320, 2017.
- FARIA, A.R.; ANDRADE, H.M. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica Saúde**, 3(2): 47-57, 2012
- FASANO, A.; SHEA-DONOHUE, T. Mechanisms of disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, 2: 416–422, 2005.
- FEREZIN, R.I. et al. Different inoculum loads of *Toxoplasma gondii* induce reduction of myenteric neurons of the rat colon. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 26(1): 47-53, 2017.
- FIGUEIREDO, F.B. et al. Leishmaniose Visceral Canina: dois casos autóctones no município de Florianópolis, estado de Santa Catarina. **Acta Scientiae Veterinariae**, 40(1): 4-7, 2012.
- FIORAVANTI, C. Um parasita chega às metrópoles: dificuldades de diagnósticos e clima mais quente facilitam avanço da leishmaniose visceral rumo a grandes centros urbanos. **Revista Pesquisa FAPESP: Saúde Pública**, 268: 41-43, 2018.
- FURLAN, MBG. Epidemia de leishmaniose visceral no Município de Campo Grande-MS, 2002 a 2006. **Epidemiologia e Serviços Saúde**, 19(1): 15–24, 2010.
- FURNESS, J.B. et al. The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. **Microbial endocrinology: The microbiota-gut-brain axis in health and disease**, p 39-71, 2014.

- FURNESS, J.B. The organisation of the autonomic nervous system: peripheral connections. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 130(1): 1-5, 2006.
- FURNESS, J.B. The enteric nervous system: normal functions and enteric neuropathies. *Neurogastroenterology & Motility*, 20(1): 32-38, 2008
- GODOI, N.F.C.; BITTENCOURT, L.H.F.B.; ANDRADE, A.C.S.; PICOLOTTO, G.C.G.P. & MARCHAN, P.R.A.C. Prevalência de anticorpos anti-Leishmania infantum em felinos domésticos frequentadores de clínicas e hospitais veterinários da cidade de Cascavel, Paraná, Brasil. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, Umuarama, 19(1): 11-16, 2016.
- GÓIS, M.B, et al. Chronic infection with *Toxoplasma gondii* induces death of submucosal enteric neurons and damage in the colonic mucosa of rats. *Experimental Parasitology*, 164: 56–63, 2016.
- GONZALEZ, C. et al. Climate change and risk of leishmaniasis in north america: predictions from ecological niche models of vector and reservoir species. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4, e585, 2010.
- GRAMICCIA, M. Avanços recentes na leishmaniose em animais de estimação: epidemiologia, diagnóstico e profilaxia anti-vetorial. *Parasitologia veterinária*, 181(1): 23-30, 2011.
- HALLIEZ, M.C.M.; BURET, A.G. Gastrointestinal Parasites and the Neural Control of Gut Functions. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9: 452, 2015.
- HERMES-ULIANA, C. et al. Chronicinfection with *Toxoplasma gondii* causes myenteric neuroplasticity of the jejunum in rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 160: 3–8, 2011.
- HOTEZ, P.J.; FUJIWARA, R.T. Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card. *Microbes and Infection*, 16(8): 601–606, 2014.
- IANTORNO, G . et al. The enteric nervous system in chiasmic and idiopathic megacolon. *The American Journal of Surgical Pathology*, 31(3): 460-8, 2007.
- JABARI. S. et al. Partial, selective survial of nitergic in chagasic megacolon. *Histochemistry and Cell Biology*, 135: 47-57, 2011.

