

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E
FISIOPATOLOGIA

AMANDA GUBERT ALVES DOS SANTOS

O íleo como alvo no estudo da infecção por diferentes cepas de
Leishmania (Viannia) braziliensis

AMANDA GUBERT ALVES DOS SANTOS

O íleo como alvo no estudo da infecção por diferentes cepas de
Leishmania (Viannia) braziliensis

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biociências e Fisiopatologia
Área de concentração: Biociências e Fisiopatologia Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof.^a Dr.^a Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo
Coorientador: Prof.^a Dr.^a Debora de Mello Gonçalves Sant’Ana

Maringá
2022

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

S237i

Santos, Amanda Gubert Alves dos

O íleo como alvo no estudo da infecção por diferentes cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* / Amanda Gubert Alves dos Santos. -- Maringá, PR, 2022.
86 f.: il. color., figs., tabs., maps.

Orientadora: Profa. Dra. Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo.

Coorientadora: Profa. Dra. Debora de Mello Gonçalves Sant'Ana.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia (PBF), 2022.

1. Leishmaniose. 2. Reação inflamatória. 3. Intestino Delgado. 4. Sistema nervoso entérico. 5. Histologia. I. Melo, Gessilda de Alcantara Nogueira de, orient. II. Sant'Ana, Debora de Mello Gonçalves, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia (PBF). IV. Título.

CDD 23.ed. 616.9

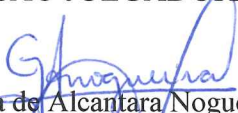
FOLHA DE APROVAÇÃO

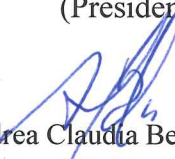
Amanda Gubert Alves dos Santos

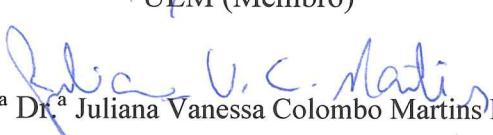
“O íleo como alvo no estudo da infecção crônica por diferentes cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*,

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biociências e Fisiopatologia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA


Prof.^a Dr.^a Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo
Universidade Estadual de Maringá
(Presidente)


Prof.^a Dr.^a Andrea Claudia Bekner da Silva Fernandes
UEM (Membro)


Prof.^a Dr.^a Juliana Vanessa Colombo Martins Perles
UEM (Membro)

Prof. Dr. Marcelo Biondaro Gois
UFR (Membro)
Participação remota

Prof. Dr. Marcel Ivan Ramirez Araya
FIOCRUZ/UFPR (Membro)
Participação remota

Aprovada em: 19 de abril de 2022

Local de Defesa: Anfiteatro do bloco T20, sala 112B - Universidade Estadual de Maringá

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos
que, de alguma forma,
contribuíram para sua
realização e para a minha
formação acadêmica e
profissional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por se fazer presente de formas inesperadas na minha vida. Agradeço especialmente por ter colocado pessoas incríveis na minha vida, que tanto me auxiliaram nesta jornada.

Agradeço a minha família, mãe, pai, irmão, padrasto, tio, avós e primos pela compreensão e apoio. Mesmo a distância, se fazem presentes e sei que estão ao meu lado. Especialmente à minha mãe, que sempre foi minha maior incentivadora, exemplo de mulher forte e resiliente que trabalhou muito para me dar um dos meus bens mais preciosos, a minha educação.

Ao meu namorado, Lincoln, que me ajudou de tantas formas que não consigo enumerar. Obrigada por ser meu companheiro, amigo, confidente e por acreditar em mim até quando eu mesma duvidava. Por estar sempre ao meu lado, nos momentos bons e ruins, por se fazer presente mesmo que a distância. E obrigada por compartilhar comigo a sua família, minha sogra Solange, seus avós e tios, que sempre me acolheram e me tornaram parte da família.

Agradeço a minha orientadora, professora Gessilda pelos mais de 9 anos de trabalho em conjunto. Pela confiança depositada em mim e pelas oportunidades de crescimento pessoal e profissional. Obrigada por acreditar em mim e não me deixar desistir mesmo quando as adversidades surgiam. Agradeço imensamente pelos ensinamentos, pelo apoio, incentivo e pelos desafios. Espero um dia representar para os meus alunos o que você representa para mim.

A minha coorientadora, professora Debora, por ser um exemplo de professora, pesquisadora e de divulgadora do conhecimento científico. Obrigada por todos os ensinamentos e oportunidades nestes anos.

Ao grupo de Neurogastroenterologia, onde fiz amigos e que sem o apoio e trabalho em conjunto nada disso teria sido possível. Um agradecimento especial à Lainy, Maria Gabriela e Erick pela colaboração direta neste trabalho e a Aline Aguiar, Aline Trevizan, Andressa, Beatriz, Carla, Carolina, Claudia, Cinthia, Cristiany, Henrique, Kita Jaqueline, Jéssica, Júlia, Marcelo, Maria, Maiara, Sabrina, Stéfani, Tâmila, e todos os demais que em algum momento participaram desta jornada.

Agradeço a família da Parasitologia Clínica: Andrea, Eneide, Isabel e Terezinha, que desde o momento em que entrei no laboratório me acolheram e fizeram com que o laboratório se tornasse uma segunda casa. Em especial à Andrea, pelo apoio com o desenvolvimento do trabalho e pela amizade, por todas as conversas, desabafos e conselhos.

Aos meus amigos da vida e da graduação Angela, Bárbara, Bruna, Mateus e Jan. Obrigada pelas conversas, risadas, incentivo e apoio nestes anos. Mais que amigos, tenho vocês como irmãos.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, em especial a Lu, que muito além de secretária, se tornou uma amiga, obrigada pelas conversas, risadas, apoio e conselhos. À Vania que vem conduzindo a secretaria e que já esteve presente em vários momentos importantes. Por fim, a coordenação por todas as oportunidades de crescimento pessoal e profissional e ao conselho acadêmico que fiz parte nos últimos anos por todo o aprendizado.

Agradeço à Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade de realizar minha graduação, mestrado e doutorado em uma instituição pública de ensino, de qualidade reconhecida internacionalmente, apesar de todos os problemas enfrentados. Aqui, nós não aprendemos apenas questões técnicas, e sim como ser um profissional humano e um cientista resiliente. Tenho muito orgulho em ser UEM.

Agradeço a todos os mestres que tive ao longo da minha vida acadêmica, desde o ensino básico, médio, superior e pós-graduação. Cada um de vocês contribuiu de alguma forma para eu chegar onde estou hoje. Sempre tive muito respeito e admiração por esta profissão, que hoje também exerço com orgulho.

Aos membros da banca por aceitarem o convite de participar deste momento. Agradeço pelas sugestões que, com certeza, contribuirão com o trabalho.

Por fim, agradeço a Amanda de 17 anos por ter tomado a decisão de enfrentar os desafios do desconhecido e de um dia para o outro mudar o curso da sua (minha) vida.

EPÍGRAFE

“Afinal, aquilo que amamos, sempre será parte de nós.”

Harry Potter

O íleo como alvo no estudo da infecção por diferentes cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*

RESUMO

A espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a principal espécie causadora de leishmaniose no Brasil e na América Latina como um todo, sendo responsável pelas formas cutânea e mucocutânea da doença. *L. (V.) braziliensis* apresenta um grande polimorfismo genético que, juntamente com fatores intrínsecos ao hospedeiro, está relacionado com a diversidade de formas clínicas da infecção. Em infecções experimentais com *L. (V.) braziliensis*, foi relatada a presença do parasito e alterações morfológicas em órgãos como baço, linfonodos, fígado e o intestino. No intestino, mais especificamente no íleo, foram observadas diversas alterações morfológicas, sugestivas de inflamação. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros ainda não explorados no íleo de hamsters infectadas por diferentes cepas de *L. (V.) braziliensis* que apresentaram respostas distintas ao tratamento no paciente humano. Os resultados foram apresentados em dois artigos: O primeiro, intitulado “*A New Target Organ of Leishmania (Viannia) braziliensis Chronic Infection: The Intestine*” foi publicado no periódico *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* e relatou o encontro de alterações morfológicas, bioquímicas e inflamatórias no íleo de hamsters infectados por 3 cepas de *L. (V.) braziliensis*, uma cepa padrão e dois isolados de pacientes. Este, foi o primeiro estudo a demonstrar alterações no Sistema Nervoso Entérico durante a infecção por esta espécie, comprovar que as alterações intestinais são dependentes da cepa e do tempo de infecção. O segundo artigo, intitulado “A infecção crônica por *Leishmania (Viannia) braziliensis* afeta a morfologia e o sistema nervoso entérico do íleo de hamsters” avaliou a infecção pelas duas cepas estudadas anteriormente, as quais o DNA foi detectado no íleo e linfonodo mesentérico. Neste, foram encontradas alterações intestinais marcadamente distintas entre a infecção pelas cepas, com redução da população neuronal do plexo mientérico, da área do corpo dos neurônios do plexo submucoso e da área imunomarcada pelo peptídeo intestinal vasoativo. Nos dois trabalhos foram utilizados testes estatísticos buscando a comparação entre os grupos e tempos de infecção. A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que, no modelo experimental utilizado, a infecção por *L. (V.) braziliensis* causa diversas alterações morfológicas, bioquímicas e em componentes do Sistema Nervoso Entérico no íleo de hamsters.

Palavras-chave: Leishmaniose; Intestino Delgado; Sistema Nervoso Entérico; Reação inflamatória; Histologia.

The ileum as a target in the study of infection by different strains of *Leishmania (Viannia) braziliensis*

ABSTRACT

Leishmania (Viannia) braziliensis is the main species causing leishmaniasis in Brazil and Latin America. It is responsible for the cutaneous and mucocutaneous forms of the disease and presents a large genetic polymorphism that, together with intrinsic host factors, is related to the diversity of clinical forms of infection. Experimental infections with *L. (V.) braziliensis* demonstrated the presence of the parasite and morphological changes in organs such as spleen, lymph nodes, liver and intestine. In the intestine, more specifically in the ileum, several morphological changes were observed. Therefore, the aim of this study was to evaluate parameters not yet explored in the ileum of hamsters infected by different strains of *L. (V.) braziliensis* that showed different responses to treatment in human patients. The results were presented in two articles: The first, entitled “A New Target Organ of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Chronic Infection: The Intestine” was published in the journal *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* and reported the finding of morphological, biochemical and inflammatory changes in the ileum of hamsters infected by 3 strains of *L. (V.) braziliensis*, a standard strain and two isolates from patients. This was the first study to demonstrate changes in the Enteric Nervous System during infection by this species, proving that intestinal changes are dependent on the strain and time of infection. The second article, entitled “Chronic *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection affects the morphology and enteric nervous system of the ileum of hamsters” evaluated the infection with the two strains studied previously. Using the same animals in which DNA of the parasite was detected in the ileum and mesenteric lymph node, we found different intestinal alterations between the infection by the strains. We also observed a reduction in the neuronal population of the myenteric plexus, in the area of the body of the neurons of the submucosal plexus and the area immunomarked by the vasoactive intestinal peptide. In both studies, statistical tests were used to compare groups and infection times. From our results, we conclude that, in the experimental model used, the infection by *L. (V.) braziliensis* causes morphological, biochemical and neuronal alterations in the ileum of hamsters.

Keywords: Leishmaniasis; Small intestine; Enteric Nervous System; Inflammatory reaction; Histology.

Tese elaborada e formatada conforme as normas das publicações científicas *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (artigo 1). Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/about/author-guidelines> e *Biomedical Journal* (artigo 2).

Disponível em:

<https://www.elsevier.com/journals/biomedical-journal/2319-4170/guide-for-authors>

SUMÁRIO

Capítulo I.....	12
As leishmanioses.....	12
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	17
Relação <i>Leishmania</i> spp. e o intestino.....	18
O intestino delgado.....	24
Células encontradas no intestino.....	26
Sistema nervoso entérico.....	29
Justificativa.....	32
Objetivos.....	32
Referências Bibliográficas.....	33
Capítulo II.....	48
Artigo 1.....	48
Artigo 2.....	66
Capítulo III.....	85
Conclusões.....	85
Perspectivas futuras.....	85

CAPÍTULO I

AS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são um conjunto de doenças multifacetadas que apresentam diferentes manifestações clínicas [1] e são causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que pertencem a ordem Trypanosomatida e a família Trypanosomatidae [2]. Este parasito é transmitido para o ser humano ou outros hospedeiros vertebrados através da picada de flebotomíneos fêmeas infectadas [3,4]. As principais formas da doença são a leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea, leishmaniose visceral e leishmaniose dérmica pós-calazar [1], sendo que anualmente, ocorrem de 700 mil a 1 milhão de novos casos no mundo [5].

A leishmaniose visceral, que também é conhecida como calazar, é a forma mais severa da doença, uma vez que afeta órgãos internos como o fígado e o baço, podendo levar a perda de peso, anemia e ao óbito mais de 95% dos indivíduos infectados que não recebem tratamento adequado [5] (Figura 1). No ano de 2020, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 79 países no mundo foram considerados endêmicos. Neste ano, foram reportados à Organização 12.838 novos casos dessa forma da doença. É importante ressaltar que, o Brasil, juntamente com Etiópia, Eritreia, Quênia, Índia e Sudão representaram 79% de todos os casos reportados [6]. Nos últimos 20 anos, aproximadamente 68 mil novos casos de leishmaniose visceral foram reportados no continente Americano [7]. Sendo que apenas no período de 2011 a 2020, aproximadamente 35 mil novos casos ocorreram no Brasil. A região Nordeste foi a mais afetada com 19.210 casos e a região Sul a menos afetada com 109 casos [8]. A leishmaniose dérmica pós-calazar é uma sequela que surge cerca de 6 meses a 1 ano ou mais após a cura da leishmaniose visceral [5]. Nos últimos 5 anos, foram reportados à OMS mais de 7.700 casos no mundo [6]. Essa doença é caracterizada por lesões na pele que afetam geralmente a face, braços, tronco ou outras regiões do corpo [5], sendo considerada como um potencial reservatório da infecção [6].

A leishmaniose cutânea é a mais comumente encontrada [5] e pode ser dividida em outras formas: leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose mucocutânea, leishmaniose cutânea difusa [9] e tegumentar disseminada [10] (Figura 1). Na forma cutânea localizada são observadas lesões ulceradas únicas ou múltiplas, que acometem a pele e podem deixar cicatrizes [10]. A leishmaniose mucocutânea aparece algum tempo após a lesão cutânea primária [10] e causa a destruição total ou parcial das mucosas da região nasofaríngea [5]. Isso ocorre devido a complicações da lesão primária ou da migração hematogênica do parasito [2]. Já a forma difusa, apresenta lesões múltiplas, nodulares e não ulceradas que atingem grande porção da pele devido a um estado de anergia imunológica do paciente e a forma tegumentar disseminada

apresenta várias lesões cutâneas distantes do local da picada, atingindo principalmente a face e o tronco [10].

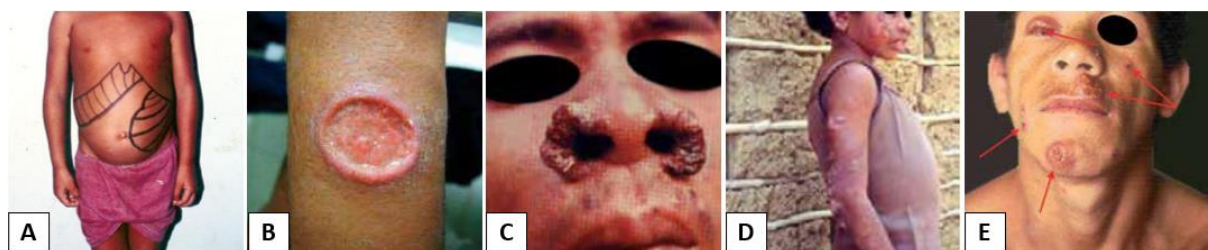


Figura 1. Alterações encontradas nas diferentes formas clínicas da leishmaniose. Podemos observar (A) a hepatoesplenomegalia na leishmaniose visceral e as lesões na (B) leishmaniose cutânea localizada, (C) mucocutânea, (D) difusa e (E) disseminada. Modificado de: Ministério da Saúde, 2014 [11] e Ministério da Saúde, 2017 [10].

Em 2020, foram reportados à OMS 208.356 novos casos de leishmaniose cutânea no mundo, sendo considerados endêmicos para a doença um total de 89 países e novamente, o Brasil figura como um dos que mais apresentou casos, com um total de 16,056 [6]. No período de 2001 a 2020 foram reportados no continente Americano 1.067.759 novos casos de leishmaniose cutânea e mucosa (5), sendo que de 2011 a 2020, o Brasil foi o responsável por aproximadamente 197 mil casos, sendo a região Norte a mais afetada, com mais de 89 mil casos [12]. A região Sul foi novamente a menos afetada, com 3.548 casos, contudo, é importante ressaltar que 92% dos casos foram notificados no Estado do Paraná e a maior concentração de casos (546), foi na 15ª Regional de Saúde de Maringá, seguida pela 13ª Regional de Saúde de Cianorte (526 casos) [12], como pode ser observado na figura 2.

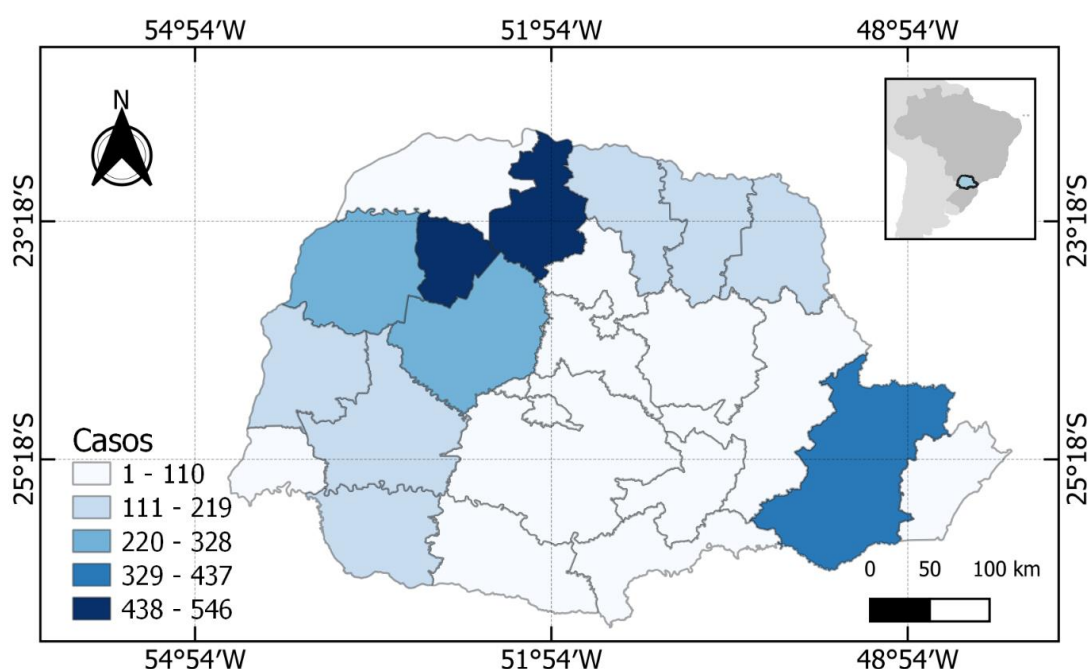


Figura 2. Concentração de casos de leishmaniose cutânea no Estado do Paraná por regionais de saúde no período de 2011 a 2020. Dados extraídos do Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Brasil [12].

O parasito apresenta duas principais formas evolutivas conhecidas como: amastigota, que é a forma encontrada no interior das células mononucleares fagocíticas humanas após a infecção e é a forma infectante para o hospedeiro invertebrado; e a promastigota, que é a forma encontrada no inseto vetor e a responsável pela infecção no hospedeiro vertebrado [2]. A forma promastigota apresenta algumas variações dependendo do estágio do desenvolvimento do parasito no hospedeiro invertebrado. Algumas horas após a infecção, a amastigota ingerida se transforma em promastigota procíclica, que é arredondada, apresenta um flagelo mais curto que o comprimento do corpo [13] e realiza uma intensa multiplicação nas primeiras 24 horas após a infecção do flebotomíneo [14]. A seguir, há a transformação em promastigotas nectomonadas, que são altamente móveis e alongadas [14] e que são encontradas de 60 a 72 horas após a ingestão do parasito, em grandes quantidades na porção anterior do intestino médio do inseto [15]. Esses parasitos então migram para a válvula estomodeu e se transformam nas formas leptomonadas, que apresentam o comprimento corporal menor que o flagelar [16], e posteriormente em promastigotas haptomonadas, que são curtas e largas [17]. Essa forma inicia a secreção de um gel (PSG - gel secretado por promastigotas) que restringe a sua motilidade e que faz com que fiquem aderidas à válvula estomodeu ou umas às outras [18], o que leva à obstrução da válvula, o que pode causar a regurgitação no vetor durante o repasto sanguíneo [17].

