



RELAÇÃO DA NOCICEPÇÃO COM A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM ANIMAIS INFECTADOS COM *LEISHMANIA* (*LEISHMANIA*) *AMAZONENSIS*

Isabella Harumi Yonehara Noma (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Valéria Medrado Pereira, Marian Sayuri Sanuki, Sérgio Marques Borghi, Waldiceu Aparecido Verri Junior, Paula Karoline Sfordi da Silva, Thaís Gomes Verzignassi Silveira (Co-orientador), Sandra Mara Alessi Aristides (Orientador) e-mail: smaaristides@gmail.com

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

Ciências Biológicas, Imunologia Celular.

Palavras-chave: *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, dor, camundongos, leishmaniose tegumentar americana.

Resumo

A leishmaniose tegumentar americana, considerada negligenciada é endêmica em muitos países, inclusive no Brasil. A doença é caracterizada por úlceras e pode ser curada espontaneamente ou apresentar metástases graves e multilantes na mucosa. As lesões geralmente progridem para ulcerações na ausência de dor, sugerindo que a infecção interfere com a percepção de dor. Nesse projeto avaliamos o limiar de dor com doses crescentes do parasito utilizando o anesthesiômetro eletrônico e o edema de pata nas lesões induzidas pela inoculação do parasito medido semanalmente com ajuda de um pletismômetro e com um paquímetro. Os resultados mostraram aumento na formação de edema que foi proporcional ao aumento da concentração do parasito, como também aumento na intensidade da dor. Avaliamos também a produção de óxido nítrico nas lesões da pata dos animais inoculadas com o parasito, porém os resultados preliminares se mostraram negativos. Como conclusão avaliamos que a formação de edema é acompanhada pelo aumento de dor, porém a produção de óxido nítrico não estaria relacionada com a dor e o edema.





Introdução

As leishmanioses são doenças de vasta distribuição, porém negligenciadas. Os protozoários *Leishmania* podem produzir diversas formas clínicas, como a leishmaniose tegumentar americana (LTA). Esta é caracterizada por úlceras de fundo granuloso e bordas salientes com possibilidade de autocicatrização e cura espontânea ou apresentar metástases graves e multilantes da mucosa. As lesões geralmente progridem para ulcerações na ausência de dor, porém a hiperalgesia também foi relatada em humanos e camundongos. Embora existam publicações que relatam a infecção de camundongos com *L. amazonensis* e *L. major* (espécies que causam leishmaniose cutânea), pouco é conhecido sobre a infecção com *L. amazonensis* e sua relação com a nocicepção. A importância do óxido nítrico (NO) está bem descrita no controle de leishmaniose, desse modo, este trabalho objetivou estudar os mecanismos de nocicepção induzida pela *Leishmania amazonensis* em camundongos BALB/c pela análise do limiar de dor, formação de edema na pata e papel do NO nestes animais.

Materiais e métodos

Os experimentos foram realizados utilizando-se camundongos isogênicos da linhagem BALB/c machos de 25 a 30 g. Foram utilizados cinco animais por grupo experimental com ambiente controlado. A *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) utilizada foi isolada de hamsters infectados experimentalmente e cultivados em meio 199 contendo L-glutamina, soro bovino fetal, 1% de urina humana e antibióticos a 25°C. Foram usados parasitos na fase estacionária de crescimento.

Foram inoculados subcutaneamente com 10^2 a 10^8 promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em 40 µL de PBS, na pata direita traseira (coxim plantar ou dorsal) dos camundongos. Na pata esquerda, contralateral, foi inoculado o mesmo volume de PBS. Após a inoculação do parasito no dorso das patas dos camundongos, foi medido o edema. Esta medida foi feita utilizando pletismômetro e paquímetro.

Os parasitos foram inoculados subcutaneamente no coxim plantar da pata direita do camundongo. Um grupo controle, sem inoculação do parasito, foi utilizado. A avaliação da resposta hipernociceptiva foi feita na Universidade Estadual de Londrina. A técnica consiste em induzir um reflexo da pata através de uma pressão exercida por uma ponteira de polipropileno acoplada a um transdutor de força que mede a pressão exercida. Os animais





foram testados antes e depois da formação da lesão. Os camundongos foram sacrificados após os tempos determinados da inoculação do parasito. Os tecidos das patas foram removidos para quantificação do NO pelo método colorimétrico baseado na reação de Griess e a absorbância lida em 540 nm.