- KABOURIDIS, P.S.; PACHNIS, V. Emerging roles of gut microbiota and the immune system in the development of the enteric nervous system. **The Journal of clinical investigation**, 125(3): 956-964, 2015.
- KAGNOFF, M. F. Immunology of the digestive system. **Physiology of the gastrointestinal tract**, 2: 1699-1728, 1987.
- KEITA, A.V.; SÖDERHOLM, J.D. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. **Neurogastroenterology & Motility**, 22: 718-733, 2010.
- KUNZE, W.A.A.; FURNESS, J.B. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. **Annual Review of Physiology**, 61: 117-142, 1999.
- LAZARI, P. et al. Leishmania chagasi in dogs from the city of Jaciara, Mato Grosso, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, 46(2): 315-317, 2016.
- LEITCH, G. J.; HE, Q. Cryptosporidiosis-an overview. **Journal of Biomedical Research**, 25: 1-16, 2012.
- LI, Z. et al. Essential Roles of Enteric Neuronal Serotonin in Gastrointestinal Motility and the Development/Survival of Enteric Dopaminergic Neurons. **Journal of Neuroscience**, 31: 8998-9009, 2011.
- LUCERO, M.S.; MIRARCHI, F.; GOLDSTEIN, J.; SILBERSTEIN, C. Intraperitoneal administration of Shiga toxin 2 induced neuronal alterations and reduced the expression levels of aquaporin 1 and aquaporin 4 in rat brain. **Microbial Pathogenesis**, 53: 87-94, 2012.
- LUZ, K.G. Avaliação das alterações imunohistológicas da mucosa do intestino delgado em pacientes portadores da leishmaniose visceral. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2005.
- MACDONALD, T.T.; MONTELEONE, G. Immunity, Inflammation, and Allergy in the Gut. **Science**, 307: 1920-1925, 2005.
- MAIFRINO, L.B.M.; LIBERT, E.A.; WATANABE, S.; SOUZA, R.R. Morphometry and acetylcholinesterase activity of the myenteric neurons of the mouse colon in the chronic phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 60(5): 721-725, 1999.

- MALAFIA, G. Leishmaniose visceral e desnutrição: uma relação ainda muito negligenciada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 43(4): 478-9, 2010.
- MARTNEZ CUESTA, M.A. et al. Nitric oxide modulates the acute increase of gastrointestinal transit induced by endotoxin in rats: a possible role for tachykinins. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 49: 988-990, 1997
- MARTINS-MELO, F.R.; RAMOS JR, A.N.; ALENCAR, C.H.; HEUKELBACH, J. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000-2011. **Bulletin of the World Health Organization**, 94(2): 103-110, 2016.
- MARTINS-MELO, F.R. et al. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Acta tropica**, 130: 167-174, 2014.
- MATTEOLI, G. et al. A distinct vagal anti-inflammatory pathway modulates intestinal muscularis resident macrophages independent of the spleen. **Gut**, 63(6): 938-948, 2014.
- MATSUMOTO, P.S.S.; LIMA, J.; CASAGRANDE, B. Leishmaniose visceral no Estado de São Paulo: aplicações cartográficas e estatísticas. **Hygeia**, 9(17): 195-203, 2013.
- MAWE, G.M. Colitis-induced neuroplasticity disrupts motility in the inflamed and post-inflamed colon. **The Journal of clinical investigation**, 125(3): 949-955, 2015.
- MCCOLE, D.F.; BARRETT, K.E. Varied role of the gut epithelium in mucosal homeostasis. **Current Opinion Gastroenterology**, 23: 647–654, 2007.
- MCKAY, D.M.; FAIRWEATHER, I. A role for the Enteric Nervous System in the response to helminth infections. **Parasitology Today**, 13(2): 63-69, 1994.
- MENDONÇA, D.B.D. Análise do microbioma de bactérias de luz intestinal de hamsteres e sua correlação com LPS circulante, decorrente da translocação microbiana na leishmaniose visceral experimental. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2017.
- MEYER, I.F.; KANESHIMA, E.N.; SOUZA-KANESHIMA, A.N. Alterações no Sistema digestivo desencadeadas pelo quadro infeccioso do *Trypanosoma cruzi*. **CESUMAR**, 8(1): 11-23, 2007.