O PSG também pode causar depleção local de oxigênio, estimulando a transformação em promastigotas metacíclicas [19], que não se replicam e são mais curtas, altamente ativas possuindo um flagelo de pelo menos duas vezes o comprimento do corpo celular [13,17], e que migram para a proboscídea do inseto para posteriormente serem inoculadas no hospedeiro vertebrado [20]. Mais recentemente, foi relatado que as promastigotas metacíclicas que não são inoculadas em um primeiro repasto sanguíneo são capazes de realizar uma desdiferenciação no flebotomíneo, se transformando em formas semelhantes às leptomonadas, chamadas de retroleptomonadas, que se replicam ativamente, aumentando a população de promastigotas metacíclicas em um segundo repasto sanguíneo, que conseqüentemente terá maior capacidade de transmissão [21,22] (Figura 3).

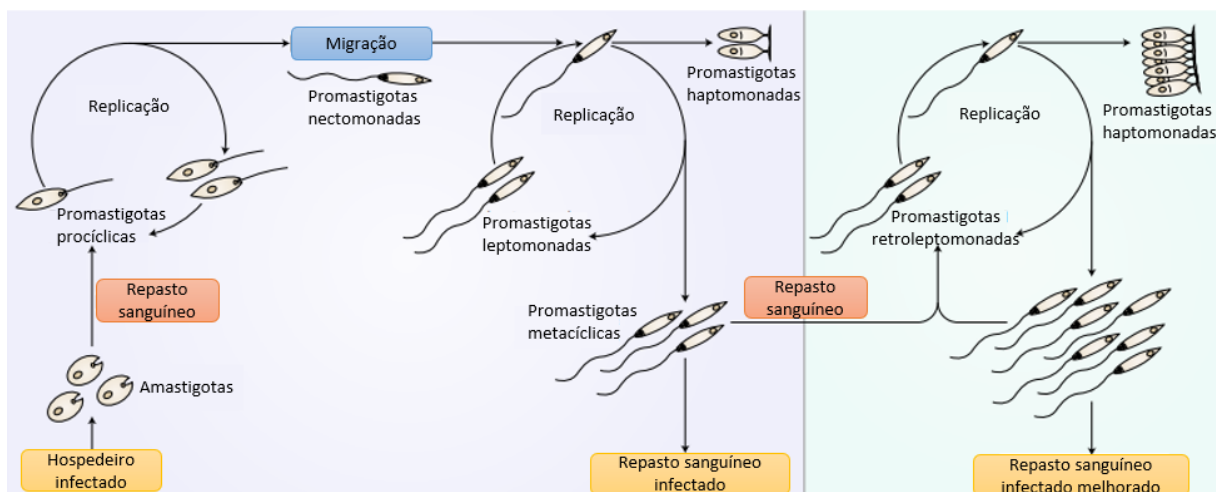


Figura 3. Ciclo de replicação da *Leishmania* no hospedeiro invertebrado. Adaptado de Bates, 2018 [22]

Quando o repasto sanguíneo é realizado, as promastigotas metacíclicas são inoculadas no hospedeiro vertebrado juntamente com o PSG [23] e com a saliva do inseto [24], que possui substâncias que causam desequilíbrio na homeostase tecidual [25] e influenciam as respostas imunológicas do hospedeiro [26], induzindo a infiltração de células inflamatórias [2], a produção de anticorpos [27,28] e modulando a liberação de citocinas pelas células apresentadoras de antígenos [29,30]. Os neutrófilos são as primeiras células imunes a se infiltrar no local de infecção. Essas células liberam armadilhas extracelulares de neutrófilos que são capazes de capturar e matar os parasitos [31]. Contudo, quando infectadas, essas células podem apresentar uma menor ativação [32] e ainda atuar como hospedeiros temporários, uma vez que a *Leishmania* não se transforma em amastigota nem se multiplica em seu interior, mas continua viável [33]. Após a fagocitose do parasito, o neutrófilo infectado produz MIP-1 β , que é capaz de recrutar monócitos para o local da infecção e entra em apoptose, sendo então fagocitado pelos macrófagos e no interior desta célula, a *Leishmania* se transforma em amastigota e se multiplica, podendo dar continuidade ao seu ciclo [33].

Os macrófagos são as células alvo da infecção, uma vez são neles onde o parasito se diferencia e se replica gradualmente até destruir os macrófagos liberando grande número de amastigotas no ambiente extracelular [2]. Isso ocorre porque o parasito é capaz de modular as respostas celulares, como a secreção de citocinas e a geração de óxido nítrico (NO) e das espécies reativas de oxigênio [34]. Além disso, os parasitos acabam sendo opsonizados com IgG no ambiente extracelular o que leva a produção de interleucina-10 (IL-10) quando são fagocitados pelos macrófagos e auxilia no crescimento intracelular do parasito [35] e na suscetibilidade ao desenvolvimento da leishmaniose tegumentar [36]. O ciclo biológico resumido do parasito pode ser observado na Figura 4.

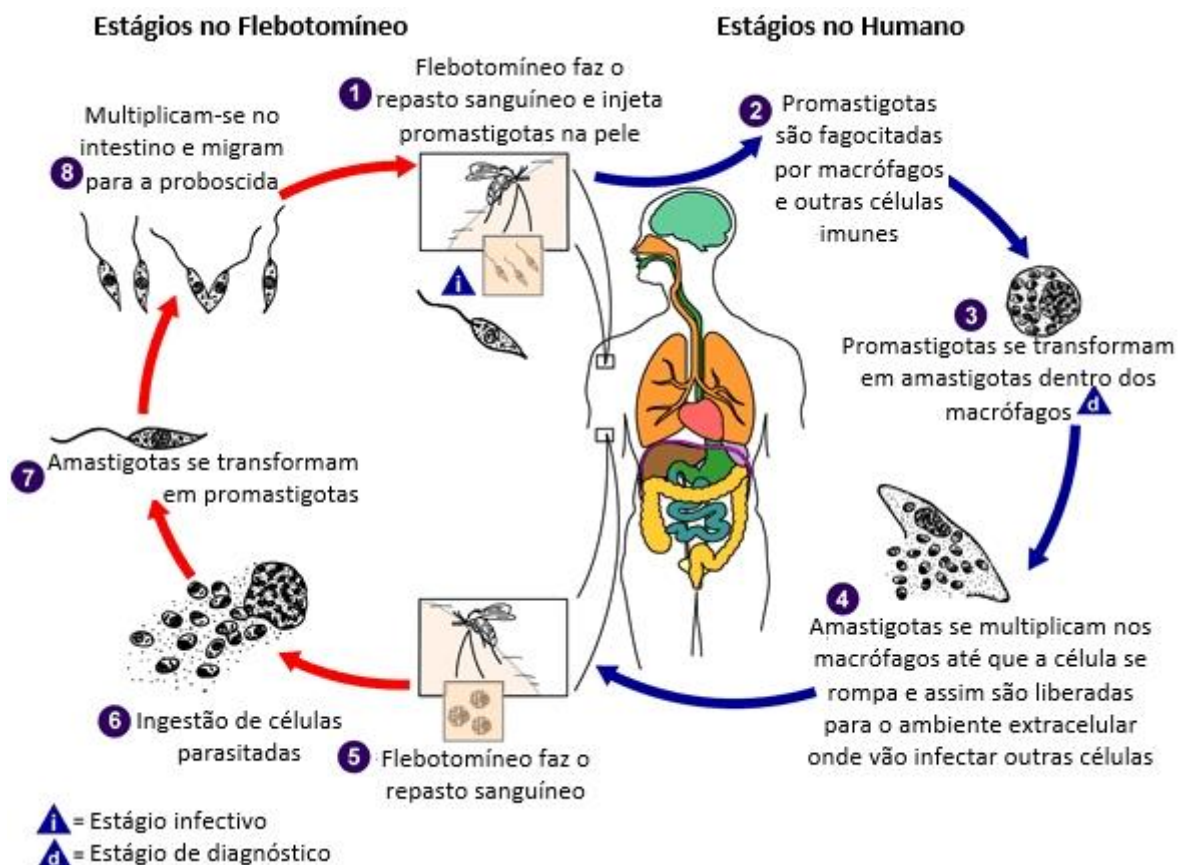


Figura 4. Ciclo da Leishmaniose. A figura representa o ciclo de vida dos protozoários do gênero *Leishmania* desde (1) o repasto sanguíneo do flebotomíneo, onde há a inoculação de formas promastigotas metacíclicas com consequente (2) atração de células imunes para a região e a fagocitose do parasito por macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (3). No interior dos macrófagos há a transformação em amastigota e a (4) replicação sucessiva do parasito, o que lisa a célula e libera as amastigotas para o ambiente extracelular. E a infecção do inseto que (5) durante o repasto sanguíneo (6) ingere células parasitadas com amastigotas, que irão (7) transformar-se em promastigotas e (8) multiplicar-se no intestino até migrar para a proboscida do inseto. Modificado de: Centers for Disease Control and Prevention, 2017 [37].

Essa reação inflamatória no local da infecção é importante para desencadear uma imunidade eficaz específica para *Leishmania* [34], mas também é a responsável pelo desenvolvimento das lesões cutâneas. Ao observar o comportamento dos neutrófilos, foi verificado que nas primeiras horas de infecção, há infiltração no tecido para tentar controlar o parasito, porém uma segunda onda tardia contribui para o aumento da inflamação no local e para a ulceração da lesão e necrose [38], que podem estar relacionadas a atuação dos linfócitos T CD4+, CD8+ e células *natural killer* [39,40]. Uma vez que a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células T CD4+, para aumentar a ativação de macrófagos [39], e a liberação exacerbada de grânulos citotóxicos pelas células T CD8+ e *natural killer* acabam levando a destruição tecidual [39,41]. Por fim, é importante citar que apesar dos mecanismos de defesa do hospedeiro, a *Leishmania* é capaz ainda de persistir nas células mielóides, escapando e modulando a resposta imunológica para aumentar a susceptibilidade do organismo frente a infecção [34].

Existem mais de 20 espécies de *Leishmania* [5], que apresentam diferentes características imunes e patológicas [9,31,42] e a sua distribuição geográfica determina que tipo de doença e manifestações clínicas ocorrem em cada região [43]. A espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a principal espécie causadora de leishmaniose no Brasil e na América Latina como um todo [10].

Leishmania (Viannia) braziliensis

A importância dessa espécie vai da sua ampla distribuição geográfica, uma vez que esta é a única que já foi registrada em todos os estados brasileiros [10] até o desenvolvimento da patologia, já que é a responsável por causar as lesões mais destrutivas [2] e pela maioria dos casos de leishmaniose mucocutânea [10] e disseminada, que afetam, respectivamente, de 3-5% e 2% dos indivíduos infectados [44]. Além disso, a infecção por essa espécie apresenta o tratamento e diagnóstico mais difícil sendo também de difícil manutenção e isolamento em modelos animais e em cultura [44].

A *L. (V.) braziliensis* apresenta um grande polimorfismo genético [45], o que pode estar relacionado com a diversidade de formas clínicas causadas por ela e a virulência do próprio parasito [46–48]. Diferentes cepas dessa espécie de *Leishmania* foram encontradas em uma mesma região, causando formas clínicas [49–51] e respostas terapêuticas diversas [52,53], inclusive em um mesmo paciente [54]. Além da cepa do parasito, outros fatores que influenciam no curso da infecção são relacionados ao parasito, como o inóculo [55,56] e o tempo de infecção [56,57]. E ao hospedeiro, como a sua resposta imunológica [52], estado clínico e fatores genéticos [49]. Sendo que em humanos, já foram descrito o acometimento da região dos olhos [58] e laringe [59], além da detecção do DNA do parasito na medula óssea de pacientes imunocomprometidos [60,61].

Em infecções experimentais com *L. (V.) braziliensis*, foi relatada a presença de amastigotas do parasito no baço, linfonodos [55,62,63] e fígado [64] e o encontro de alterações histopatológicas nesses órgãos [62,65] (Figura 5). É importante ressaltar que os hamsters são considerados bons modelos para o estudo da infecção por esta espécie, já que há o desenvolvimento de resposta inflamatória [55], lesões [62,66], manifestações clínicas e histopatológicas [62,63] semelhantes às observadas na infecção humana. Além disso, em hamsters, foi observado que esses protozoários tem a capacidade de migrar para as vísceras ou outros locais da pele onde continuam viáveis e capazes de se replicar [63].

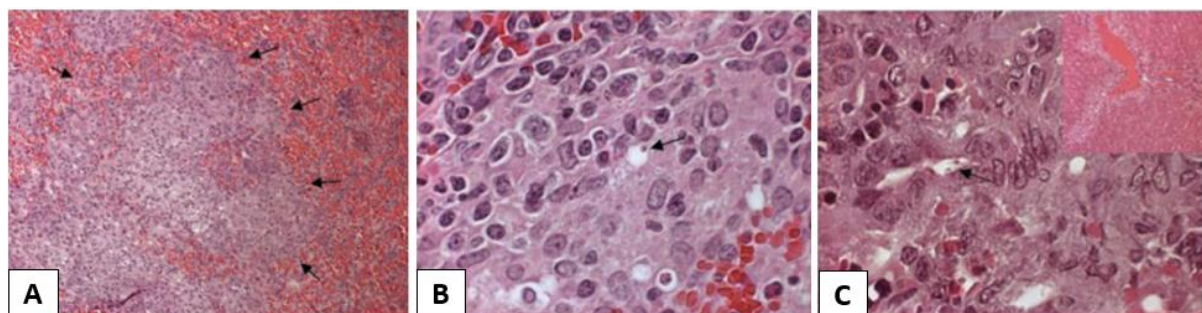


Figura 5. Alterações histoatólogicas e encontro de amastigotas de *L. (V.) braziliensis* no fígado e baço de hamsters. Fotomicrografias demonstram (A) reação granulomatosa, com setas indicando a presença de macrófagos (objetiva de 20x) com (B) amastigotas (seta) em seu interior no baço (objetiva de 100x). E (C) infiltrado inflamatório próximo a área perivascular (destaque, objetiva de 20x) com a presença de amastigotas dentro de macrófagos (seta) no fígado (objetiva de 100x). Modificado de Gomes-Silva, 2013 [62].

Mais recentemente, nosso grupo de pesquisa reportou diversas alterações na arquitetura intestinal de hamsters infectadas cronicamente por diferentes cepas de *L. (V.) braziliensis* (Figura 6, A). Além disso, nos mesmos animais detectamos o DNA do parasito no íleo e linfonodo mesentérico, além de demonstrar a presença de amastigotas no íleo (Figura 6, B) [57]. O que levanta a hipótese de que a disseminação dessa espécie para outros órgãos além da pele pode ser semelhante à disseminação da leishmaniose visceral, onde a migração das células contendo o parasito ocorre primeiramente para os linfonodos próximos ao local da lesão primária, em seguida para linfonodos distantes e outros órgãos como fígado e baço [67]. Enquanto, em nosso trabalho publicado em 2018, verificamos que na infecção por *L. (V.) braziliensis*, há o encontro do parasito no linfonodo poplíteo (Figura 6, C), próximo ao local da infecção, e de seu DNA no linfonodo mesentérico e no íleo [57].

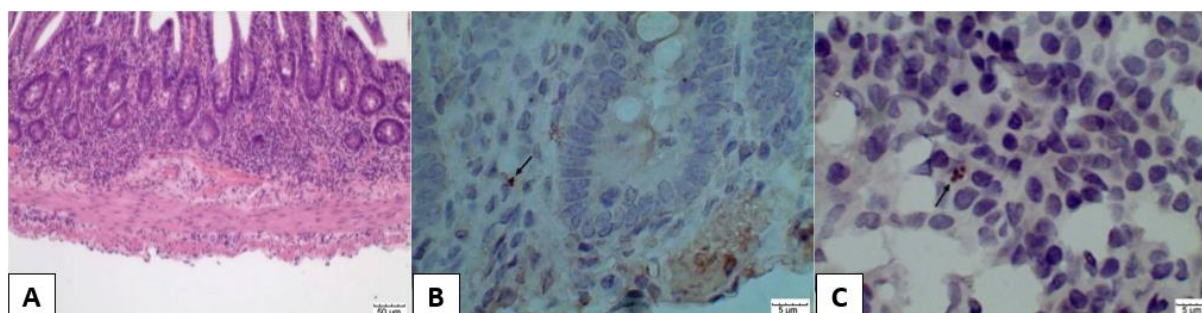


Figura 6. Fotomicrografias do íleo e linfonodo poplíteo de hamsters infectadas por *L. (V.) braziliensis*. Estão representados (A) alterações histopatológicas no íleo e (B) amastigotas de *Leishmania* no íleo e (C) linfonodo poplíteo. Modificado de: Santos, 2018 [57].

RELAÇÃO *Leishmania* spp. E O INTESTINO

O acometimento do sistema digestório durante a forma visceral da leishmaniose em humanos é relatado há pelo menos 40 anos, sendo relatado o encontro do parasito no intestino e má absorção intestinal [68]. A maioria dos casos de acometimento intestinal ocorreu em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida [69–77] ou em indivíduos com algum

tipo de imunocomprometimento, como linfomas [78,79], esplenectomia [80], transplante renal [81] e tratamento imunossupressor devido a doença autoimune [82]. Contudo, alguns casos foram relatados em pacientes imunocompetentes adultos [83–86], em idosos [87] e crianças [88,89].

Dentre os sintomas que envolvem o trato gastrointestinal, os mais frequentes foram a perda de peso [69,73,77,78,80,81,86,87,90], diarreia [71,72,78,82,83,85,86], dor abdominal [72,76,77,80,81,86] e epigástrica [69,72,78], desnutrição [78,90,91] e vômitos [69,77,78], sendo o duodeno o segmento intestinal mais citado nos trabalhos [69,72–78,81,83–89,92,93], provavelmente devido ao método de diagnóstico. Outros trabalhos demonstraram o acometimento dos demais segmentos [68,70,72–74,79,82,83,85,86] e também o envolvimento de outros microrganismos, como *Mycobacterium avium* [76–78]. Um fato observado em diversos trabalhos foi o encontro de parasitos intestinais durante a leishmaniose visceral (com acometimento intestinal ou não) [80,90,91,94]. A presença destes não afetava a gravidade da leishmaniose nem o seu tratamento [94], contudo, estava associada ao quadro de desnutrição [91].

Além do encontro das amastigotas intestinais, algumas alterações histopatológicas foram observadas, contudo, estas alterações variam entre os casos. Por exemplo, em relação aos vilos duodenais, em alguns pacientes se apresentavam com aparência normal [84], achatada [86] ou aumentada [92]. A mucosa intestinal pode ser encontrada sem alterações aparentes [72,75,84], mas em outros pacientes, o intestino estava inflamado [75,86,93] podendo ser também observadas ulcerações [72,85,86]. Em um estudo onde as vilosidades se apresentavam maiores verificou-se que os níveis de macrófagos e linfócitos T CD4 também estavam aumentados, e o número de células expressando interferon- γ (IFN- γ) diminuído nos pacientes com LV [92].

Dentre os modelos animais utilizados no estudo da leishmaniose visceral estão os cães, que são considerados reservatórios naturais da doença e que facilitam a sua dispersão no meio urbano [95–98]. Esses animais podem apresentar sinais clínicos como enterite [99,100], linfadenomegalia, onicogrifose [99,101–103], lesões cutâneas, comprometimento ocular, alopecia [99,102,103], hiperqueratose nasal [99,101,102], diarreia [100,103–105], caquexia [102,103], anemia [103] e dermatite [101]. Um estudo epidemiológico demonstrou que mais de 90% dos cães com leishmaniose visceral apresentavam algum tipo de parasitose intestinal, sendo os mais prevalentes *Ancylostoma caninum*, *Dipylidium caninum* e *Trichuris vulpis*. Contudo não foi encontrada nenhuma correlação entre as infecções pelos parasitos intestinais e a *Leishmania* [106].