O protocolo dos experimentos foi aprovado junto à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (Parecer 004/2015-CEUA) e da Universidade Estadual de Londrina (Parecer 140/2015).

Os resultados foram expressos como média, mais ou menos o desvio padrão da média (SEM). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguidos pelo teste de Tukey's. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significante.

Resultados e Discussão

Na figura 1 está o resultado da medida do aumento no volume da pata infectada com o parasito subtraído do volume da pata contralateral. Na figura 2 está demonstrado o resultado da espessura da pata com a ajuda de um paquímetro.

É possível observar nos resultados do pletismômetro e do paquímetro que durante as primeiras semanas não houve um aumento no tamanho das patas infectadas, representando que ainda não havia sido formado o edema. Já nas patas infectadas com uma concentração maior do parasito, formam edema mais rápido e maiores, comparados com as concentrações menores.

Na figura 3 mostra que na primeira semana da infecção a medida da hiperalgesia foi baixa. O tamanho da lesão foi proporcional à dor medida. O grupo controle não teve aumento de dor, a partir do grupo 10^3 verificou-se um aumento na intensidade da dor, mostrando que quanto maior o número de parasito inoculado, maior a intensidade da dor ao longo das semanas. Em concentrações maiores, nas 8ª e 9ª semanas houve diminuição da sensibilidade a dor, o que poderia ser explicado pela destruição de terminações nervosas no local.

Os resultados obtidos em um primeiro experimento não nos permitiram concluir pela necessária presença do NO para a formação do edema e da hipernocicepção, devido não se mostrarem presentes durante os experimentos.



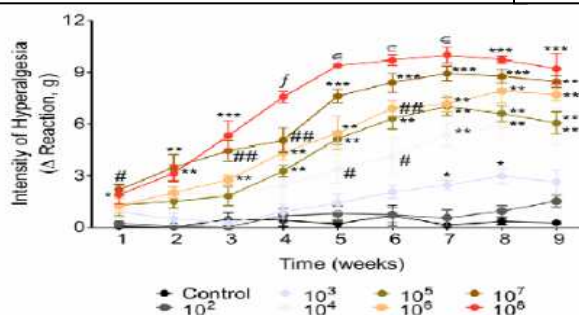
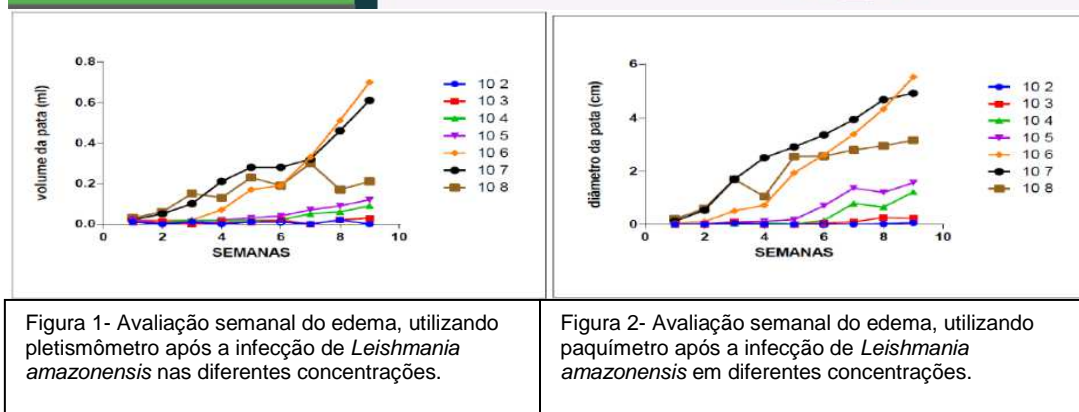


Figura 3- Hiperalgesia mecânica induzida por *L. (L.) amazonensis* com concentrações entre 10^2 e 10^8 /mL.

Conclusões

Concluiu-se que quanto maior a concentração do parasito, maior o tamanho da lesão e do edema e também pelo aumento da sensação de dor. Porém, a produção de óxido nítrico não estaria relacionada com a dor e o edema, necessitando-se repetir o experimento.

Agradecimentos

Ao PIBIC/CNPq/UEM pelo apoio financeiro

Referências

Gontijo B., Carvalho M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.36, p. 71-80, 2003.

Sotiropoulos, G., Wilbur, B. Clinical communications: two cases of cutaneous leishmaniasis presenting to the emergency department as chronic ulcers. J. Emerg. Med., v. 20, p. 353–356, 2001.