- MONTEIRO, C.C. O papel da microbiota intestinal na competencia vetorial do *Lutzomyia longipalpis* para a *Leishmania (leishmania) infantum chagasi* e a transmissão do parasito ao vertebrado pela picada. Dissertação de Mestrado. Belo Horizonte, 2012.
- MOREIRA, N.M. et al. Physical exercise protects myenteric neurons and reduces parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. **Experimental Parasitology**, 141: 68 – 74, 2014.
- MS, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose visceral. **Guia de Vigilância em Saúde**, Brasília, 547-568, 2014.
- NASCIMENTO, R. D. et al. Characterization of enteroglia cells and denervation process in chagasic patients with and without megaesophagus. **Human Pathology**, 41: 528–534, 2010.
- NAKAJIMA, W. et al. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. **Journal of Neuroscience**, 20(21): 7994-8004, 2000.
- NEUNLIST, M. et al. Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. **Gut**, 52: 84- 90, 2003.
- NIJHUIS, L.E.; OLIVIER, B.J.; DE JONGE, W.J. Neurogenic regulation of dendritic cells in the intestine. **Biochemical Pharmacology**, 80: 2002–2008, 2010.
- NISHIKAWA, Y. et al. *Toxoplasma gondii* infection induces apoptosis in noninfected macrophages: role of nitric oxide and other soluble factors. **Parasite Immunology**, 29(7): 375-385, 2007.
- NOGUEIRA-PAIVA, N.C. et al. Myenteric plexus is differentially affected by infection with distinct *Trypanosoma cruzi* strains in Beagle dogs. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, 109: 51 – 60, 2014.
- ODA, J.Y. et al. Myenteric neuroprotective role of aspirin in acute and chronic experimental infections with *Trypanosoma cruzi*. **Neurogastroenterology & Motility**, 29(10): 1-13, 2017.

- ODORIZZI, L. Quantitative and morphometric changes of subpopulations of myenteric neurons in swines with toxoplasmosis. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, 155(1): 68-72, 2010.
- OLIVEIRA, A.L. et al. Emergent outbreak of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 39(5): 446-50, 2006.
- OLIVEIRA, A.M. Estudo da expansão da Leishmaniose visceral no estado de São Paulo e de fatores intervenientes. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2016.
- OLIVEIRA, G.C. et al. Antibodies to *Leishmania* spp. in domestic felines. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, 24(4): 464-470, 2015.
- OPAS, ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE. Encuentro sobre vigilancia, prevención y control de leishmaniasis visceral (LV) en el Cono Sur de Sudamérica. Foz do Iguazú, Brasil. 2012.
- OPAS, ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE; WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. **Informe epidemiológico nas Américas**, Washington, n.5, 2017.
- PALUS, K.; BULC, M.; CAŁKA, J. Alterações na imunorreatividade semelhante à somatostatina nos neurônios simpáticos, projetando-se para a área pré-pilórica do estômago porcino induzida por condições patológicas selecionadas. **Pesquisa BioMed internacional**, 2017.
- PARK, M.Y. et al. Nitric oxide-induced apoptosis of human dental pulp cells is mediated by the mitochondria-dependent pathway Korean. **Journal of Physiology and Pharmacology**, 18: 25-32, 2014.
- PARLOG, A.; SCHLÜTER, D.; DUNAY, I.R. Alterações neuronais induzidas por *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunology**, 37: 159–170, 2015.
- PAULA, A.; DE SOUZA, L.; TEIXEIRA, M.C. Estudo retrospectivo da epidemiologia da leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul: revisão de literatura. **Veterinária em Foco**, 11(2): 112–8, 2014.