Amastigotas de *Leishmania* foram detectadas em todos os segmentos intestinais [99–103,105], principalmente na mucosa intestinal [100,101,105], na submucosa, em todos os segmentos intestinais, e nas camadas musculares no intestino delgado, inclusive no plexo mientérico (Figura 7) [100]. Embora tenha sido encontrada uma correlação positiva em relação a presença do parasito no intestino e o desenvolvimento lesões macroscópicas [101], foi observado que, em animais com altas cargas intestinais de *Leishmania*, não houve desenvolvimento de diarreia ou alterações macroscópicas graves, enquanto aqueles com baixas cargas parasitárias apresentaram enterite hemorrágica [100].

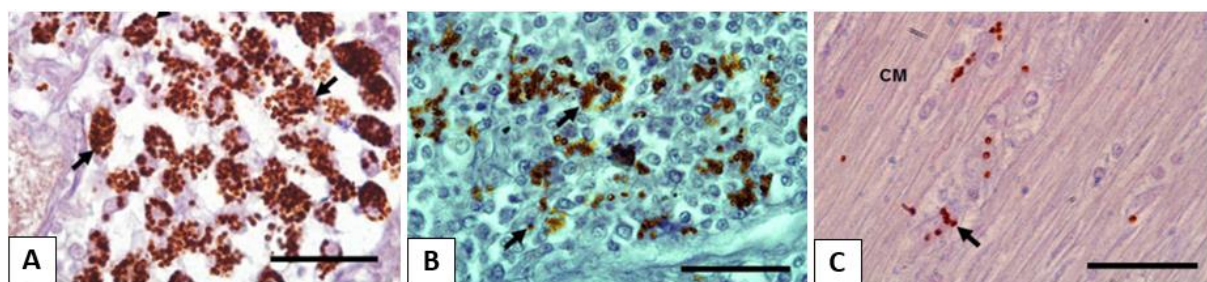


Figura 7. Presença de amastigotas de *Leishmania infantum* no intestino de cães. Foram encontradas amastigotas do parasito (setas) na lâmina própria no (A) ápice dos vilos, (B) nas placas de Peyer, (C) na camada muscular e no interior de gânglios do plexo mientérico. Objetiva de 100x. Modificado de Silva, 2016 [100].

Foram encontrados infiltrados inflamatórios de linfócitos, plasmócitos [102,104] macrófagos [101–104], neutrófilos [101,103,104], eosinófilos [103,104] e mastócitos [103]. A quantificação celular diferiu entre os segmentos intestinais [99,102,103] e de acordo com a presença ou não da *Leishmania* e a sua carga parasitária [103]. Sendo descrito inclusive que aqueles cães cuja presença de amastigotas não foi detectada no intestino apresentaram as maiores contagens de células granulocíticas nos intestinos delgado e grosso [103]. Assim, podemos observar que a resposta imunológica entre os segmentos intestinais frente a leishmaniose visceral difere, por exemplo, no jejuno de cães infectados foi observado maior expressão de receptores CD4, Foxp3 e CD8 e das citocinas IL-10, fator de crescimento transformador β (TGF- β), IFN- γ , fator de necrose tumoral α (TNF- α), enquanto no cólon houve apenas aumento da expressão de IL-4 [99].

Além das alterações imunes, alterações histopatológicas também foram distintas entre os segmentos intestinais e de acordo com a carga parasitária encontrada. Resumidamente, no duodeno foi encontrado edema apical nos vilos, ausência de células epiteliais colunares, desnudamento epitelial, folículos secundários hipertróficos, aumento da submucosa, que apresentava desorganização das fibras conjuntivas e aumento do número de arteríolas. No jejuno, foram encontradas placas de Peyer hipertróficas e no íleo observou-se aumento nos vasos lácteos e a camada epitelial estava integra apesar da grande quantidade de parasitos na

lâmina própria. Por fim, no cólon, foi observado uma reação inflamatória granulomatosa, composta por linfócitos, plasmócitos, macrófagos hipertróficos e células gigantes na submucosa e descontinuidade da muscular da mucosa [100]. Outro trabalho, demonstrou que no cólon havia degeneração epitelial e as criptas intestinais estavam reduzidas em número [104].

Trabalhos com roedores têm sido promissores para avaliar o intestino e as interações com a microbiota e outras parasitoses durante a leishmaniose visceral. São utilizados hamsters, que são mais suscetíveis, considerados um modelo de leishmaniose visceral fatal [107] e que melhor reflete a leishmaniose visceral humana sintomática [108] ou camundongos, que correspondem a um modelo não fatal da doença [107]. Diversos achados foram relatados durante a infecção, como o envolvimento de células B-1 [109], a influência da desnutrição [110], da microbiota intestinal [107,111] e das infecções por outros parasitos [112–114].

Dentre as alterações microscópicas encontradas em hamsters com leishmaniose visceral podemos citar a presença de infiltrados inflamatórios por toda a extensão do intestino, acúmulo de substância amiloide [115] e granulomas de *Leishmania* [116]. No jejuno, foi observado o aumento da altura dos vilos, da profundidade de cripta e da proporção de linfócitos intraepiteliais. Além disso, houve redução das células caliciformes, dos corpos celulares de neurônios mientéricos e na densidade populacional neuronal [117]. No cólon, também foi relatado perda da arquitetura do órgão, com aumento das camadas submucosa e muscular, no número de linfócitos intraepiteliais e na área dos gânglios dos plexos mientérico e submucoso. Essas alterações foram associadas a um infiltrado inflamatório difuso na submucosa, lâmina própria e nas criptas, com redução das células caliciformes e presença de ganglionite [111].

As alterações intestinais que ocorrem na leishmaniose visceral são dependentes de células B-1, uma vez que distintas alterações foram demonstradas em animais deficientes em células B-1 (XID), naqueles deficientes que tiveram a transferência adotiva (XID+B1) e nos animais selvagens infectados. Por exemplo, a altura dos vilos reduziu nos animais XID e aumentou no grupo XID + B1, quando ambos estavam infectados. Outros parâmetros como a espessura das camadas que compõe a parede intestinal, na profundidade e largura das criptas e na quantificação de células de Paneth e caliciformes também demonstraram diferentes perfis de alteração entre os grupos [109].

A desnutrição foi um dos temas abordados por alguns estudos, e apresentou um impacto negativo em órgãos linfoides de camundongos infectados com *Leishmania infantum* [118,119]. No intestino delgado, verificou-se que, nos camundongos desnutridos, houve um agravamento

dos infiltrados inflamatórios, hiperplasia linfoide e redução da expressão de imunoglobulina A e de citocinas da resposta Th17 em relação ao observado nos animais controles [110].

A disbiose intestinal em hamsters durante a leishmaniose visceral, levou a um quadro de perda de peso, com progressão rápida da doença, evoluindo ao óbito após 112-132 dias de infecção, enquanto em camundongos, não foram demonstradas alterações significativas. Um ponto importante é que a infecção intestinal por *Leishmania* foi relatada como uma característica específica da LV progressiva, onde há permeabilidade da barreira intestinal, com translocação de diversas bactérias para o fígado, como *Rodentibacter* que parece contribuir para a progressão fatal da leishmaniose visceral em hamsters [107]. Outro estudo, relatou que pode haver um envolvimento protetor de bactérias como *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp na progressão da leishmaniose visceral [111]. Sendo assim, é notável que mais estudos devem ser realizados para avaliar a influência da microbiota intestinal durante a infecção por *Leishmania*, não apenas em relação ao envolvimento do intestino durante a leishmaniose, mas como uma doença sistêmica.

Em relação a infecção por outros parasitos, um estudo com *Schistosoma mansoni* demonstrou que a infecção por *Leishmania* suprimiu a infecção esquistossomótica, mas houve formação de granulomas e encurtamento e alargamento dos vilos intestinais e alterações em outros órgãos, como fígado e rins [112]. Já na coinfeção com o nematódeo intestinal *Heligmosomoides polygyrus*, foi observado que a leishmaniose visceral não afeta o estabelecimento do *H. polygyrus*, pelo contrário, há uma maior carga desse helminto nos animais coinfectados e uma maior liberação de ovos nas fezes [113]. Por outro lado, a infecção prévia por *H. polygyrus*, acaba modulando a resposta imune de forma a favorecer a leishmaniose visceral. Isso pode ser observado devido ao encontro de maiores cargas parasitárias de *Leishmania donovani* no fígado e no baço, com redução da infiltração de leucócitos e da transcrição de óxido nítrico sintetase no fígado e aumento da transcrição de IL-4 e IL-10 no baço nos animais coinfectados [114].

Os trabalhos envolvendo o estudo da leishmaniose tegumentar e o intestino em humanos avaliaram a relação entre a infecção por *Leishmania* e parasitos intestinais. Os resultados são controversos, uma vez que alguns trabalhos apontam associações entre pacientes com leishmaniose e com helmintos em geral, nematoides e com *Ascaris lumbricoides*, má resposta a terapia, demoraram mais tempo para cicatrizar [120]. E outros não demonstraram associação significativa entre as infecções helmínticas e a carga parasitária de *L. braziliensis* [121].

Em estudos realizados com a espécie *Leishmania major*, que é a responsável pela leishmaniose cutânea nos países do Velho Mundo, foi verificado que uma dieta à base de

aminoácidos durante o desenvolvimento do sistema imunológico, leva a uma produção reduzida de IFN- γ e de NO, que são essenciais contra a infecção pelo protozoário. Além disso, as células dendríticas apresentavam níveis deficientes de moléculas coestimuladoras e foram incapazes de estimular uma resposta Th1 *in vitro* [122]. Em relação à coinfeção com outros parasitos, na infecção secundária com *L. major* após *S. mansoni*, não foram encontrados resultados significativos que poderiam apontar algum tipo de modulação do sistema imune [123].

Nosso grupo de pesquisa foi pioneiro no estudo de infecções por espécies que causam leishmaniose tegumentar e a sua relação direta com o intestino. Um estudo preliminar foi realizado com camundongos após 72h da inoculação peritoneal de *L. (V.) braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. major*. Neste trabalho, foram observadas algumas alterações dependentes da espécie que estava causando a infecção. Resumidamente, foi observado um aumento na proporção de células caliciformes, de linfócitos intraepiteliais e na espessura das camadas mucosa, submucosa e muscular, assim como na altura dos vilos. Por outro lado, as criptas estavam mais estreitas e o número de células de Paneth também foi reduzido após a infecção [124]. A partir deste, notamos a necessidade de realizar experimentos mais próximos daqueles encontrados na literatura.

Sendo assim, o segundo artigo utilizou uma infecção crônica em hamsters, cuja inoculação foi intradérmica na pata traseira e os animais foram mantidos por 90 ou 120 dias após a infecção. Neste trabalho, foram utilizadas duas cepas de *L. (V.) braziliensis* isoladas de pacientes atendidos pelo Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da UEM, que apresentaram diferentes respostas frente ao tratamento contra o parasito. Após o período experimental, foi observado um aumento nas camadas musculares, submucosa, assim como na altura e largura de vilos e profundidade e largura das criptas. Foram encontrados infiltrados inflamatórios nas criptas, mucosa e submucosa além de ganglionite e periganglionite e aumento na proporção de linfócitos intraepiteliais. É importante destacar que este foi o primeiro trabalho a detectar, por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real, o DNA do parasito no íleo e linfonodo mesentérico em ambos os tempos de infecção [57].

O terceiro trabalho já publicado, foi resultante desta tese e relatou alterações em componentes da parede ileal, células, na deposição de fibras colágenas e nos neurônios do SNE que foram dependentes do tempo e da cepa infectante [125], este trabalho será apresentado no Capítulo II desta tese.

O INTESTINO DELGADO

O intestino delgado é um componente do sistema digestório, que também é composto pela cavidade oral, esôfago, estômago, intestinos delgado e grosso, além das glândulas anexas, sendo responsáveis por todo processamento do alimento, desde a sua ingestão, digestão do alimento, absorção dos nutrientes até a eliminação dos restos não digeridos [126]. Por sua vez, o intestino delgado também é segmentado em três porções, denominado duodeno, jejuno e íleo. Esses segmentos apresentam características celulares e morfológicas semelhantes em sua extensão, sendo a histoarquitetura intestinal basicamente composta (da camada mais exterior para o lúmen) pelas túnicas serosa e muscular, tela submucosa, muscular da mucosa e túnica mucosa [127], que podem ser observadas na figura 8.

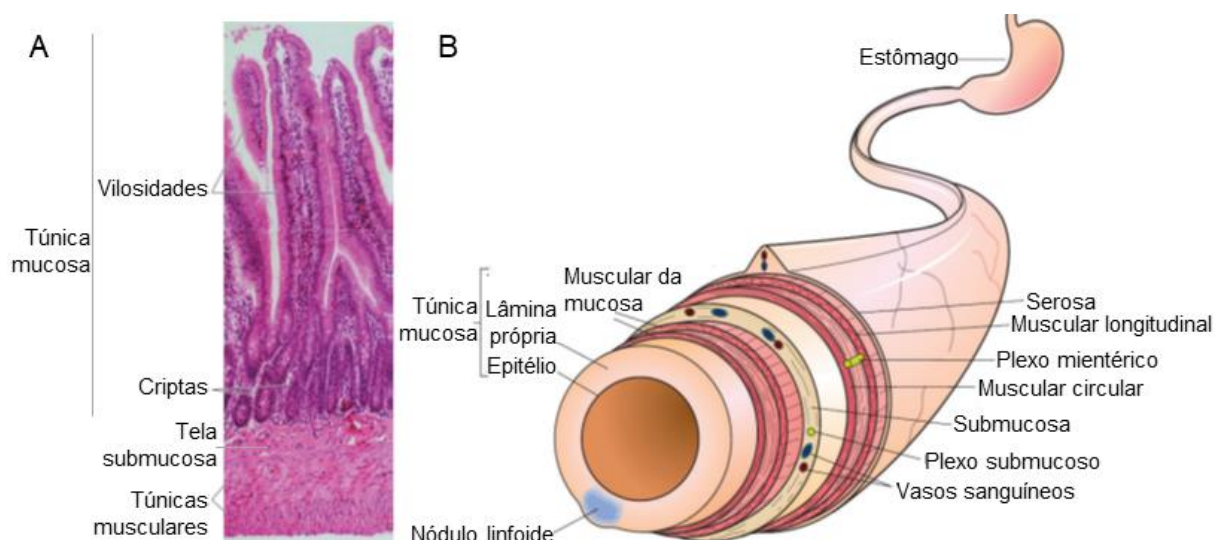


Figura 8. Histoarquitetura intestinal. (A) Fotomicrografia do intestino delgado, onde podem ser visualizadas as camadas musculares, submucosa e mucosa. (B) Esquema representativo das camadas e estruturas que compõe o intestino. Modificado de: Junqueira, 2017 [127].

A camada mais externa e que recobre externamente o intestino é a túnica serosa, que é formada por tecido conjuntivo frouxo. A seguir são encontradas as túnicas musculares, que são formadas por duas camadas de músculo liso: a camada longitudinal, que é a mais externa e a circular mais interna [127]. Entre elas pode ser encontrado o plexo mientérico, um componente do Sistema Nervoso Entérico (SNE) que auxilia na regulação da atividade motora intestinal realizada pela túnica muscular [128].

Acima das camadas musculares é encontrada a tela submucosa. Esta também é formada por tecido conjuntivo, porém, neste caso é denso não-modelado e conta com a presença de numerosos vasos sanguíneos como arteríolas e vênulas e vasos linfáticos [127]. Além disso, nesta camada intestinal se encontra outro componente do SNE, o plexo submucoso, que tem a função de controlar a atividade secretora epitelial [129] e glandular, a vasomotricidade e a motilidade da mucosa [128,130]. Na tela submucosa também são encontrados fibroblastos, que

fazem a manutenção da matriz extracelular por meio da secreção de fibras colágenas [127], que são as principais proteínas da matriz extracelular [131]. Já foram identificados pelo menos 30 tipos de fibras colágenas [132], sendo que, no intestino, as mais encontrados são as fibras dos tipos I, III e IV. Os tipos I e III são os mais abundantes no organismo humano [133,134] e ambos são do tipo fibrilar [135] e são os principais componentes da matriz intersticial [136]. O colágeno do tipo III é secretado por fibroblastos, desempenha um papel importante em patologias associadas a inflamação [136] e é um importante componente estrutural em órgãos ocos, como grandes vasos sanguíneos, útero e intestino [137]. Ele é considerado essencial para a produção do colágeno de tipo I [138], uma vez que é o principal colágeno encontrado nos estágios iniciais da reparação tecidual, a seguir, o colágeno do tipo III é degradado e há o aumento da síntese do colágeno tipo I [139]. Este, por sua vez está presente na maioria dos tecidos como um importante componente estrutural em vários órgãos [134]. Já o colágeno do tipo IV é normalmente mais flexível que os demais, uma vez que as suas fibras são ligadas cabeça a cabeça, o que possibilita a formação de lâminas [140]. Logo, este é o principal componente da membrana basal, estrutura que fornece suporte para as células epiteliais e endoteliais [141].

As células epiteliais estão em contato direto com o lúmen intestinal e fazem parte da camada conhecida como túnica mucosa. Nela são encontradas as vilosidades, que são projeções da lâmina própria, que aumentam a superfície de contato com o lúmen, e que são recobertas por um epitélio de revestimento simples cuja principal função é absorção de nutrientes. Também são encontradas as criptas, que ao contrário dos vilos, são invaginações da mucosa recobertas por um epitélio secretor, que formam numerosas glândulas [127]. As células epiteliais se apoiam na membrana basal [141] e abaixo dela, formando o centro do vilo e circundando as criptas, encontra-se a lâmina própria. Esta é constituída por tecido conjuntivo frouxo, elastina e miofibroblastos. São encontrados na lâmina própria, além de vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas e grandes quantidades de células imunes, como plasmócitos e linfócitos [142] (Figura 9).

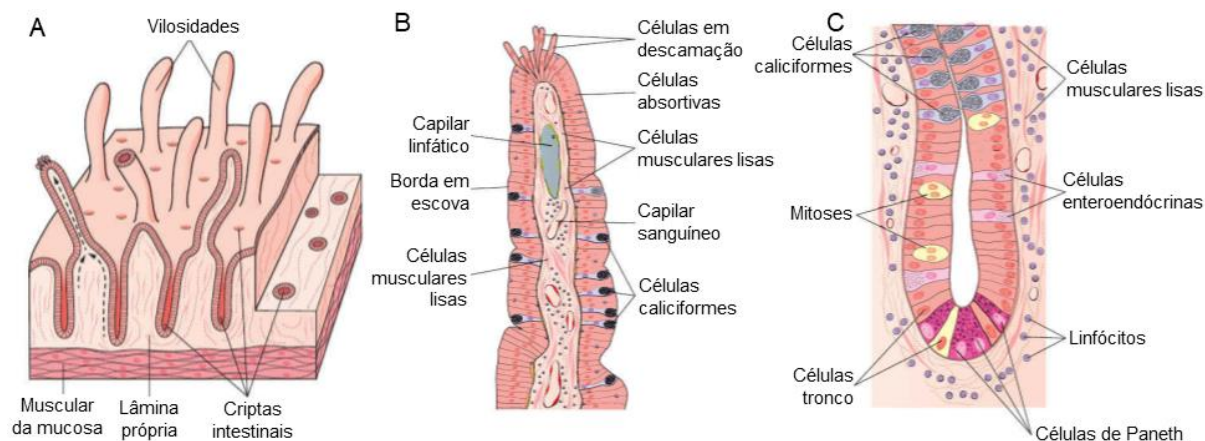


Figura 9. As estruturas da túnica mucosa do intestino delgado. (A) Visão geral da túnica mucosa e o epitélio dos (B) vilos e (C) criptas. Modificado de: Junqueira, 2017 [127].

Além das características morfológicas e estruturais do intestino delgado, é importante ressaltar o papel do órgão como componente do sistema imune, uma vez que este auxilia na manutenção da homeostase corporal e é o maior órgão imune nos mamíferos [143], apresentando cerca de 70-80% das células imunes do corpo [144]. No intestino são encontrados os tecidos linfoides associados ao intestino (GALT – *gut-associated lymphoid tissues*), onde há apresentação de antígenos e indução da resposta imune adaptativa [145,146]. Os principais componentes do GALT encontrados na parede intestinal são as placas de Peyer e os folículos linfoides isolados [146]. Inclusive é no íleo, órgão de estudo no presente trabalho, onde são encontradas maiores quantidades de placas de Peyer e de agregados linfoides [147] e das células de Paneth, que são células especializadas encontradas no epitélio das criptas [147,148]. Essa maior concentração de componentes imunes no íleo é relacionada ao fato de que nele também são encontrados mais microrganismos comensais quando comparado às demais porções do intestino delgado [147].

Devido a essa grande quantidade de microrganismos na microbiota, e também a exposição contínua a antígenos alimentares, patógenos e substâncias agressoras, além dos componentes do GALT e outras células imunes, o intestino possui barreiras físicas, como o epitélio intestinal que é composto por células especializadas e barreiras químicas, como o muco intestinal [149].

CÉLULAS ENCONTRADAS NO INTESTINO

O intestino delgado é composto por uma grande variedade de células epiteliais especializadas e também por células do sistema imunológico. Dentre as células epiteliais, são encontradas as células absorptivas, também conhecidas como enterócitos. Estas células são responsáveis pela digestão, absorção de água e nutrientes e pelo transporte de nutrientes para vasos sanguíneos e linfáticos da lâmina própria. Essas funções são facilitadas devido a sua

morfologia, uma vez que essas células são colunares e possuem microvilos na porção apical, que formam a chamada borda em escova intestinal e que assim como os vilos, aumenta a superfície de contato com o lúmen intestinal [127]. Além disso, essas células são importantes nos processos inflamatórios, podendo secretar citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e também atuar como células apresentadoras de antígenos [150–152].

As células caliciformes também são encontradas no epitélio. Estas células apresentam um formato de cálice e são conhecidas principalmente pela produção e secreção de mucinas, que formam o muco intestinal [153], responsável por auxiliar na prevenção da invasão de microrganismos [154]. São conhecidos 21 genes diferentes de mucinas, que por sua vez são divididas em dois grupos: as associadas à membrana e as secretadas. As secretadas ainda são divididas entre as que são formadoras de gel, que apresentam as funções de proteger, lubrificar e hidratar o epitélio; e as que não são formadoras de gel [155,156]. Além dessa função, descobriu-se que essas células e as mucinas também participam da resposta imune inata, uma vez que secretam citocinas, quimiocinas e proteínas antimicrobianas [157]. As células caliciformes também desempenham um papel na tolerância imunológica, devido a sua capacidade de endocitar substâncias do lúmen intestinal e as transmitirem para as células apresentadoras de antígenos [154,156] e também ao fato de que a mucina MUC2 é capaz de atribuir funções anti-inflamatórias em células dendríticas [158].

Em torno de 1% do epitélio intestinal é composto por células enteroendócrinas [159] que são altamente específicas. Estas células atuam produzindo e liberando hormônios para auxiliar na manutenção da homeostasia intestinal a partir da interação com antígenos dietéticos e microbianos [160], enviando e recebendo sinais do sistema nervoso entérico [161]. Outras células que são encontradas em baixas quantidades no epitélio intestinal, mas que desempenham importantes funções de vigilância são as *Tuft Cells* [162] devido a sua capacidade de detectar parasitos e coordenar as defesas intestinais contra eles [163]. Após a sua ativação, essas células secretam várias moléculas efetoras, como IL-25, leucotrieno C₄ e acetilcolina ao final da sinalização celular vão desencadear a resposta imune Th2 contra os parasitos, a estimulação das células tronco [162] e a liberação de muco pelas células caliciformes [163]. A atuação das *Tuft Cells* em parasitoses já foi observada em infecções por helmintos como *Trichinella spiralis* [164] e protozoários, como *Tritrichomonas rainier* [165]

Outros tipos celulares são encontrados apenas na porção inferior das criptas intestinais: as células de Paneth, encontradas no intestino delgado, e as células semelhantes a Paneth no intestino grosso e as células-tronco intestinais [166]. As células de Paneth tem importante atuação na defesa do organismo, uma vez que os seus grânulos citoplasmáticos contêm

substâncias antimicrobianas, como defensinas e lisozima [167]. Além disso, essas células também participam da manutenção e regulação da proliferação das células-tronco por meio da secreção de proteínas como Wnt3 e de fatores de crescimento [167,168] juntamente com outras células intestinais [166] e sinais inflamatórios [169]. As células-tronco, por sua vez, apresentam a importante função de geração das demais células epiteliais. Em cada cripta são encontradas de 12 a 16 células-tronco [170], que se dividem uma vez a cada 24h dando origem a células progenitoras altamente proliferativas que realizam de 4 a 5 divisões celulares até se diferenciarem nas células epiteliais [171] citadas nesta sessão. Sendo assim a atuação das células-tronco são essenciais para a regeneração do epitélio lesado após um quadro de inflamação intestinal [169].

Por fim, são encontradas diversas células do sistema imune no intestino delgado. Ainda no epitélio, podem ser observados linfócitos intraepiteliais, que também atuam na vigilância imunológica, migrando ao longo da membrana basal, onde promovem uma primeira linha de defesa contra microrganismos luminais [172], e também participam da tolerância imunológica intestinal [173]. Por outro lado, os linfócitos intraepiteliais já foram relacionados à indução de colite em modelos experimentais [174]. Sendo assim, sabe-se que a atuação dessas células é dependente da influência de fatores luminais, uma vez que quando o ambiente está em homeostasia, os linfócitos intraepiteliais apresentam baixa capacidade citolítica e produzem citocinas reguladoras, mas durante injúrias, eles passam a produzir citocinas pró-inflamatórias e estimulam a morte de células epiteliais [151].

Na lâmina própria intestinal são encontradas diversas linhagens de células imunes, como macrófagos, mastócitos, linfócitos B e T, células linfoides inatas (ILCs), entre outras [147]. É interessante mencionar que a localização dessas células pode diferir na lâmina própria, como os macrófagos que são encontrados principalmente próximos ao ápice dos vilos [142] e também entre os diferentes segmentos intestinais. Por exemplo, a quantidade de mastócitos e ILC2 são maiores no duodeno e decrescem em direção ao íleo, por outro lado, a quantidade de ILC3 é reduzida no duodeno e aumenta em direção ao íleo [147]. As ILCs se desenvolvem a partir de um progenitor linfoide comum [175], porém, estas não expressam receptores específicos em sua superfície como observado nos linfócitos T e B [176]. As ILCs são divididas em três grupos, que variam dos tipos 1 ao 3 [175] e cada um desses é responsável pela secreção de citocinas específicas, como IFN- γ , TNF- α pelas ILC1, IL-4, 5, 13 pelas ILC2 e IL-17 e 22 pelas ILC3 [176]. Assim, essas células são consideradas as células T CD4⁺ da imunidade inata [177]. Mais recentemente, foi descoberto que as ILC1 são capazes de secretar o TGF- β e assim auxiliar no remodelamento do epitélio e da matriz intestinal [178]. Essa citocina está envolvida na

manutenção da homeostase intestinal [179], e as células que a expressam estão naturalmente presentes na lâmina própria e aumentam sua expressão diante de processos infecciosos [180], impedindo respostas inflamatórias destrutivas ao tecido [179]. Vários tipos de células parenquimatosas e infiltrantes, como linfócitos, monócitos, macrófagos [180] e mastócitos [181,182] podem secretar TGF- β .

A maior população de mastócitos é encontrada no trato gastrointestinal [181]. A ativação dessas células leva a liberação dos produtos provenientes de seus grânulos, como proteases, histamina, serotonina, dopamina, TNF- α , IL-4, fator de crescimento endotelial (VEGF), IL-1, IL-3, IL-6, TGF- β , diversas outras citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Estes compostos liberados auxiliam na modulação da imunidade da mucosa, na integridade epitelial [181], na diferenciação de linfócitos B [182], na regeneração tecidual [183], entre outros. O seu papel na inflamação intestinal é contraditório [184,185], contudo, recentemente foi verificado que os mastócitos são capazes de migrar até o endotélio e degranular, liberando seus mediadores pró-inflamatórios diretamente na corrente sanguínea e assim iniciar a infiltração de neutrófilos [186]. Esse processo também pode estar envolvido na atração de outros leucócitos, que são atraídos por substâncias liberadas por mastócitos, como eosinófilos, basófilos e linfócitos [187,188]. Por fim, essas células são importantes na comunicação com o sistema endócrino e o SNE [189,190]. No intestino, os mastócitos estão em contato direto com os nervos [191] e essa sua relação neuro-imune é bidirecional, uma vez que algumas substâncias produzidas pelos mastócitos atuam diretamente sobre os neurônios, por outro lado, essa liberação de mediadores pelos mastócitos é muitas vezes modulada por neuropeptídeos liberados dos neurônios do SNE [190].

SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO

O sistema nervoso entérico está distribuído desde o esôfago, estômago e por todo o intestino, sendo constituído por uma rede conectada de neurônios que podem estar dispersos, ou reunidos em gânglios que se organizam em plexos, que contém neurônios, seus axônios e células da glia entérica. Os gânglios do SNE são formados por um agrupamento de 3 ou mais neurônios e não são encapsulados, apresentam apenas uma cobertura descontínua composta por uma fina lâmina basal, fibroblastos e fibrilas de colágeno. Os plexos ganglionados são conhecidos como mientérico e submucoso sendo encontrados respectivamente entre as camadas musculares e na tela submucosa (Figura 10). Por outro lado, os não ganglionados podem estar presentes em toda a parede intestinal [192].

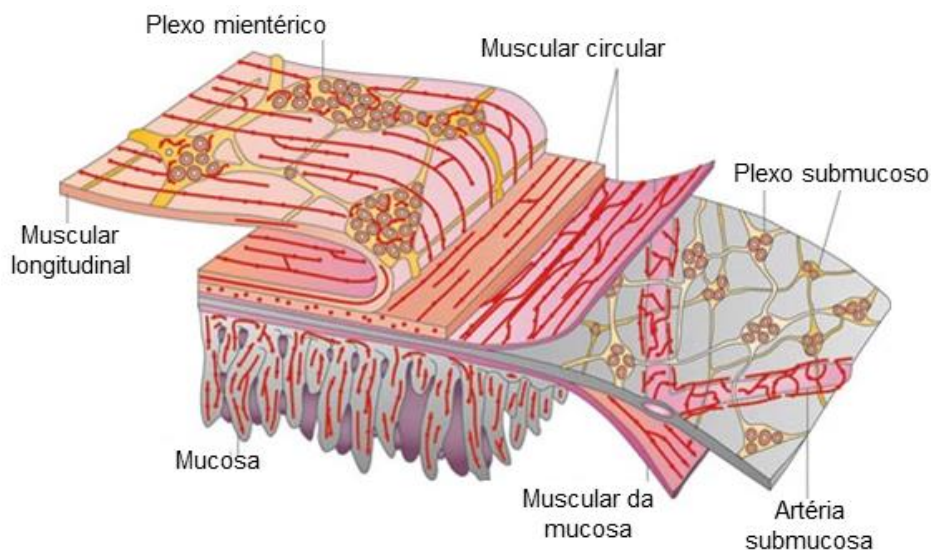


Figura 10. Plexos ganglionares do sistema nervoso entérico. Esquema representativo do intestino delgado que destaca a localização dos plexos mientérico e submucoso. Adaptado de: Furness, 2012 [193].

Em humanos, são encontrados de 200 a 600 milhões de neurônios no SNE [194], cuja classificação tem sido avaliada nos últimos anos por diferentes técnicas morfológicas e [195] e moleculares [196]. O circuito nervoso entérico mais básico consiste em um neurônio sensorial que realiza sinapse com um neurônio efetor, que pode ser inibitório ou excitatório. Essa sinapse pode ser direta ou através de um interneurônio [197].

Os neurônios pertencentes ao plexo mientérico, também chamado de plexo de Auerbach, atuam na regulação do relaxamento e da contração intestinal. Já neurônios encontrados no plexo submucoso, conhecido como plexo de Meissner, realizam o controle do fluxo sanguíneo, e das funções e a secreção das células epiteliais com base no ambiente luminal [128]. Outro componente importante de ambos os plexos é a célula da glia entérica, que participa na regulação de várias funções intestinais [198], em estados inflamatórios [199,200] e na sobrevivência neuronal [201].

Em relação a atividade dos neurônios do SNE, é conhecida a expressão de diversos neurotransmissores, que podem ter funções inibitórias ou excitatórias sobre as camadas musculares e de mediadores químicos que vão atuar na lâmina própria e no epitélio intestinal [128]. É comum encontrar um neurônio secretando dois ou mais neurotransmissores, que são normalmente classificados como excitatórios ou inibitórios [202]. Exemplos de neurotransmissores excitatórios são a acetilcolina [203] e a substância P, que aumentam a contração do músculo liso, as secreções intestinais, a liberação de hormônios e também dilatam vasos sanguíneos [128]. Os neurotransmissores inibitórios, apresentam efeito complementar. Podemos citar o NO, que é secretado por neurônios chamados de nitrérgicos, e o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), secretado por neurônios vipérgicos [204]. Em estudos com hamsters

já foi detectada a presença da coexistência de VIP e NO em uma pequena população de neurônios mientéricos [205].

O NO é um neurotransmissor gasoso, portanto, para a marcação de neurônios nitrérgicos utiliza-se a isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase (nNOS) [206], que participa da síntese de NO a partir da L-arginina [207]. Este, afeta várias funções do intestino podendo relaxar a musculatura lisa, regular o fluxo sanguíneo por meio da vasodilatação e também inibir a secreção de hormônios e eletrólitos [208]. Recentemente, estudos verificaram que em animais *knockout* para nNOS há uma regulação positiva para a transcrição de VIP, podendo ser um mecanismo compensatório que busca manter o equilíbrio das vias inibitórias e excitatórias, além de causar alterações morfológicas dentro do SNE [209]. O VIP, por sua vez, também promove a vasodilatação, está envolvido na proliferação de células caliciformes e na secreção de mucinas [210] e na regulação imunológica, sendo considerado um fator neuroprotetor [211] que atua diretamente com células imunes, como ILC3 e os mastócitos [212]. Os mastócitos são encontrados próximos das terminações nervosas dos neurônios sensoriais e autônomos, onde realizam uma comunicação bidirecional [212], essas células também podem produzir VIP e este, promove a degranulação dos mastócitos, podendo levar a progressão da síndrome do intestino irritável [213].

Além dos mastócitos, os macrófagos musculares também realizam uma comunicação bidirecional com o SNE [213], uma vez que modulam o peristaltismo atuando sobre os neurônios e estes regulam o número de macrófagos [214]. Recentemente, foram realizadas descrições acerca de macrófagos que auxiliam na regulação de atividades intestinais, como secreção intestinal e motilidade e que são encontrados próximos aos gânglios mientéricos e submucosos, fibras nervosas, vasos sanguíneos, células de Paneth e placas de Peyer [215]. Os macrófagos musculares, normalmente, apresentam um fenótipo anti-inflamatório, contudo ao serem estimulados por padrões moleculares associados a patógenos ou em outras condições inflamatórias, podem ativar o fenótipo pró-inflamatório [216,217]. Durante a inflamação muscular, há um aumento na quantidade de macrófagos, cuja ação pode levar a degradação da membrana basal que circunda os gânglios. Com o rompimento dessa barreira, o acesso de células inflamatórias ao plexo mientérico é facilitado, e esta interação pode acarretar em lesões neuronais [217], levando ao quadro de ganglionite, que já foi observado em doenças inflamatórias intestinais [218].

JUSTIFICATIVA

A leishmaniose tegumentar é uma doença que causa lesões destrutivas e desfigurantes, que afetam o hospedeiro de diversas formas, podendo levar ao comprometimento da pele e mucosas do trato orofaríngeo. Essa doença afeta milhares de pessoas ao redor do mundo todos os anos, e o Brasil é um dos países que mais apresenta novos casos.

A principal espécie causadora da doença nas Américas é a *L. (V.) braziliensis*, única espécie já encontrada em todos os estados brasileiros e que causa lesões destrutivas e de difícil tratamento e diagnóstico. Esta espécie é a principal responsável pelo desenvolvimento da forma mucosa da doença, que afeta principalmente a região orofaríngea e que causa lesões destrutivas e debilitantes, com o comprometimento das funções normais do sistema respiratório.

Já foi relatado anteriormente que a espécie de *L. (V.) braziliensis* pode ser disseminada para outros órgãos e causar alterações histopatológicas. Além disso, em hamsters, foi descrita a sua capacidade de, não apenas, migrar para as vísceras ou outros locais da pele, mas de permanecerem viáveis e capazes de se replicar. Ainda em 1996, Almeida disse “...*the scarcity of reports of ‘visceralization’ of L. braziliensis may be due to the few attempts that have been made to isolate organisms from viscera...*”, assim, o estudo de outros órgãos além daqueles descritos na literatura se faz necessário para melhor entendimento da relação parasito-hospedeiro e das consequências sistêmicas da infecção.

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa já demonstraram o acometimento intestinal durante a infecção por *L. (V.) braziliensis* e por outras espécies que causam a forma tegumentar da leishmaniose. Inclusive, demonstrando que o parasito pode ser disseminado para o íleo e linfonodo mesentérico, onde causa diversas alterações morfológicas e celulares. Sendo assim, o estudo de componentes estruturais, imunes e do sistema nervoso entérico foi realizado para aprimorar o conhecimento acerca da infecção.

OBJETIVOS

GERAL

Avaliação do íleo de hamsters após 90 ou 120 dias após a infecção por diferentes cepas de *L. (V.) braziliensis*.

ESPECÍFICOS

Primeiro artigo

- Infecção utilizando 3 cepas de *L. (V.) braziliensis* - MHOM/BR/1975/M2903, MHOM/BR/2003/2314 e MHOM/BR/2000/1655.

- Avaliação de sinais clínicos dos animais, como a medida das patas, peso, comportamento, alopecia, entre outros;
- Quantificação total e diferencial de leucócitos no sangue periférico;
- Avaliação da histoarquitetura e da deposição de colágeno no íleo de hamsters infectadas com *L. (V.) braziliensis*;
- Quantificação das diferentes populações celulares no íleo dos animais infectados;
- Avaliação quantitativa e morfológica dos neurônios dos plexos mientérico e submucoso do íleo;
- Determinação dos níveis de NO e a atividade enzimática da mieloperoxidase e da N-acetil-beta-D-glucosaminidase.

Segundo artigo

- Infecção utilizando 2 cepas de *L. (V.) braziliensis* - MHOM/BR/2003/2311 e MHOM/BR/2009/3476.
- Avaliação da espessura da pata infectada;
- Avaliação da deposição de colágeno no íleo de hamsters infectadas;
- Quantificação da população de mastócitos e da população de células produtoras de TGF- β no íleo dos animais infectados;
- Determinação dos níveis de NO e da atividade enzimática da mieloperoxidase e da N-acetil-beta-D-glucosaminidase;
- Avaliação quantitativa dos vasos sanguíneos no íleo dos animais;
- Avaliação quantitativa e morfológica dos neurônios dos plexos mientérico e submucoso do íleo;
- Avaliação da área imunorreativa ao VIP.

Referências Bibliográficas

- [1] De Brito RCF, Aguiar-Soares RD de O, Cardoso JM de O, Coura-Vital W, Roatt BM, Reis AB. Recent advances and new strategies in Leishmaniasis diagnosis. Appl Microbiol Biotechnol 2020;104:8105–16. <https://doi.org/10.1007/S00253-020-10846-Y/TABLES/2>.
- [2] Neves DP, Melo AL de, Linardi PM, Vitor RWA. Parasitologia humana. 13. ed. São Paulo: Atheneu; 2016.
- [3] Moraes CS, Aguiar-Martins K, Costa SG, Bates PA, Dillon RJ, Genta FA. Second Blood Meal by Female *Lutzomyia longipalpis*: Enhancement by Oviposition and Its Effects on Digestion, Longevity, and *Leishmania* Infection. Biomed Res Int 2018;2018:2472508. <https://doi.org/10.1155/2018/2472508>.
- [4] Serafim TD, Coutinho-Abreu I V., Dey R, Kissinger R, Valenzuela JG, Oliveira F, et al. Leishmaniasis: the act of transmission. Trends Parasitol 2021;37:976–87. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2021.07.003>.
- [5] World Health Organization W. Leishmaniasis: Key facts 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (accessed February 27, 2022).
- [6] Ruiz-Postigo JA, Jain S, Mikhailov A, Valadas S, Warusavithana S, Osman M, et al. Global leishmaniasis surveillance: 2019-2020, a baseline for the 2030 roadmap. Relev Épidémiologique Hebd 2021;35:19.
- [7] Organização Pan Americana da Saúde O. Leishmanioses: informe epidemiológico das Américas. Washington, D.C.: 2021.