- PAVANELLI, M.F. et al. Assemblages A and B of *Giardia duodenalis* reduce enteric glial cells in the small intestine in mice. **Parasitology Research**, p. 1-9, 2018.
- PAVANELLI, W.R. et al. The effects of nitric oxide on the immune response during giardiasis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 14: 606–612, 2010.
- PEREIRA, L.S.; SILVA, A.V.; ARAÚJO, E.J.A.; SANT'ANA, D.M.G. Hypertrophy of NADH-diaphorase positive myenteric neurons in rat jejunum after acute infection caused by *Toxoplasma gondii*. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, 16: 298–310, 2010.
- PEREIRA, S.R.; MARTINS, M.B.M.; MARTINS, B. Fatores associados à ocorrência de Leishmaniose visceral em crianças de um hospital especializado de Feira de Santana -BA. **UNISC**, 2011
- PHILLIPS, R. J.; KIEFFER, E. J.; POWLEY, T. L. Aging of the myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, 106: 69-83, 2003.
- PINTO, A.J.W.; FIGUEIREDO, M.M.; FERREIRA, R.A.; CALIARI, M.V.; TAFURI, W.L. Unusual Small Intestine inflammatory Lesions in a dog with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, 6(1): 19-25, 2013.
- PINTO, A.J.W. et al. Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 53(1): 67, 2011.
- POLLARD, T.D.; EARNSHAW, W.C. Biologia Celular. **Elsevier**, Rio de Janeiro. p.753-775, 2006.
- QUEIROZ, M.J., et al. Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area. **The Journal of Pediatrics**, 80(2): 141-146, 2004.
- QUEIROZ, S. Dona de casa perde dois filhos, em três meses, por leishmaniose: Caso aconteceu em Guarujá; doença é transmitida por meio da picada de um mosquito. Disponível em: <<http://www.tribuna.com.br>>. Acesso em: 25 de novembro, 2016.
- REIS, L.L.; BALIEIRO, A.A.S.; FONSECA, F.R.; GONÇALVES, M.J.F. Mudanças na epidemiologia da leishmaniose visceral no Brasil de 2001 a 2014. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 50(5): 638-645, 2017.

- ROMANO, E.B.; NATALI, M.R.M.; LEITE, J.C.; CAMPOS, L.B.; BERALDI, E.J. Análise morfológica dos neurônios NADH-diaforase positivo do jejuno de ratos wistar em diferentes idades. **Revista Saúde e Pesquisa**, 3(1): 65-70, 2010.
- ROSTAGNO, M.H. Can Stress in Farm Animals Increase food Safety Risk? **Foodborne Pathogens Disease**, 6(7): 767-776, 2009.
- SAMIULLAH, S.; DINNEEN, H.S.; KLEIN, K.M.; DEMYEN, M. Endoscop appearance of duodenal mucosa in GI leishmaniasis. **Gastrointestinal Endoscopy**, 78(6): 962-963, 2013.
- SANT'ANA, D.M.G. et al. Acute infection with an avirulent strain of *Toxoplasma gondii* causes decreasing and atrophy of nitrergic myenteric neurons of rats. **Acta Histochemica**, 119(4): 423-427, 2017.
- SCHNEIDER, J. et al. Neurotransmitter coding of enteric neurons in the submucous plexus is changed in non-inflamed rectum of patients with Crohn's disease. **Neurogastroenterology and Motility**, 13: 255-264, 2001.
- SCHNEIDER, L.C.L. et al. *Toxoplasma gondii* promotes changes in VIP ergic submucosal neurons, mucosal intraepithelial lymphocytes, and goblet cells during acute infection in the ileum of rats. **Neurogastroenterology & Motility**, 30(5): e13264, 2018.
- SCHNEIDER, L.C.L.; ARAÚJO, S.M.; BUTTOW, N.C. *Trypanosoma cruzi* (Cepa CL) promove perda neuronal no Plexo Mioentérico do Cólon de ratos. **Revista Saúde e Pesquisa**, 9(2): 235-242, 2016.
- SEVÁ, A.D. et al. Risk analysis and prediction of visceral leishmaniasis dispersion in São Paulo State, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 11(2): e0005353, 2017.
- SILVA, D.T. et al. Correlation study and histopathological description of intestinal alterations in dogs infected with *Leishmania infantum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 25(1): 24-36, 2016.
- SILVA, F.L.; TAFURI, W.L.; OLIVEIRA, M.R.; TAFURI, W.L. Histopathological and immunohistochemical study of the gastrointestinal tract from a dog naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: a case report. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 54(4): 340-344, 2002.