- [8] Ministério da Saúde M. Leishmaniose Visceral - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Brasil 2021:1. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/leishvbr.def>.
- [9] Nylén S, Eidsmo L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 2012;34:551–61. <https://doi.org/10.1111/PIM.12007>.
- [10] Ministério da Saúde. Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar. 1ª. Brasília: 2017.
- [11] Ministério da Saúde M. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1st ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.
- [12] Ministério da Saúde M. Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Brasil 2021:1. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/ltabr.def>.
- [13] Rogers ME, Chance ML, Bates PA. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* 2002;124:495–507. <https://doi.org/10.1017/S0031182002001439>.
- [14] Sacks D, Kamhawi S. Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis. 2003;55:453–83. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MICRO.55.1.453>.
- [15] Sunter J, Gull K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biol* 2017;7:170165. <https://doi.org/10.1098/rsob.170165>.
- [16] Killick Kendrick R, Molyneux DH, Ashford RW. *Leishmania* in phlebotomid sandflies I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. *Proc R Soc London Ser B Biol Sci* 1974;187:409–19. <https://doi.org/10.1098/RSPB.1974.0085>.
- [17] Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* 2007;37:1097–106. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>.
- [18] Dostálová A, Volf P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites Vectors* 2012 51 2012;5:1–12. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-276>.
- [19] Méndez S, Fernández-Pérez FJ, de la Fuente C, Cuquerella M, Gómez-Muñoz MT, Alunda JM. Partial anaerobiosis induces infectivity of *Leishmania infantum* promastigotes. *Parasitol Res* 1999;85:507–9. <https://doi.org/10.1007/s004360050587>.
- [20] Andrew N, Maior S, Bonfim T, Lígia A, Scott B, De L, et al. Leishmaniasis: Molecular Aspects of Parasite Dimorphic Forms Life Cycle. *Leishmaniasis - Gen Asp a Stigmatized Dis* [Working Title] 2022. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.102370>.
- [21] Serafim TD, Coutinho-Abreu I V., Oliveira F, Meneses C, Kamhawi S, Valenzuela JG. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nat Microbiol* 2018 35 2018;3:548–55. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0125-7>.
- [22] Bates PA. Revising *Leishmania*'s life cycle. *Nat Microbiol* 2018 35 2018;3:529–30. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0154-2>.
- [23] Rogers ME, Ilg T, Nikolaev A V., Ferguson MAJ, Bates PA. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 2004;430:463–7. <https://doi.org/10.1038/nature02675>.
- [24] Abdeladhim M, Kamhawi S, Valenzuela JG. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity.

- Infect Genet Evol 2014;28:691–703. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2014.07.028>.
- [25] Afonso MMDS, Duarte R, Miranda JC, Caranha L, Rangel EF. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of American Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. J Trop Med 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/858657>.
- [26] Andrade BB, De Oliveira CI, Brodskyn CI, Barral A, Barral-Netto M. Role of Sand Fly Saliva in Human and Experimental Leishmaniasis: Current Insights. Scand J Immunol 2007;66:122–7. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3083.2007.01964.X>.
- [27] Andrade BB, Teixeira CR, Barral A, Barral-Netto M. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. An Acad Bras Cienc 2005;77:665–93. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652005000400008>.
- [28] Valenzuela JG, Belkaid Y, Garfield MK, Mendez S, Kamhawi S, Rowton ED, et al. Toward a Defined Anti-*Leishmania* Vaccine Targeting Vector Antigens. J Exp Med 2001;194:331–42. <https://doi.org/10.1084/jem.194.3.331>.
- [29] Brodie TM, Smith MC, Morris R V., Titus RG. Immunomodulatory Effects of the *Lutzomyia longipalpis* Salivary Gland Protein Maxadilan on Mouse Macrophages. Infect Immun 2007;75:2359–65. <https://doi.org/10.1128/IAI.01812-06>.
- [30] Wheat WH, Pauken KE, Morris R V., Titus RG. *Lutzomyia longipalpis* Salivary Peptide Maxadilan Alters Murine Dendritic Cell Expression of CD80/86, CCR7, and Cytokine Secretion and Reprograms Dendritic Cell-Mediated Cytokine Release from Cultures Containing Allogeneic T Cells. J Immunol 2008;180:8286–98. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.12.8286>.
- [31] Hurrell BP, Regli IB, Tacchini-Cottier F. Different *Leishmania* Species Drive Distinct Neutrophil Functions. Trends Parasitol 2016;32:392–401. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.02.003>.
- [32] Cardoso T, Bezerra C, Medina LS, Ramasawmy R, Scheriefer A, Bacellar O, et al. *Leishmania braziliensis* isolated from disseminated leishmaniasis patients downmodulate neutrophil function. Parasite Immunol 2019;41:e12620. <https://doi.org/10.1111/PIM.12620>.
- [33] van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. J Immunol 2004;173:6521–5.
- [34] Martínez-López M, Soto M, Iborra S, Sancho D. *Leishmania* hijacks myeloid cells for immune escape. Front Microbiol 2018;9:883. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00883/BIBTEX>.
- [35] Kane MM, Mosser DM. The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis. J Immunol 2001;166:1141–7. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.2.1141>.
- [36] Kima PE, Constant SL, Hannum L, Colmenares M, Lee KS, Haberman AM, et al. Internalization of *Leishmania mexicana* Complex Amastigotes via the Fc Receptor Is Required to Sustain Infection in Murine Cutaneous Leishmaniasis. J Exp Med 2000;191:1063–8. <https://doi.org/10.1084/jem.191.6.1063>.
- [37] Centers for Disease Control and Prevention C. Leishmaniasis 2017. <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html> (accessed February 28, 2022).
- [38] Peniche AG, Bonilla DL, Palma GI, Melby PC, Travi BL, Osorio EY. A secondary wave of neutrophil infiltration causes necrosis and ulceration in lesions of experimental American cutaneous leishmaniasis. PLoS One 2017;12:e0179084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179084>.
- [39] Saldanha MG, Pagliari C, Queiroz A, Machado PRL, Carvalho L, Scott P, et al. Tissue

- Damage in Human Cutaneous Leishmaniasis: Correlations Between Inflammatory Cells and Molecule Expression. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;10:355. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.00355/BIBTEX>.
- [40] da Silva Santos C, Brodskyn CI. The role of CD4 and CD8 T cells in human cutaneous leishmaniasis. *Front Public Heal* 2014;2:165. <https://doi.org/10.3389/FPUBH.2014.00165/BIBTEX>.
- [41] Campos TM, Costa R, Passos S, Carvalho LP. Cytotoxic activity in cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2017;112:733–40. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170109>.
- [42] Viana AG, Magalhães LMD, Giunchetti RC, Dutra WO, Gollob KJ. Infection of human monocytes with *Leishmania infantum* strains induces a downmodulated response when compared with infection with *Leishmania braziliensis*. *Front Immunol* 2018;8:1896. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.01896/BIBTEX>.
- [43] Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasit Vectors* 2017;10:82. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>.
- [44] Ministério da Saúde. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana. vol. 1. 1st ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2006. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302006000600015>.
- [45] Patino LH, Muñoz M, Cruz-Saavedra L, Muskus C, Ramírez JD. Genomic Diversification, Structural Plasticity, and Hybridization in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;10:1. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.582192>.
- [46] Vieira T da S, Rugani JN, Nogueira PM, Torrecilhas AC, Gontijo CMF, Descoteaux A, et al. Intraspecies Polymorphisms in the Lipophosphoglycan of *L. braziliensis* Differentially Modulate Macrophage Activation via TLR4. *Front Cell Infect Microbiol* 2019;9:240. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00240>.
- [47] Indiani de Oliveira C, Teixeira MJ, Teixeira CR, Ramos de Jesus J, Bomura Rosato A, Silva JS da, et al. *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. *Microbes Infect* 2004;6:977–84. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.05.009>.
- [48] Alves-Ferreira EVC, Toledo JS, De Oliveira AHC, Ferreira TR, Ruy PC, Pinzan CF, et al. Differential Gene Expression and Infection Profiles of Cutaneous and Mucosal *Leishmania braziliensis* Isolates from the Same Patient. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9:e0004018. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004018>.
- [49] Quaresma PF, De Brito CFA, Rugani JMN, Freire JDM, Baptista RDP, Moreno EC, et al. Distinct genetic profiles of *Leishmania (Viannia) braziliensis* associate with clinical variations in cutaneous-leishmaniasis patients from an endemic area in Brazil. *Proc Int Astron Union* 2018;145:1161–9. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000276>.
- [50] Rugani JN, Quaresma PF, Gontijo CF, Soares RP, Monte-Neto RL. Intraspecies susceptibility of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to antileishmanial drugs: Antimony resistance in human isolates from atypical lesions. *Biomed Pharmacother* 2018;108:1170–80. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.149>.
- [51] Guimarães LH, Queiroz A, Silva JA, Silva SC, Magalhães V, Lago EL, et al. Atypical Manifestations of Cutaneous Leishmaniasis in a Region Endemic for *Leishmania braziliensis*: Clinical, Immunological and Parasitological Aspects. *PLoS Negl Trop Dis* 2016;10:e0005100. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005100>.
- [52] Fernandes ACBS, Pedroso RB, de Mello TFP, Donatti L, Venazzi EAS, Demarchi IG, et al. In vitro characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolates from patients with different responses to Glucantime® treatment from Northwest Paraná, Brazil. *Exp Parasitol* 2016;167:83–93. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.05.003>.

- [53] Gagini T, De Oliveira Schubach A, De Fatima Madeira M, Valette-Rosalino CM, Pimentel MIF, Da Silva Pacheco R. Genotypic profiles of *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains from cutaneous leishmaniasis patients and their relationship with the response to meglumine antimoniate treatment: A pilot study. *Parasite* 2017;24. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017035>.
- [54] Hoyos CL, Quipildor M, Bracamonte E, Lauthier JJ, Cajal P, Uncos A, et al. Simultaneous occurrence of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis caused by different genotypes of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *J Dermatol* 2019;46:e320–2. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.14866>.
- [55] Ribeiro-Romão RP, Moreira OC, Osorio EY, Cysne-Finkelstein L, Gomes-Silva A, Valverde JG, et al. Comparative evaluation of lesion development, tissue damage, and cytokine expression in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by inocula with different *Leishmania (Viannia) braziliensis* concentrations. *Infect Immun* 2014;82:5203–13. <https://doi.org/10.1128/IAI.02083-14>.
- [56] Paiva MB, Ribeiro-Romão RP, Resende-Vieira L, Braga-Gomes T, Oliveira MP, Saavedra AF, et al. A Cytokine Network Balance Influences the Fate of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection in a Cutaneous Leishmaniasis Hamster Model. *Front Immunol* 2021;12:2490. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.656919/BIBTEX>.
- [57] Santos AGA dos, Lima LL de, Mota CA, Gois MB, Fernandes ACBS, Silveira TGV, et al. Insights of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) intestine. *Biomed Pharmacother* 2018;106:1624–32. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.120>.
- [58] Cruz AA V., Alves-Ferreira EVC, Milbratz-Moré G, Chahud F, Ruy PC, Duarte MIS, et al. Case report: Sclerosing orbital inflammation caused by *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 2017;96:197–9. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0389>.
- [59] Silva L, Damrose E, Fernandes A-M-F. Laryngeal leishmaniasis, a rare manifestation of an emerging disease. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis* 2017;134:211–2. <https://doi.org/10.1016/j.anorl.2015.11.013>.
- [60] Gontijo CM, Pacheco RS, Oréfice F, Lasmar E, Silva ES, Melo MN. Concurrent cutaneous, visceral and ocular leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a kidney transplant patient. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:751–3. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000500029>.
- [61] Silva ES da, Pacheco RS, Gontijo CMF, Carvalho IR, Brazil RP. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Rev Do Inst Med Trop São Paulo* 2002;44:145–9.
- [62] Gomes-Silva A, Valverde Jg, Ribeiro-Romão Rp, Plácido-Pereira Rm, Da-Cruz Am. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Parasitology* 2013;140:771–9. <https://doi.org/10.1017/S0031182012002156>.
- [63] Almeida MC, Cuba-Cuba CA, Moraes MAP, Miles MA. Dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *J Comp Pathol* 1996;115:311–6. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(96\)80088-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(96)80088-0).
- [64] Barral A, de Freitas LAR, Carvalho EM, Almeida RP, Barral-Netto M, de Jesus AMR. Biological Behavior of *Leishmania amazonensis* Isolated from Humans with Cutaneous, Mucosal, or Visceral Leishmaniasis in Balb/C Mice. *Am J Trop Med Hyg* 1996;54:178–84. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1996.54.178>.
- [65] Pereira CG, Silva ALN, de Castilhos P, Mastrantonio EC, Souza RA, Romão RP, et al. Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. *Vet Parasitol* 2009;165:231–

40. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.019>.
- [66] De Oliveira CI, Teixeira MJ, Gomes R, Barral A, Brodskyn C. Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. *Drug Discov Today Dis Model* 2004;1:81–6. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2004.07.005>.
- [67] Martinez JE, Travi BL, Valencia AZ, Saravia NG. Metastatic Capability of *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Golden Hamsters. *J Parasitol* 1991;77:762. <https://doi.org/10.2307/3282713>.
- [68] Muigai R, Shaunak S, Gatei D, Wozniak A, Bryceson AM. Jejunal function and pathology in visceral leishmaniasis. *Lancet* 1983;322:476–9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(83\)90510-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(83)90510-X).
- [69] McBride MO, Fisher M, Skinner CJ, Golden R, Main J. An Unusual Gastrointestinal Presentation of Leishmaniasis. *Scand J Infect Dis* 1995;27:297–8. <https://doi.org/10.3109/00365549509019026>.
- [70] Armengot-Carbó M, Carmena-Ramón R, Rodrigo-Nicolás B, Ferrando-Marco J. Leishmaniasis visceral insospechada infiltrando un carcinoma epidermoide. *Actas Dermosifiliogr* 2012;103:321–3. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2011.04.016>.
- [71] Roig P, Cuadrado JM, Benítez C, Mayol MJ, López M, Navarro V, et al. Visceral leishmaniasis located in the intestines in patients with human immunodeficiency virus infection: a report of 2 cases. *Rev Clin Esp* 1993;192:271–3.
- [72] Laguna F, García-Samaniego J, Soriano V, Valencia E, Redondo C, Alonso MJ, et al. Gastrointestinal leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients: report of five cases and review. *Clin Infect Dis* 1994;19:48–53. <https://doi.org/10.1093/clinids/19.1.48>.
- [73] Jablonowski H, Szelényi H, Borchard F, Döhring-Schwerdtfeger E, Hengels KJ. Visceral leishmaniasis with gastrointestinal involvement in a 30-year-old HIV infected patient. *Z Gastroenterol* 1994;32:405–7.
- [74] Zimmer G, Guillou L, Gauthier T, Iten A, Saraga EP. Digestive leishmaniasis in acquired immunodeficiency syndrome: a light and electron microscopic study of two cases. *Mod Pathol* 1996;9:966–9.
- [75] Alonso MJ, Muñoz E, Picazo A, Abad MM, Gómez F, Roldán M, et al. Duodenal leishmaniasis diagnosed by biopsy in two HIV-positive patients. *Pathol Res Pract* 1997;193:43–7; discussion 49–50. [https://doi.org/10.1016/s0344-0338\(97\)80092-1](https://doi.org/10.1016/s0344-0338(97)80092-1).
- [76] Velasco M, Flores L, Guijarro-Rojas M, Roca V. Simultaneous intestinal leishmaniasis and mycobacterial involvement in a patient with acquired immune deficiency syndrome. *J Clin Gastroenterol* 1998;27:271–3. <https://doi.org/10.1097/00004836-199810000-00023>.
- [77] Wang J, Vanley C, Miyamoto E, Turner JA, Peng SK. Coinfection of visceral leishmaniasis and *Mycobacterium* in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:835–7. <https://doi.org/10.5858/1999-123-0835-COVLAM>.
- [78] Masedo González A, Barbero Allende JM, Pérez-Carreras M, Garrido M, Lizasoain M, Solís Herruzo JA. Intestinal leishmaniasis and Sézary syndrome: endoscopic diagnosis. *Gastroenterol Hepatol* 2006;29:546–50. <https://doi.org/10.1157/13094350>.
- [79] Kaae J, Nørgaard P, Himmelstrup B. Visceral leishmaniasis diagnosed in a patient with MALT lymphoma. *Eur J Intern Med* 2007;18:235–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2006.09.033>.
- [80] Vechi HT, Sousa ASV de, Cunha MA da, Shaw JJ, Luz KG. Case Report: Combination Therapy with Liposomal Amphotericin B, N-Methyl Meglumine Antimoniate, and Pentamidine Isethionate for Disseminated Visceral Leishmaniasis in a Splenectomized Adult Patient. *Am J Trop Med Hyg* 2020;102:268–73.

- <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0999>.
- [81] Rana A, Gadde A, Lippi L, Bansal SB. Visceral Leishmaniasis After Kidney Transplant: An Unusual Presentation and Mode of Diagnosis. *Exp Clin Transplant* 2021. <https://doi.org/10.6002/ect.2021.0160>.
 - [82] Eichenberger A, Buechi AE, Neumayr A, Hatz C, Rauch A, Huguenot M, et al. A severe case of visceral leishmaniasis and liposomal amphotericin B treatment failure in an immunosuppressed patient 15 years after exposure. *BMC Infect Dis* 2017;17:81. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2192-4>.
 - [83] Raina S, Raina RK, Bodh A, Rana BS, Sharma R. Gastrointestinal leishmaniasis in non-endemic region. *J Assoc Physicians India* 2017;65:106–7.
 - [84] Bel Haj Salah M, Mekni A, Khanfir M, Bellil K, Benhaha-Bellil S, Chelly I, et al. Mode de révélation inhabituel d'une leishmaniose viscérale chez un sujet immunocompétent. *Médecine Mal Infect* 2006;36:167–9. <https://doi.org/10.1016/J.MEDMAL.2005.11.013>.
 - [85] Sreenivasa Baba C, Makharia GK, Mathur P, Ray R, Datta Gupta S, Samantaray JC. Case Snippets Chronic diarrhea and malabsorption caused by *Leishmania donovani*. 2006.
 - [86] Hicks L, Kant P, Tay PH, Vincini V, Schuster H, Rotimi O, et al. Visceral Leishmaniasis presenting with intestinal failure: a case report and literature review. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21:117–22. <https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e32830e6fdb>.
 - [87] Alvarez-Nebreda ML. Unusual duodenal presentation of leishmaniasis. *J Clin Pathol* 2005;58:1321–2. <https://doi.org/10.1136/jcp.2005.027029>.
 - [88] Mangoud AM, Badr MA, Morsy TA. An acute case of infantile visceral leishmaniasis histopathological and histochemical studies. *J Egypt Soc Parasitol* 1992;22:617–21.
 - [89] Boukthir S, Mejri A, M'rad S, Barsaoui S. Visceral leishmaniasis diagnosed on duodenal biopsy in a child. *Acta Gastroenterol Belg* n.d.;66:258–9.
 - [90] Diro E, Lynen L, Gebregziabher B, Assefa A, Lakew W, Belew Z, et al. Clinical aspects of paediatric visceral leishmaniasis in North-west Ethiopia. *Trop Med Int Heal* 2015;20:8–16. <https://doi.org/10.1111/tmi.12407>.
 - [91] Mengesha B, Endris M, Takele Y, Mekonnen K, Tadesse T, Feleke A, et al. Prevalence of malnutrition and associated risk factors among adult visceral leishmaniasis patients in Northwest Ethiopia: a cross sectional study. *BMC Res Notes* 2014;7:75. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-75>.
 - [92] Luz KG, Tuon FF, Duarte MIS, Maia GM, Matos P, Ramos AM de O, et al. Cytokine expression in the duodenal mucosa of patients with visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010;43:393–5. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000400011>.
 - [93] Chattopadhyay A, Mittal S, Gupta K, Dhir V, Jain S. Intestinal leishmaniasis. *Clin Microbiol Infect* 2020;26:1345–6. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.05.003>.
 - [94] Tajebe F, Getahun M, Adem E, Hailu A, Lemma M, Fikre H, et al. Disease severity in patients with visceral leishmaniasis is not altered by co-infection with intestinal parasites. *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11:e0005727. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005727>.
 - [95] Matsumoto PSS, Hiramoto RM, Pereira VBR, Camprigher VM, Taniguchi HH, de Raeffray Barbosa JE, et al. Impact of the dog population and household environment for the maintenance of natural foci of *Leishmania infantum* transmission to human and animal hosts in endemic areas for visceral leishmaniasis in Sao Paulo state, Brazil. *PLoS One* 2021;16:e0256534. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256534>.
 - [96] Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 2004;7:338–49. <https://doi.org/10.1590/S1415->

- 790X2004000300011.
- [97] Belo VS, Werneck GL, Barbosa DS, Simões TC, Nascimento BWL, da Silva ES, et al. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7:e2182. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002182>.
 - [98] Teixeira-Neto RG, Da Silva ES, Nascimento RA, Belo VS, De Oliveira CDL, Pinheiro LC, et al. Canine visceral leishmaniasis in an urban setting of Southeastern Brazil: An ecological study involving spatial analysis. *Parasites and Vectors* 2014;7:1–10. <https://doi.org/10.1186/S13071-014-0485-7/FIGURES/5>.
 - [99] Figueiredo MM, Deoti B, Amorim IF, Pinto AJWW, Moraes A, Carvalho CS, et al. Expression of Regulatory T Cells in Jejunum, Colon, and Cervical and Mesenteric Lymph Nodes of Dogs Naturally Infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun* 2014;82:3704–12. <https://doi.org/10.1128/IAI.01862-14>.
 - [100] Silva DT, Neves MF, de Queiroz NMGP, Spada JCP, Alves ML, Flóro e Silva M, et al. Correlation study and histopathological description of intestinal alterations in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Rev Bras Parasitol Veterinária* 2016;25:24–36. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016009>.
 - [101] Adamama-Moraitou KK, Rallis TS, Koytinas AF, Tontis D, Plevraki K, Kritsepi M. Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. *Am J Trop Med Hyg* 2007;76:53–7.
 - [102] Figueiredo MM, Amorim IF, Pinto AJ, Barbosa VS, de Jesus Pinheiro L, Deoti B, et al. Expression of Toll-like receptors 2 and 9 in cells of dog jejunum and colon naturally infected with *Leishmania infantum*. *BMC Immunol* 2013;14:22. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-14-22>.
 - [103] da Silva DT, Alves ML, Spada JCP, da Silveira R de CV, Oliveira TMF de S, Starke-Buzetti WA. Neutrophils, eosinophils, and mast cells in the intestinal wall of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Rev Bras Parasitol Vet* 2018;27:430–8. <https://doi.org/10.1590/s1984-296120180085>.
 - [104] González JL, Fermin ML, Garcia P, Rollan E, Castaño M. Erosive Colitis in Experimental Canine Leishmaniasis. *J Vet Med Ser B* 1990;37:377–82. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1990.tb01072.x>.
 - [105] Ayala I, Bernal LJ, Garcia-Martinez JD, Gomez MA, Navarro JA, Bernabe A. An Atypical Case of Leishmaniasis Associated with Chronic Duodenitis in a Dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 2017;53:101–6. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6401>.
 - [106] Saldanha-Elias AM, Silva MA, Silva VO, Amorim SLA, Coutinho AR, Santos HA, et al. Prevalence of Endoparasites in Urban Stray Dogs from Brazil Diagnosed with *Leishmania*, with Potential for Human Zoonoses. *Acta Parasitol* 2019;64:352–9. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00043-x>.
 - [107] Lewis MD, Paun A, Romano A, Langston H, Langner CA, Moore IN, et al. Fatal progression of experimental visceral leishmaniasis is associated with intestinal parasitism and secondary infection by commensal bacteria, and is delayed by antibiotic prophylaxis 2020;16:e1008456. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008456>.
 - [108] De Alencar JE, Castracane J, Jeronimo SMB, Evans T, Pearson RD, Drew JS, et al. Visceral Leishmaniasis: a Model for Infection-Induced Cachexia. *Am J Trop Med Hyg* 1992;47:8–15. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1992.47.8>.
 - [109] Souza KD, Fernandes EPA, Santos AGA, Lima LL, Gonzaga WFKM, Xander P, et al. Infection by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* causes intestinal changes B-1 cells dependent. *Parasite Immunol* 2019;41. <https://doi.org/10.1111/pim.12661>.
 - [110] Gaitán-Albarracín F, Losada-Barragán M, Pinho N, Azevedo R, Durães J, Arcila-Barrera JS, et al. Malnutrition aggravates alterations observed in the gut structure and

- immune response of mice infected with *Leishmania infantum*. Microorganisms 2021;9. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9061270/S1>.
- [111] Passos FC, Gois MB, Sousa AD, de Marinho AIL, Corvo L, Soto M, et al. Investigating associations between intestinal alterations and parasite load according to *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. abundance in the gut microbiota of hamsters infected by *Leishmania infantum*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2020;115:1–11. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200377>.
- [112] Morsy TA, Mangoud AM, Ramadan ME, Mostafa SM, El-Sharkawy IM. The histopathology of the intestine in hamsters infected with *Leishmania D. infantum* on top of pre-existing schistosomiasis mansoni. J Egypt Soc Parasitol 1998;28:347–54.
- [113] González-Sánchez ME, Cuquerella M, Alunda JM. Superimposed visceral leishmanial infection aggravates response to *Heligmosomoides polygyrus*. Parasit Vectors 2018;11:404. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2987-1>.
- [114] Classon C, Feng X, Eidsmo L, Nylén S. Intestinal nematode infection exacerbates experimental visceral leishmaniasis. Parasite Immunol 2019;41:e12618. <https://doi.org/10.1111/pim.12618>.
- [115] González JL, Insa F, Novoa C, Pizarro M. Intestinal amyloidosis in hamsters with visceral leishmaniasis. Br J Exp Pathol 1986;67:353–60.
- [116] Mangoud AM, Ramadan ME, Morsy TA, Amin AM, Mostafa SM. Histopathological studies of Syrian golden hamsters experimentally infected with *Leishmania D. infantum*. J Egypt Soc Parasitol 1997;27:689–702.
- [117] Santos De Lima SK, Novais Cavallone I, Soares Oliveira K, Felipe L, Passero D, Dalastra Laurenti M, et al. Infection with *Leishmania (Leishmania) infantum* Changes the Morphology and Myenteric Neurons of the Jejunum of Golden Hamsters. Parasitol 2021, Vol 1, Pages 225-237 2021;1:225–37. <https://doi.org/10.3390/PARASITOLOGIA1040024>.
- [118] Losada-Barragán M, Umanã-Pérez A, Cuervo-Escobar S, Berbert LR, Porrozzi R, Morgado FN, et al. Protein malnutrition promotes dysregulation of molecules involved in T cell migration in the thymus of mice infected with *Leishmania infantum*. Sci Rep 2017;7. <https://doi.org/10.1038/SREP45991>.
- [119] Cuervo-Escobar S, Losada-Barragán M, Umaña-Pérez A, Porrozzi R, Saboia-Vahia L, Miranda LHM, et al. T-Cell Populations and Cytokine Expression Are Impaired in Thymus and Spleen of Protein Malnourished BALB/c Mice Infected with *Leishmania infantum*. PLoS One 2014;9. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0114584>.
- [120] Azeredo-Coutinho RBG, Pimentel MI, Zanini GM, Madeira MF, Cataldo JI, Schubach AO, et al. Intestinal helminth coinfection is associated with mucosal lesions and poor response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. Acta Trop 2016;154:42–9. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2015.10.015>.
- [121] Page B, Lago A, Silva JA, Schriefer A, Lago J, Oliveira L, et al. Influence of Intestinal Helminth Burden on Clinical Manifestations, Therapeutic Response, and *Leishmania braziliensis* Load in Patients with New World Cutaneous Leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 2021;105:1060–6. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-1664>.
- [122] Amaral JF, Gomes-Santos AC, Paula-Silva J, Nicoli JR, Vieira LQ, Faria AMC, et al. Antigenic dietary protein guides maturation of the host immune system promoting resistance to *Leishmania major* infection in C57BL/6 mice. Immunology 2010;129:455–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03198.x>.
- [123] Yoshida A, Maruyama H, Yabu Y, Amano T, Kobayakawa T, Ohta N. Immune responses against protozoal and nematodal infection in mice with underlying *Schistosoma mansoni* infection. Parasitol Int 1999;48:73–9. [https://doi.org/10.1016/S1383-5769\(99\)00006-9](https://doi.org/10.1016/S1383-5769(99)00006-9).

- [124] Santos AGA dos, Ferlini J de P, Vicentino SL, Lonardoni MVC, Sant'Ana D de MG, Melo G de AN de, et al. Alterations induced in the ileum of mice upon inoculation with different species of *Leishmania*: a preliminary study. *Rev Soc Bras Med Trop* 2018;51:537–41. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0348-2017>.
- [125] Santos AGA dos, da Silva MGL, Carneiro EL, de Lima LL, Fernandes ACBS, Silveira TGV, et al. A New Target Organ of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Chronic Infection: The Intestine. *Front Cell Infect Microbiol* 2021;0:626. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.687499>.
- [126] Tortora GJ, Derrickson B. *Princípios de Anatomia e Fisiologia*. 14th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2016.
- [127] Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia Básica*. 13th ed. Rio de Janeiro: 2017.
- [128] Nezami BG, Srinivasan S. Enteric nervous system in the small intestine: Pathophysiology and clinical implications. *Curr Gastroenterol Rep* 2010;12:358–65. <https://doi.org/10.1007/s11894-010-0129-9>.
- [129] Walsh KT, Zemper AE. The Enteric Nervous System for Epithelial Researchers: Basic Anatomy, Techniques, and Interactions With the Epithelium. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2019;8:369–78. <https://doi.org/10.1016/J.JCMGH.2019.05.003>.
- [130] Christofi FL. Purinergic receptors and gastrointestinal secretomotor function. *Purinergic Signal* 2008;4:213–36. <https://doi.org/10.1007/s11302-008-9104-4>.
- [131] Kusindarta DL, Wihadmadyatami H. The Role of Extracellular Matrix in Tissue Regeneration. *Tissue Regen* 2018. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.75728>.
- [132] Lin J, Shi Y, Men Y, Wang X, Ye J, Zhang C. Mechanical roles in formation of oriented collagen fibers. *Tissue Eng - Part B Rev* 2020;26:116–28. https://doi.org/10.1089/TEN.TEB.2019.0243/ASSET/IMAGES/LARGE/TEN.TEB.2019.0243_FIGURE10.JPEG.
- [133] Wang C, Brisson BK, Terajima M, Li Q, Hoxha K, Han B, et al. Type III Collagen is a Key Regulator of the Collagen Fibrillar Structure and Biomechanics of Articular Cartilage and Meniscus. *Matrix Biol* 2020;85–86:47. <https://doi.org/10.1016/J.MATBIO.2019.10.001>.
- [134] Henriksen K, Karsdal MA. Type I Collagen. *Biochem. Collagens, Laminins Elastin*, Elsevier; 2016, p. 1–11. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809847-9.00001-5>.
- [135] Xue M, Jackson CJ. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Adv Wound Care* 2015;4:119. <https://doi.org/10.1089/WOUND.2013.0485>.
- [136] Nielsen MJ, Karsdal MA. Type III Collagen. *Biochem. Collagens, Laminins Elastin*, Elsevier; 2016, p. 21–30. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809847-9.00003-9>.
- [137] Kuivaniemi H, Tromp G. Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases. *Gene* 2019;707:151. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2019.05.003>.
- [138] Liu X, Wu H, Byrne M, Krane S, Jaenisch R. Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:1852–6. <https://doi.org/10.1073/PNAS.94.5.1852/ASSET/FA2C3B0B-07C2-4437-85B7-DBF0C51EB15A/ASSETS/GRAPHIC/PQ0573829005.JPEG>.
- [139] Gonzalez ACDO, Andrade ZDA, Costa TF, Medrado ARAP. Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol* 2016;91:614–20. <https://doi.org/10.1590/ABD1806-4841.20164741>.
- [140] Velez AMA, Howard MS. Collagen IV in Normal Skin and in Pathological Processes. *N Am J Med Sci* 2012;4:1. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.92892>.
- [141] Sand JMB, Genovese F, Karsdal MA. Type IV Collagen. *Biochem. Collagens, Laminins Elastin*, Elsevier; 2016, p. 31–41. [https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809847-](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809847-9)

- 9.00004-0.
- [142] Boudry G, Yang P-C, Perdue MH. Small Intestine, Anatomy. *Encycl. Gastroenterol.*, Elsevier; 2004, p. 404–9. <https://doi.org/10.1016/B0-12-386860-2/00648-1>.
 - [143] Chassaing B, Kumar M, Baker MT, Singh V, Vijay-Kumar M. Mammalian gut immunity. *Biomed J* 2014;37:246–58. <https://doi.org/10.4103/2319-4170.130922>.
 - [144] Bauer ME, Teixeira AL. Neuroinflammation in Mood Disorders: Role of Regulatory Immune Cells. *Neuroimmunomodulation* 2021;28:99–107. <https://doi.org/10.1159/000515594>.
 - [145] Jørgensen PB, Fenton TM, Mörbe UM, Riis LB, Jakobsen HL, Nielsen OH, et al. Identification, isolation and analysis of human gut-associated lymphoid tissues. *Nat Protoc* 2021;16:2051–67. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-00482-1>.
 - [146] Mörbe UM, Jørgensen PB, Fenton TM, von Burg N, Riis LB, Spencer J, et al. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal Immunol* 2021;14:793–802. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00389-4>.
 - [147] Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol* 2014;14:667–85. <https://doi.org/10.1038/nri3738>.
 - [148] Santaolalla R, Fukata M, Abreu MT. Innate immunity in the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol* 2011;27:125–31. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e3283438dea>.
 - [149] Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 9th ed. Philadelphia: Elsevier; 2017.
 - [150] Danese S. Nonimmune cells in inflammatory bowel disease: from victim to villain. *Trends Immunol* 2008;29:555–64. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.07.009>.
 - [151] Vitale S, Picascia S, Gianfrani C. The cross-talk between enterocytes and intraepithelial lymphocytes. *Mol Cell Pediatr* 2016;3:20. <https://doi.org/10.1186/s40348-016-0048-4>.
 - [152] Yoo BB, Mazmanian SK. The Enteric Network: Interactions between the Immune and Nervous Systems of the Gut. *Immunity* 2017;46:910–26. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.05.011>.
 - [153] Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 2018.
 - [154] Zhang M, Wu C. The relationship between intestinal goblet cells and the immune response. *Biosci Rep* 2020;40:20201471. <https://doi.org/10.1042/BSR20201471>.
 - [155] Corfield AP. The Interaction of the Gut Microbiota with the Mucus Barrier in Health and Disease in Human. *Microorg* 2018, Vol 6, Page 78 2018;6:78. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS6030078>.
 - [156] Yang S, Yu M. Role of Goblet Cells in Intestinal Barrier and Mucosal Immunity. *J Inflamm Res* 2021;Volume 14:3171–83. <https://doi.org/10.2147/JIR.S318327>.
 - [157] Knoop KA, Newberry RD. Goblet cells: multifaceted players in immunity at mucosal surfaces 2018;11.
 - [158] Shan M, Gentile M, Yeiser JR, Walland AC, Bornstein VU, Chen K, et al. Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. *Science* 2013;342:447–53. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1237910>.
 - [159] Yu Y, Yang W, Li Y, Cong Y. Enteroendocrine Cells: Sensing Gut Microbiota and Regulating Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2020;26:11–20. <https://doi.org/10.1093/IBD/IZZ217>.
 - [160] Woźniak D, Cichy W, Przysławski J, Drzymała-Czyż S. The role of microbiota and enteroendocrine cells in maintaining homeostasis in the human digestive tract. *Adv Med Sci* 2021;66:284–92. <https://doi.org/10.1016/J.ADVMS.2021.05.003>.
 - [161] Kuwahara A, Matsuda K, Kuwahara Y, Asano S, Inui T, Marunaka Y. Microbiota-gut-brain axis: enteroendocrine cells and the enteric nervous system form an interface between the microbiota and the central nervous system. *Biomed Res* 2020;41:199–216.

- <https://doi.org/10.2220/BIOMEDRES.41.199>.
- [162] Hendel SK, Kellermann L, Hausmann A, Bindslev N, Jensen KB, Nielsen OH. Tuft Cells and Their Role in Intestinal Diseases. *Front Immunol* 2022;13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.822867>.
 - [163] Rajeev S, Sosnowski O, Li S, Allain T, Buret AG, McKay DM. Enteric Tuft Cells in Host-Parasite Interactions. *Pathogens* 2021;10. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10091163>.
 - [164] Luo XC, Chen ZH, Xue JB, Zhao DX, Lu C, Li YH, et al. Infection by the parasitic helminth *Trichinella spiralis* activates a Tas2r-mediated signaling pathway in intestinal tuft cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116:5564–9. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1812901116>.
 - [165] Nadjisombati MS, McGinty JW, Lyons-Cohen MR, Jaffe JB, DiPeso L, Schneider C, et al. Detection of Succinate by Intestinal Tuft Cells Triggers a Type 2 Innate Immune Circuit. *Immunity* 2018;49:33–41.e7. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2018.06.016>.
 - [166] Zhu G, Hu J, Xi R. The cellular niche for intestinal stem cells: a team effort. *Cell Regen* 2021;10. <https://doi.org/10.1186/S13619-020-00061-5>.
 - [167] Barreto e Barreto L, Rattes IC, da Costa A V., Gama P. Paneth cells and their multiple functions. *Cell Biol Int* 2022. <https://doi.org/10.1002/CBIN.11764>.
 - [168] Mei X, Gu M, Li M. Plasticity of Paneth cells and their ability to regulate intestinal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2020;11. <https://doi.org/10.1186/S13287-020-01857-7>.
 - [169] Chen Y, Ye Z, Seidler U, Tian D, Xiao F. Microenvironmental regulation of intestinal stem cells in the inflamed intestine. *Life Sci* 2021;273:119298. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2021.119298>.
 - [170] Snippert HJ, van der Flier LG, Sato T, van Es JH, van den Born M, Kroon-Veenboer C, et al. Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell* 2010;143:134–44. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.09.016>.
 - [171] Van Der Flier LG, Clevers H. Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PHYSIOL.010908.163145>.
 - [172] Sumida H. Dynamics and clinical significance of intestinal intraepithelial lymphocytes. <https://doi.org/10.1080/25785826.2019.1658516>.
 - [173] Ma H, Qiu Y, Yang H. Intestinal intraepithelial lymphocytes: Maintainers of intestinal immune tolerance and regulators of intestinal immunity. *J Leukoc Biol* 2021;109:339. <https://doi.org/10.1002/JLB.3RU0220-111>.
 - [174] Park SG, Mathur R, Long M, Hosh N, Hao L, Hayden MS, et al. T Regulatory cells maintain intestinal homeostasis by suppressing $\gamma\delta$ T cells. *Immunity* 2010;33:791–803. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2010.10.014>.
 - [175] Eberl G, Colonna M, Santo JPD, McKenzie ANJ. Innate lymphoid cells: A new paradigm in immunology. *Science* (80) 2015;348. <https://doi.org/10.1126/science.aaa6566>.
 - [176] Zheng M, Zhu J. Innate Lymphoid Cells and Intestinal Inflammatory Disorders. *Int J Mol Sci* 2022;23. <https://doi.org/10.3390/IJMS23031856>.
 - [177] Panda SK, Colonna M. Innate lymphoid cells in mucosal immunity. *Front Immunol* 2019;10:861. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00861/BIBTEX>.
 - [178] Jowett GM, Norman MDA, Yu TTL, Rosell Arévalo P, Hoogland D, Lust ST, et al. ILC1 drive intestinal epithelial and matrix remodelling. *Nat Mater* 2020 2020;20:250–9. <https://doi.org/10.1038/s41563-020-0783-8>.
 - [179] Ihara S, Hirata Y, Koike K. TGF- β in inflammatory bowel disease: a key regulator of immune cells, epithelium, and the intestinal microbiota. *J Gastroenterol* 2017;52:777–87. <https://doi.org/10.1007/s00535-017-1350-1>.