- SILVA, L.S. et al. *Toxoplasma gondii*: Myenteric neurons of intraperitoneally inoculated rats show quantitative and morphometric alterations. **Experimental Parasitology**, 129(1): 5-10, 2011.
- SILVA, R.A. et al. Effectiveness of dog collars impregnated with 4% deltamethrin in controlling visceral leishmaniasis in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, 113(5): e170377, 2018.
- SILVA, R.A.; SANTOS, F.K.M.; SOUSA, L.C.; RANGEL, E.F.; BEVILAQUA, C.M.L. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei* in an endemic area for visceral leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 23(3): 320-327, 2014.
- STEINDEL, M. et al. Outbreak of autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina, Brazil. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33(4): 490–6, 2013.
- SUGAUARA, E.Y.Y. et al. Alterations of the myenteric plexus of the ileum and the descending colon caused by *Toxoplasma gondii* (genotype III). **Arquivos de Neuropsiquiatria**, 66(3A): 516-523, 2008.
- SUGAUARA, E.Y.Y.; SANT'ANA, D.M.G.; SILVA, A.V.; SOUZA, E.A.; ARAÚJO, E.J.A. Hypertrophy of the neurons in the ileum of rats infected with cysts of *Toxoplasma gondii* (genotype II). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, 31(2): 195-201, 2009.
- TEN BOKUM, A.M.; HOFLAND, L.J.; VAN HAGEN, P.M. Somatostatin and somatostatin receptors in the immune system: a review. **European Cytokine Network**, 11: 161–176, 2000.
- TIRONI, L.M.T. et al. Toxoplasmic Infection-induced Injury in the Ileal Myenteric Plexus in Rats Depends on the Dose of *Toxoplasma gondii* Oocysts. **Journal of Morphological Sciences**, 35(1): 80-86, 2018.
- TONINI, M.A.L. et al. First description of autochthonous canine visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Vitória, State of Espírito Santo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 6, p. 754-756, 2012.

- TOPLU, N.; AYDOGAN, A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniosis. **Parasitology Research**, 109(4): 1051-1057, 2011.
- TURNER, J.R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, 9: 799–809, 2009.
- VICENTINO-VIEIRA, S.L. et al. Oral dependent-dose toxoplasmic infection model induced by oocysts in rats: Myenteric plexus and jejunal wall changes. **Experimental parasitology**, v.156, p. 12-18, 2015.
- VILLALOBOS-HERNÁNDEZ, E.C. et al. Cholinergic signaling plasticity maintains viscerosensory responses during *Aspiculuris tetraptera* infection in mice small intestine. **Autonomic Neuroscience**, 206: 8-18, 2017.
- WERNECK, G.L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, 26(4): 644-645, 2010.
- WERNECK, G.L. Geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. **Cadernos de Saúde Pública**, 24(12): 2937-2940, 2008.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Vector-borne Diseases. Geneva, 2017.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Health topics: Leishmaniasis, 2015.
- WOOD, J.D. Chapter 23 - Cellular Neurophysiology of Enteric Neurons. **Physiology of the Gastrointestinal Tract (Fourth Edition)**, p. 629-669, 2012.
- YOO, B.B; MAZMANIAN, S.K. The enteric network: interactions between the immune and nervous system of the gut. **Immunity**, 46(6): 910-926, 2017.
- ZHAO, A. et al. Contribution of 5-HT_{2A} receptor in nematode infection-induced murine intestinal smooth muscle hyper contractility. **Gastroenterology**, 131: 568–578, 2006.