- [180] Biancheri P, Giuffrida P, Docena GH, MacDonald TT, Corazza GR, Di Sabatino A. The role of transforming growth factor (TGF)- β in modulating the immune response and fibrogenesis in the gut. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014;25:45–55. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2013.11.001>.
- [181] Albert-Bayo M, Paracuellos I, González-Castro AM, Rodríguez-Urrutia A, Rodríguez-Lagunas MJ, Alonso-Cotoner C, et al. Intestinal Mucosal Mast Cells: Key Modulators of Barrier Function and Homeostasis. *Cells* 2019;8:135. <https://doi.org/10.3390/CELLS8020135>.
- [182] Merluzzi S, Frossi B, Gri G, Parusso S, Tripodo C, Pucillo C. Mast cells enhance proliferation of B lymphocytes and drive their differentiation toward IgA-secreting plasma cells. *Blood* 2010;115:2810–7. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2009-10-250126>.
- [183] Kennelly R, B.Conneely J, Bouchier-Hayes D, C. Winter D. Mast Cells in Tissue Healing: From Skin to the Gastrointestinal Tract. *Curr Pharm Des* 2011;17:3772–5. <https://doi.org/10.2174/138161211798357854>.
- [184] Hamilton MJ, Frei SM, Stevens RL. The multifaceted mast cell in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20:2364–78. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000142>.
- [185] De Winter BY, van den Wijngaard RM, de Jonge WJ. Intestinal mast cells in gut inflammation and motility disturbances. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2012;1822:66–73. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2011.03.016>.
- [186] Dudeck J, Kotrba J, Immler R, Hoffmann A, Voss M, Alexaki VI, et al. Directional mast cell degranulation of tumor necrosis factor into blood vessels primes neutrophil extravasation. *Immunity* 2021;54:468–483.e5. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2020.12.017>.
- [187] da Silva EZM, Jamur MC, Oliver C. Mast Cell Function: A New Vision of an Old Cell. *J Histochem Cytochem* 2014;62:698–738. <https://doi.org/10.1369/0022155414545334>.
- [188] Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG. Mast cell: A multi-functional master cell. *Front Immunol* 2016;6:620. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2015.00620/BIBTEX>.
- [189] Zuani M De, Secco CD, Frossi B. Mast cells at the crossroads of microbiota and IBD. *Eur J Immunol* 2018;48:1929–37. <https://doi.org/10.1002/EJI.201847504>.
- [190] Buhner S, Schemann M. Mast cell-nerve axis with a focus on the human gut. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2012;1822:85–92. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.06.004>.
- [191] Traina G. The role of mast cells in the gut and brain. *J Integr Neurosci* 2021;20:185. <https://doi.org/10.31083/j.jin.2021.01.313>.
- [192] Furness JB. The enteric nervous system. Blackwell Pub; 2006.
- [193] Furness JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;9:286–94. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.32>.
- [194] Furness JB, Callaghan BP, Rivera LR, Cho HJ. The Enteric Nervous System and Gastrointestinal Innervation: Integrated Local and Central Control. *Adv Exp Med Biol* 2014;817:39–71. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_3.
- [195] Brehmer A. Classification of human enteric neurons. *Histochem Cell Biol* 2021;156:95–108. <https://doi.org/10.1007/S00418-021-02002-Y/TABLES/2>.
- [196] Morarach K, Mikhailova A, Knoflach V, Memic F, Kumar R, Li W, et al. Diversification of molecularly defined myenteric neuron classes revealed by single-cell RNA sequencing. *Nat Neurosci* 2020 241 2020;24:34–46. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00736-x>.
- [197] Fung C, Vanden Berghe P. Functional circuits and signal processing in the enteric

- nervous system. *Cell Mol Life Sci* 2020;77:4505. <https://doi.org/10.1007/S00018-020-03543-6>.
- [198] Neunlist M, Rolli-Derkinderen M, Latorre R, Van Landeghem L, Coron E, Derkinderen P, et al. Enteric Glial Cells: Recent Developments and Future Directions. *Gastroenterology* 2014;147:1230–7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.09.040>.
- [199] Chow AK, Gulbransen BD. Potential roles of enteric glia in bridging neuroimmune communication in the gut. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 2017;312:G145–52. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00384.2016>
- [200] Delvalle NM, Dharshika C, Morales-Soto W, Fried DE, Gaudette L, Gulbransen BD. Communication Between Enteric Neurons, Glia, and Nociceptors Underlies the Effects of Tachykinins on Neuroinflammation. *CMGH* 2018;6:321–44. <https://doi.org/10.1016/J.JCMGH.2018.05.009>
- [201] Grubišić V, Verkhatsky A, Zorec R, Parpura V. Enteric glia regulate gut motility in health and disease. *Brain Res Bull* 2018;136:109. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2017.03.011>.
- [202] Guo Y, Gao S, Jiang Z, Huang J, He X, Jin R, et al. Calcium-sensing receptor (CaSR) agonist R568 inhibits small intestinal motility of mice through neural and non-neural mechanisms. *Food Funct* 2021;12:11926–37. <https://doi.org/10.1039/D1FO01988K>.
- [203] Mazzoni M, Caremoli F, Cabanillas L, de los Santos J, Million M, Larauche M, et al. Quantitative analysis of enteric neurons containing choline acetyltransferase and nitric oxide synthase immunoreactivities in the submucosal and myenteric plexuses of the porcine colon. *Cell Tissue Res* 2021;383:645–54. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03286-7>.
- [204] Guimaraes de Souza Melo C, Nelisis Zanoni J, Raquel Garcia de Souza S, Zignani I, de Lima Leite A, Domingues Heubel A, et al. Global Proteomic Profile Integrated to Quantitative and Morphometric Assessment of Enteric Neurons: Investigation of the Mechanisms Involved in the Toxicity Induced by Acute Fluoride Exposure in the Duodenum. *Neurotox Res* 2021;39:800–14. <https://doi.org/10.1007/S12640-020-00296-9>.
- [205] Toole L, Belai A, Burnstock G. A neurochemical characterisation of the golden hamster myenteric plexus. *Cell Tissue Res* 1998;291:385–94. <https://doi.org/10.1007/s004410051008>.
- [206] Rychlik A, Gonkowski S, Nowicki M, Calka J. Inflammatory bowel disease affects density of nitrergic nerve fibers in the mucosal layer of the canine gastrointestinal tract. *Can J Vet Res* 2017;81:129–36.
- [207] Kopincová J, Púzserová A, Bernátová I. Biochemical aspects of nitric oxide synthase feedback regulation by nitric oxide. *Interdiscip Toxicol* 2011;4. <https://doi.org/10.2478/v10102-011-0012-z>.
- [208] Szymanska K, Calka J, Gonkowski S. Nitric oxide as an active substance in the enteric neurons of the porcine digestive tract in physiological conditions and under intoxication with bisphenol A (BPA). *Nitric Oxide* 2018;80:1–11. <https://doi.org/10.1016/J.NIOX.2018.08.001>.
- [209] Cairns BR, Jevans B, Chanpong A, Moulding D, McCann CJ. Automated computational analysis reveals structural changes in the enteric nervous system of nNOS deficient mice. *Sci Reports* 2021 111 2021;11:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96677-x>.
- [210] Ekblad E, Bauer AJ. Role of vasoactive intestinal peptide and inflammatory mediators in enteric neuronal plasticity. *Neurogastroenterol Motil* 2004;16:123–8. <https://doi.org/10.1111/j.1743-3150.2004.00487.x>.
- [211] Rzap D, Czajkowska M, Całka J. Neurochemical Plasticity of nNOS-, VIP- and

- CART-Immunoreactive Neurons Following Prolonged Acetylsalicylic Acid Supplementation in the Porcine Jejunum. *Int J Mol Sci* 2020;21:2157. <https://doi.org/10.3390/ijms21062157>.
- [212] Jacobson A, Yang D, Vella M, Chiu IM. The intestinal neuro-immune axis: crosstalk between neurons, immune cells, and microbes. *Mucosal Immunol* 2021;1–11. <https://doi.org/10.1038/s41385-020-00368-1>.
- [213] Forsythe P. Mast Cells in Neuroimmune Interactions. *Trends Neurosci* 2019;42:43–55. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.09.006>.
- [214] Muller PA, Koscsó B, Rajani GM, Stevanovic K, Berres ML, Hashimoto D, et al. Crosstalk between Muscularis Macrophages and Enteric Neurons Regulates Gastrointestinal Motility. *Cell* 2014;158:300–13. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.04.050>.
- [215] De Schepper S, Verheijden S, Aguilera-Lizarraga J, Viola MF, Boesmans W, Stakenborg N, et al. Self-Maintaining Gut Macrophages Are Essential for Intestinal Homeostasis. *Cell* 2018;175:400–415.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.048>.
- [216] Ozaki H, Kawai T, Shuttleworth CW, Won K-J, Suzuki T, Sato K, et al. Isolation and characterization of resident macrophages from the smooth muscle layers of murine small intestine. *Neurogastroenterol Motil* 2004;16:39–51. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2982.2003.00461.x>.
- [217] Dora D, Ferenczi S, Stavely R, Toth VE, Varga Z V., Kovacs T, et al. Evidence of a Myenteric Plexus Barrier and Its Macrophage-Dependent Degradation During Murine Colitis: Implications in Enteric Neuroinflammation. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2021;12:1617–41. <https://doi.org/10.1016/J.JCMGH.2021.07.003>.
- [218] Stavely R, Abalo R, Nurgali K. Targeting Enteric Neurons and Plexitis for the Management of Inflammatory Bowel Disease. *Curr Drug Targets* 2020;21:1428–39. <https://doi.org/10.2174/1389450121666200516173242>.

CAPÍTULO II

Artigo 1:

“A New Target Organ of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Chronic Infection: The Intestine”

Publicado no periódico *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.

doi: [10.3389/fcimb.2021.687499](https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.687499)



A New Target Organ of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Chronic Infection: The Intestine

Amanda Gubert Alves dos Santos¹, Maria Gabriela Lima da Silva¹, Erick Lincoln Carneiro², Lainy Leiny de Lima³, Andrea Claudia Bekner Silva Fernandes², Thaís Gomes Verzignassi Silveira², Debora de Mello Gonçalves Sant'Ana^{1,3} and Gessilda de Alcantara Nogueira-Melo^{1,2*}

¹ Biosciences and Physiopathology Program, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil, ² Department of Clinical Analysis and Biomedicine, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil, ³ Department of Morphological Sciences, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Wander Pavanelli,
State University of Londrina, Brazil

Reviewed by:

Saikat Majumder,
University of Pittsburgh, United States
Michael Lewis,
University of London, United Kingdom

*Correspondence:

Gessilda de Alcantara Nogueira-Melo
ganmelo2@uem.br

Specialty section:

This article was submitted to
Parasite and Host,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and
Infection Microbiology

Received: 29 March 2021

Accepted: 22 June 2021

Published: 14 July 2021

Citation:

Santos AGA, da Silva MGL,
Carneiro EL, de Lima LL,
Fernandes ACBS, Silveira TGV,
Sant'Ana DMG and
Nogueira-Melo GA (2021)
A New Target Organ of
Leishmania (Viannia) braziliensis
Chronic Infection: The Intestine.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 11:687499.
doi: 10.3389/fcimb.2021.687499

Leishmania (Viannia) braziliensis is one of the main causes of cutaneous leishmaniasis in the Americas. This species presents genetic polymorphism that can cause destructive lesions in oral, nasal, and oropharyngeal tracts. In a previous study, the parasite caused several histopathological changes to hamster ileums. Our study evaluates immune response components, morphological changes, and effects on neurons in the ileums of hamsters infected by three different strains of *L. (V.) braziliensis* in two infection periods. For the experiment, we separated hamsters into four groups: a control group and three infected groups. Infected hamsters were euthanized 90- or 120-days post infection. We used three strains of *L. (V.) braziliensis*: the reference MHOM/BR/1975/M2903 and two strains isolated from patients who had different responses to Glucantime® treatment (MHOM/BR/2003/2314 and MHOM/BR/2000/1655). After laparotomy, ileums were collected for histological processing, biochemical analysis, and evaluation of neurons in the myenteric and submucosal plexuses of the enteric nervous system (ENS). The results demonstrated the increase of blood leukocytes after the infection. Optical microscopy analysis showed histopathological changes with inflammatory infiltrates, edemas, ganglionitis, and *Leishmania* amastigotes in the ileums of infected hamsters. We observed changes in the organ histoarchitecture of infected hamsters when compared to control groups, such as thicker muscular and submucosa layers, deeper and wider crypts, and taller and broader villi. The number of intraepithelial lymphocytes and TGF- β -immunoreactive cells increased in all infected groups when compared to the control groups. Mast cells increased with longer infection periods. The infection also caused remodeling of intestinal collagen and morphometry of myenteric and submucosal plexus neurons; but this effect was dependent on infection duration. Our results show that *L. (V.) braziliensis* infection caused time-dependent alterations in hamster ileums. This was demonstrated by the reduction of inflammatory cells and the increase of tissue regeneration factors at 120 days of infection. The infected groups demonstrated

different profiles in organ histoarchitecture, migration of immune cells, and morphometry of ENS neurons. These findings suggest that the small intestine (or at least the ileum) is a target organ for *L. (V.) braziliensis* infection, as the infection caused changes that were dependent on duration and strain.

Keywords: leishmaniasis, small intestine, inflammation, enteric nervous system, TGF- β

INTRODUCTION

Leishmania (Viannia) braziliensis is one of the main species that causes cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the Americas (Patino et al., 2020). In 2018, the World Health Organization reported 253,435 new cases of cutaneous leishmaniasis. More than 46,000 of these cases were in the Americas (World Health Organization, 2020); 84% of these cases occurred in Brazil (Pan American Health Organization, 2019), that is considered a “high burden country” for leishmaniasis (World Health Organization, 2020). The disease primarily affects poor segments of the population and results in negative social and economic impacts (Ministério da Saúde, 2017).

The diversity of clinical forms of leishmaniasis caused by *L. (V.) braziliensis* and disease severity are related to the immune system (Fernandes et al., 2016), genetic factors, the clinical condition of the host (Quaresma et al., 2018), and the inoculum (Ribeiro-Romão et al., 2014) and strain of the parasite (Vieira et al., 2019); this species presents high levels of genetic polymorphism (Patino et al., 2020). Different strains found in the same region can cause different clinical forms (Guimarães et al., 2016; Quaresma et al., 2018; Rugani et al., 2018) and therapeutic responses (Fernandes et al., 2016; Gagini et al., 2017), even in the same patient (Hoyos et al., 2019). Lesions are destructive and principally affect the skin and mucus membranes in the oral, nasal, and oropharyngeal tracts (Ministério da Saúde, 2017; Conceição-Silva and Morgado, 2019). Furthermore, studies have reported the occurrence of lesions in the eye (Cruz et al., 2017) and larynx (Silva et al., 2017). The DNA of the parasite has also been detected in bone marrow of immunocompromised patients (Gontijo et al., 2002; Silva et al., 2002).

Studies have reported the presence of amastigotes of the parasite in spleens, lymph nodes (Almeida et al., 1996; Gomes-Silva et al., 2013; Ribeiro-Romão et al., 2014), and livers (Barral et al., 1996) of animals infected with *L. (V.) braziliensis*. In chronically-infected hamsters, our research group detected the DNA of the parasite in ileums and mesenteric lymph nodes, amastigotes in the ileums, and alterations to intestinal architecture (Santos et al., 2018b). Hamsters are good models for *L. (V.) braziliensis* infection research, as they develop lesions (De Oliveira et al., 2004; Gomes-Silva et al., 2013), clinical and histopathological manifestations (Almeida et al., 1996; Gomes-Silva et al., 2013), and immune responses (Ribeiro-Romão et al., 2014) that are similar to those observed in human leishmaniasis. With hamsters, the parasites can migrate to the viscera or other skin sites, where the parasites replicate (Almeida et al., 1996).

The effect of *Leishmania* infection in the gastrointestinal tract is the topic of studies that evaluated different segments of the intestine of dogs (Figueiredo et al., 2014; Silva et al., 2016; Silva et al., 2018) and rodents (Souza et al., 2019; Lewis et al., 2020; Passos et al., 2020) with visceral leishmaniasis (VL). In human VL, the presence of amastigote forms in intestinal tissues may be related to episodes of diarrhea (Baba et al., 2006; Soria López et al., 2016; Raina et al., 2017) or not (Chattopadhyay et al., 2020). The findings have reported higher villi and moderate inflammatory infiltrate composed mainly of mononuclear cells in the lamina propria of the duodenum (Chattopadhyay et al., 2020) and mild ulcers in the colon (Baba et al., 2006).

The intestine is the largest immune organ in mammals; it helps to maintain the equilibrium of the organism (Chassaing et al., 2014). The ileum is the final segment of the small intestine and plays an important role in its immunity. The ileum has more Peyer patches (Mowat and Agace, 2014), the highest concentration of Paneth cells (Santaolalla et al., 2011; Mowat and Agace, 2014), lymphoid aggregates (Mowat and Agace, 2014), which may be related to the highest number of bacteria in this portion of the intestine (Santaolalla et al., 2011). Specialized cells (e.g., enterocytes, goblet cells, Paneth cells, and enteroendocrines) in its epithelium participate in the innate immune response. These cells secrete substances with various functions, such as glycoproteins, antimicrobial substances, cytokines, and hormones. The lamina propria has a high quantity and variety of immune cells, such as mast cells, macrophages, dendritic cells, and lymphocytes, among others (Abbas et al., 2017). Epithelial cells and the innate and adaptive immune systems interact with the ENS to promote immune tolerance, defense, and organ regeneration (Jacobson et al., 2021).

The ENS sends and receives nerve impulses from other organs and is responsible for digestion, motility (Yoo and Mazmanian, 2017), and maintenance of intestinal homeostasis (Drokhlyansky et al., 2020). Studies have shown that the intestine is affected by *L. (V.) braziliensis* infection (Santos et al., 2018a; Santos et al., 2018b) thus, evaluating the effects of the infection from different parasite strains on histoarchitecture and immune response of the organ and ENS are essential for the understanding of the complex *Leishmania*-host relationship. As in previous studies we detected changes in the ileum (Santos et al., 2018a; Santos et al., 2018b), we carried out this research to confirm that the intestine is a target organ for infection by *L. (V.) braziliensis*. Thus, the objective of this work was to evaluate some components of the immune response, morphological and neuronal alterations in this organ of hamsters infected by other three different strains of the parasite at two different periods.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement

The animal studies were previously approved by the Ethical Committee on Animal Use of the Universidade Estadual de Maringá (UEM) under protocol number 7587260416.

Parasites

For the infection, we used three different strains of *L. (V.) braziliensis*: The World Health Organization reference strain MHOM/BR/1975/M2903 (2903) and two strains isolated from patients treated at the Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC/UEM). The two strains from UEM came from patients who had different responses to Glucantime® treatment. The patient who was infected with the MHOM/BR/2003/2314 (2314) strain showed good therapeutic response with complete lesion regression after the first treatment. The MHOM/BR/2000/1655 (1655) strain was isolated from a patient whose infection was considered resistant by reactivation of the previously-healed lesion. These isolates were cultured, cryopreserved, and identified by the Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil (Fernandes et al., 2016).

Experimental Design and Infection

For the infection, we used promastigotes in the stationary growth phase from the fifth *in vitro* passage. The parasites were cryopreserved in the Leishmaniasis Laboratory of UEM. For culture they were thawed and reactivated. They were then kept in a culture of 199 medium (Gibco Laboratories®, Grand Island, USA) and supplemented with 1% human urine, 10% fetal bovine serum, and 1% L-glutamine. For infection preparation, the hamsters were anesthetized with a combination of ketamine (Francotar®-Virbac Animal health) and xylazine (Calmiun Agener-Union Animal Health).

We used 48 female hamsters (*Mesocricetus auratus*) (21-day-old). The hamsters were randomly separated into four groups ($n = 12/\text{group}$): the control group and three groups inoculated with different isolates of *L. (V.) braziliensis*. The control group received an intradermal injection of 100 μl of phosphate-buffered saline (PBS) in the left hindpaw. The infected group received an intradermal injection of each isolate ($2 \times 10^7/100 \mu\text{l}$) in the left hindpaw. Once a week, both paws were measured using a digital pachymeter and analyzed for edema and lesions. The hamsters were weighed before infection and before euthanasia.

The hamsters were kept in a temperature-controlled environment with a light/dark cycle (12/12 hr). To avoid external contamination, we housed the animals in individually ventilated cages with autoclaved wood shavings and filtered air and water. Food and water were available *ad libitum*. The hamsters were euthanized 90- or 120-days post infection, thus forming a total of eight groups. For all experiments, we used 4–6 animals per group.

Euthanasia and Tissue Collection

Before euthanasia, blood samples were collected from the retro orbital sinus and total leukocytes were counted using a Neubauer chamber. The differential leukocyte count was determined in

blood smears (May-Grünwald-Giemsa staining technique) using light microscopy. The data is represented in box plots (median with 25 to 75 percentile), whiskers (2.5 to 97.5 percentile), and mean (+).

The hamsters were euthanized under deep anesthesia. We then performed the laparotomies and collected and measured the ileums. Approximately 1 cm of the ileum was collected for histology. The ileum samples were fixed in buffered paraformaldehyde, dehydrated, diaphanized, and embedded in paraffin. One segment (0.5 cm) was used for biochemical analyses; this fragment was washed with PBS, frozen in liquid nitrogen, and stored in a freezer at -80°C . A different segment (2 cm) was used for the evaluation of enteric neurons. This segment was fixed in 4% paraformaldehyde and immersed in the same fixative solution for 3 hours at room temperature. It was then opened along the mesenteric border, washed twice for 10 minutes with PBS, and stored in PBS with 0.08% sodium azide at 4°C .

Histological Processing and Immunohistochemistry

To evaluate ileum morphology and cellularity, sets with semi-serial 5 μm transverse histological sections were prepared and stained using different techniques. Histopathological evaluations and morphometric analyses of ileal walls, enterocytes, and intraepithelial lymphocytes (IELs) were performed on sets stained with hematoxylin and eosin (HE) (Santos et al., 2018b; Passos et al., 2020). Goblet cells producing different mucins were counted in Alcian blue pH 1.0 (AB 1.0), Alcian blue pH 2.5 (AB 2.5), and periodic acid-Schiff (PAS) stained sets (1; Santos et al., 2018b). Total mast cells were counted with the toluidine blue technique (Yu et al., 2016; Pastre et al., 2019), and collagen fibers were analyzed in picrosirius red (Pastre et al., 2019; Panza et al., 2021).

The immunohistochemistry technique was used to label TGF- β and *Leishmania* amastigotes, as described by Santos et al. (2018b). Briefly, the slides were separately exposed to primary anti-*Leishmania* (1:200 dilution) produced in infected *L. (L.) amazonensis* mice and purified with intestines of healthy hamsters (Santos et al., 2018b) and anti-TGF- β (1:100 dilution; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA) antibodies. After incubation with the primary antibody, the sets were incubated with horseradish peroxidase polymer conjugate (Life Technologies Corp., Frederick, MD, USA) and stable DAB (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA), counterstained with Mayer's hematoxylin, and mounted with coverslips. A brown color in the sets indicated a positive reading.

Morphometric Analyses

Motic Images Plus (version 2.0) software was used to measure ileal walls and enterocytes. For these analyses, images were captured with a digital camera (Moticam 2000, 2.0 Megapixel) coupled to an optical microscope (MOTIC B5). Morphometries of ileal walls were performed in 16 images captured with a 10x objective lens. We performed 64 measurements of each of the following parameters for each animal: total thickness of intestinal walls, muscular tunics, and submucosa; widths and depths of

crypts (**Figure 1**). The heights and widths of villi were measured using the same images. The base, middle, and apex of villi were measured first, and then the average of these values resulted in the final value (Santos et al., 2018b; Passos et al., 2020). For each animal, the heights and widths of 80 enterocytes and their respective nuclei were measured in images captured with a 100x objective lens (Santos et al., 2018b).

Image-Pro[®] Plus (version 4.5.0.29) software was used for the evaluation of collagen fibers and HuC/HuD immunostaining neurons. In the slides stained with picosirius red, 16 images were captured with a 20x objective lens in a light microscope (Olympus BX50 - Minato-Ku, Japan) with the use of a polarizing filter (Olympus U-POT, Japan) for measurement of type I and III collagen fibers. We captured 16 images without the polarizer for the measurement of total fibrillar collagen (μm^2) (Pastre et al., 2019; Panza et al., 2021).

Cell Counting

For the quantification of goblet cells, IELs, and mast cells, we used a Nikon Eclipse E200 optical microscope. Using the 40x objective lens, we counted the number of IELs and goblet cells in 2,560 epithelial cells of each hamster (160 epithelial cells/quadrant/cut). For statistical analysis, we calculated the ratio to 100 epithelial cells (Santos et al., 2018b). Total mast cells were counted in 100 microscopic fields using the 100x objective lens (Pastre et al., 2019). From ileal mucosa and submucosa, TGF- β -immunoreactive cells (TGF- β -IR) were counted in 16 images captured by an Olympus CX31 microscope attached to a digital camera (Moticam 2000, 2.0 Megapixel). Quantities of mast cells and TGF- β -IR cells in 1 mm^2 were calculated.

Leishmania Amastigote Analysis

From each hamster, four histological sections stained with HE were analyzed to verify amastigote forms. The positive hamsters had their histological slides submitted to immunohistochemistry with anti-*Leishmania* antibodies. Five immunostained tissue sections were examined for the presence of extra- or intramacrophagic amastigote forms. Positive (sections of popliteal lymph nodes) and negative controls (sections without the primary antibody) were used.

Biochemical Analyses

Fragments of the ileum were homogenized with PBS (4mM) and centrifuged. The supernatant was then used for the measurement of nitric oxide (NO) and evaluation of enzyme myeloperoxidase (MPO) activity. The pellet was resuspended in PBS with hexadecyltrimethylammonium bromide (8mM), homogenized, and centrifuged to measure the enzymatic activity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG). All analyses were performed in duplicate in a 96-well microplate, and their absorbances were measured in a microplate reader (Spectra Max Plus).

For the measurement of MPO, 10 μL of the sample reacted with the o-dianisidine solution (16.7 mg O-dianisidine dihydrochloride, 90 ml double-distilled water, 10 ml PBS, and 50 μL of 1% H_2O_2) for 5 minutes with protection from light. The enzymatic reaction was stopped by the addition of acetate solution, and the reading was performed at 450 nm. The results were expressed in optical density (OD).

The estimation of NO was performed indirectly by the determination of nitrite (NO_2^-) with the Griess method. 50 μL of the sample was incubated with Griess solution (1%

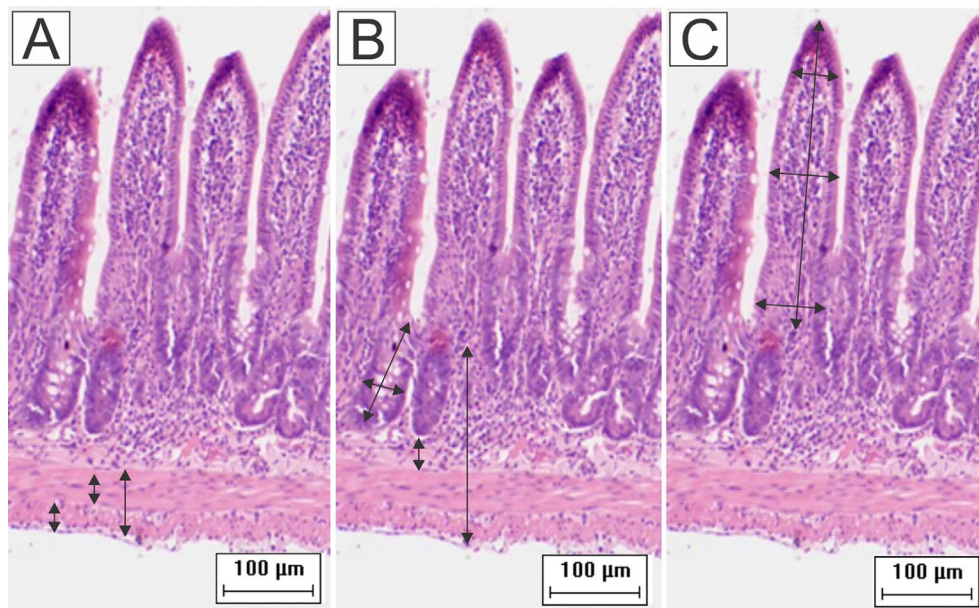


FIGURE 1 | Schematic representation of the measurement of (A) muscular layers, (B) submucosa, total wall, depth and width of the crypts, and (C) height and width of the villi. Were performed 64 measurements of each parameter for each animal. To obtain the width of the villi, the base, middle, and apex were measured and then the average of these values resulted in the final value (HE staining, 20x magnification, scale bar = 100 μm , Olympus CX31).

sulfanilamide in 5% phosphoric acid, and 0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride in water) at room temperature. The NO concentration was calculated based on the sodium nitrite standard curve. The absorbance was measured at 550 nm; the results were expressed in μM concentration of NO^{2-} .

Finally, the measurement of NAG enzymatic activity was performed with a 25 μL sample that remained incubated for 1 hour at 37°C with a citrate buffer and NAG solution (1.14 mg of p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosamine in distilled water). Before the reading at 405 nm, glycine buffer was added. The result was expressed in OD/g of wet tissue.

Neuron Counting and Morphometry

Small fractions of ileums were dissected under stereomicroscopy to obtain whole mount preparations of enteric plexuses. To mark the total population of HuC/HuD neurons, whole mounts of myenteric and submucosal plexuses were washed 3 times for 5 minutes with PBS (0.1M pH 7.4) and incubated separately in microtubes with an antigen blocking solution containing 3% bovine serum albumin (BSA; Sigma, St. Louis, MO, USA) and 0.1% Triton X100 (Sigma, St. Louis, MO, USA) diluted in PBS for 1 hour at room temperature. After this, the membranes were incubated in a solution containing the primary mouse anti-HuC/HuD (1:300; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) antibody, 3% BSA, and 0.1% Triton X100 diluted in PBS for 48 hours under stirring at room temperature. After this period, the samples were washed 3 times for 5 minutes with PBS and incubated in a solution containing the secondary Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse antibody (1:300; Molecular Probes, Eugene, OR, USA), 3% BSA, and 0.1% Triton X100 diluted in PBS for 2 hours at room temperature under agitation and protection from light. Then, the membrane preparations were washed 3 times for 5 minutes in PBS, mounted on glass slides with Prolong Gold Antifade (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), and stored at 4°C (light-protected).

The counting of HuC/HuD-immunoreactive neurons from myenteric and submucosal plexuses was performed on 32 images captured randomly with a 20x objective lens in all areas of the ileum circumference using the FSXBSW Image Browser integrated in an Olympus FSX100 light microscope (Olympus, Tokyo, Japan) with immunofluorescence filters. In the submucosal plexus, we counted the neurons inside and outside the ganglia and the total number of ganglia. These results were expressed in cells/ mm^2 . The areas of 100 neurons (μm^2) of submucosal and myenteric neurons per animal were measured in the same images. For both analyses, we used Image-Pro® Plus (version 4.5.0.29) software.

Statistical Analysis

The statistical analyses were performed using the data of the individual animals and were determined based on the data distribution, which was verified using the Shapiro-Wilk or D'Agostino Pearson tests (BioEstat 5.3 software). Comparisons between the groups were verified with two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple-comparison test or Fisher's *post hoc* test; the Kruskal-Wallis test followed by

Dunn's *pos hoc* test was also used (GraphPad Prism 8.0.1 software). We compared the control groups to the infected groups in the two experimental periods (90 or 120 days) and the 90-day infected group to the 120-day group. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Clinical Signs

The infection was confirmed by the development of the lesion at the site of inoculation of the parasite, therefore, only animals with lesions on the left hindpaw were used. Body weight, consistency of feces, and appearance of hair did not change during the experimental period when compared the groups. Edema was observed in infected paws in the first days after infection. The lesions started to appear between the third and fourth week after infection and no statistical differences were observed among the infected groups. All infected hamsters showed difficulty in mobility due to lesion progression (Figure 2).

Infection Increased Leukocytes in Peripheral Blood

Global leukocyte counts increased in all infected groups (90 days) when compared to control group (2903: $p = 0.007$; 2314: $p = 0.033$; 1655: $p = 0.039$). In differential leukocyte counts, we observed an increase in neutrophils ($p = 0.029$), lymphocytes ($p < 0.03$), and monocytes ($p < 0.001$) in the 2903 group at 90 days of infection when compared to the control group. When compared to the control group, monocyte quantities were also significantly higher at 120 days of infection in the 2903 group ($p = 0.034$) and 90 days in the 2314 group ($p = 0.012$); 1655 group presented $p = 0.058$ when compared to the CG. Lymphocytes also increased in the 1655 group at 90 days of infection when compared to the control group ($p = 0.046$); but lymphocyte numbers decreased between 90 and 120 days of infection for this group (1655; $p = 0.029$) (Figure 3).

After Infection, Intestinal Walls Were Thicker, Crypts Were Deeper and Wider, and Villi Were Longer and Wider

Ileums showed no significant macroscopic changes after infection. However, we measured intestinal walls to analyze the morphology of the organ and significant changes were found. We observed thicker muscular layers in groups 2903 and 2314 in both infection periods when compared to the control groups ($p < 0.001$). In groups 2903 and 2314, increases of approximately 20% and 29% of total muscle thickness were observed at 90 and 120 days of infection, respectively, when compared to the control groups. Group 1655 had values similar to the control group, with the exception of an increase to longitudinal layers at 90 days ($p = 0.003$). Submucosal layers were thicker in all infected groups and increased by an average of 25% at 90 days (2903 and 2314: $p < 0.001$; 1655: $p = 0.023$) and 42% at 120 days of infection ($p < 0.001$) and when compared to the control groups (Figures 4 and 5).

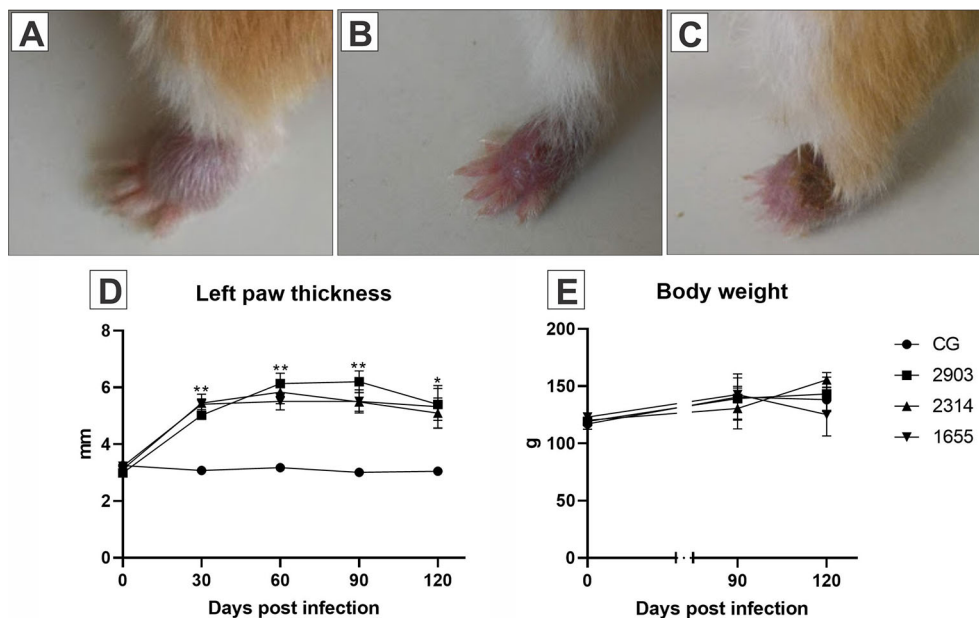


FIGURE 2 | Images (A–C) represent the evolution of the paw lesion after the infection by *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/2000/1655 strain): (A) initial edema, (B) initial lesion, (C) ulcerated lesion. (D) Represents the evaluation of the clinical course of lesions through the 120 days following the infections. The size of the lesions was measured with a digital pachymeter by evaluating the dorsal-ventral thickness of the infected paw (mm). * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ when compared the infected groups to the respective control. (E) Demonstrates the body weight (g) of the hamsters before parasite inoculation and at 90- and 120-days post infection ($n = 4$). CG, control group. 2903: group infected with MHOM/BR/1975/M2903. 2314: group infected with MHOM/BR/2003/2314. 1655: group infected with MHOM/BR/2000/1655.

Crypts of group 2314 in the two infection periods and groups 2903 and 1655 at 120 days were deeper and wider than in control group hamsters ($p < 0.001$). Total organ wall size in groups 2903 and 2314 increased in both experimental periods when

compared to the control groups ($p < 0.001$). We recorded an average increase of 16% and 35% in height and 15% and 22% in width at 90 and 120 days of infection, respectively, when compared to the control groups ($p < 0.001$). Thus, infection

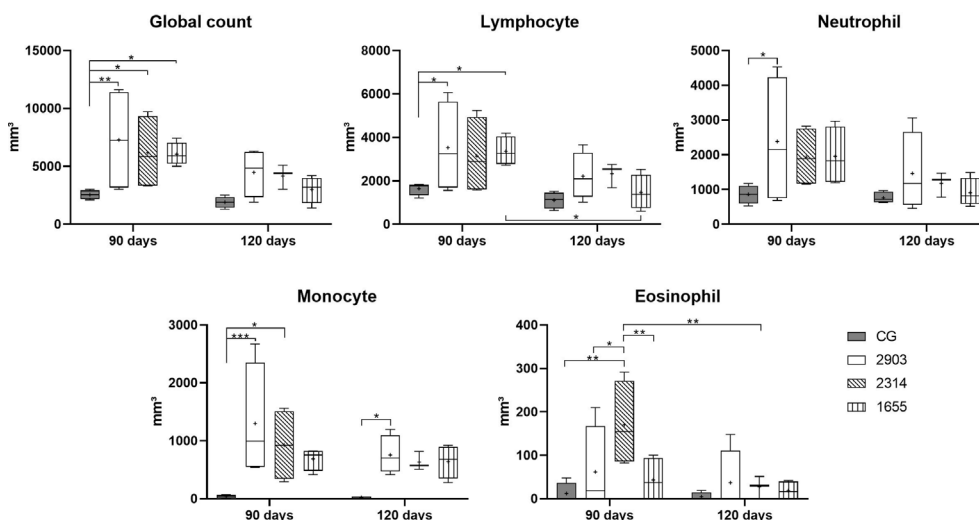


FIGURE 3 | Global and differential leucocyte counts in peripheral blood in hamsters infected with three strains of *L. (V.) braziliensis* for 90 and 120 days. Data is represented in box plots (median with 25 to 75 percentile), whiskers (2.5 to 97.5 percentile), and mean (+) ($n = 4$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. CG, control group. 2903: group infected with MHOM/BR/1975/M2903. 2314: group infected with MHOM/BR/2003/2314. 1655: group infected with MHOM/BR/2000/1655.

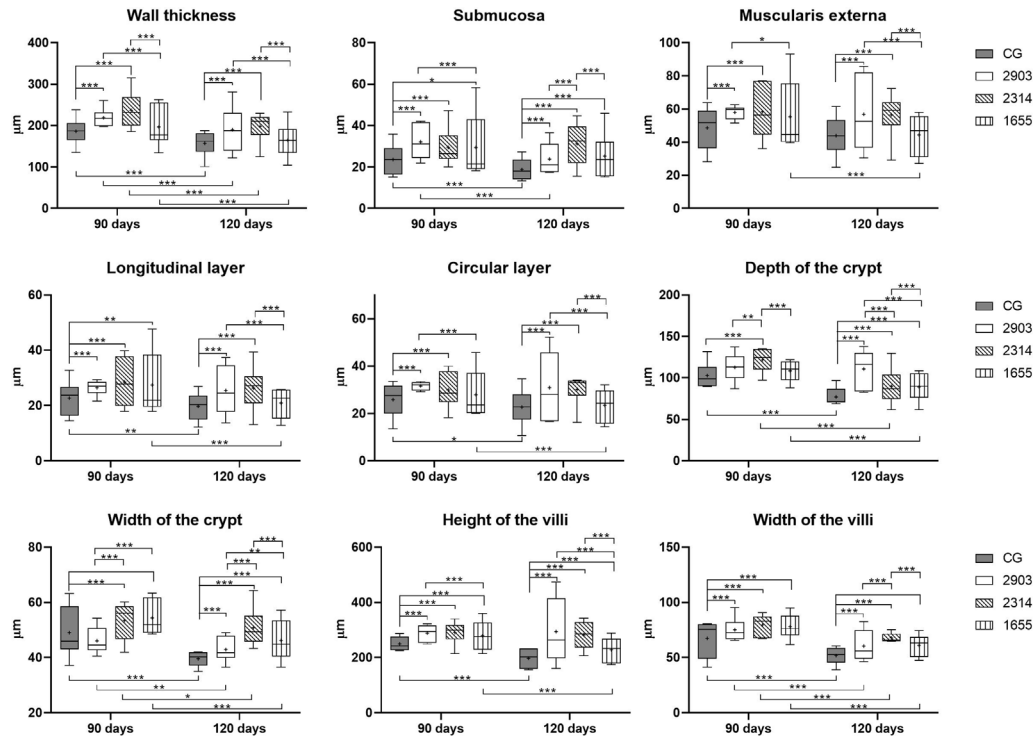


FIGURE 4 | Morphometry of wall, villi, and crypts of ileums of hamsters infected by *L. (V.) braziliensis* for 90 or 120 days (μm). Data represented in box plots (median with 25 to 75 percentile), whiskers (2.5 to 97.5 percentile), and mean (+) ($n = 6$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. CG, control group. 2903: group infected with MHOM/BR/1975/M2903. 2314: group infected with MHOM/BR/2003/2314. 1655: group infected with MHOM/BR/2000/1655.

duration seemed to be a determining factor in organ response (Figures 4 and 5).

The Infection Caused Morphometric and Quantitative Changes to Epithelial Cells in Hamster Ileums

We measured enterocytes to verify the impacts of the infection on epithelial cells in the ileum. Enterocytes are the most abundant cell type in the intestinal epithelium. As shown in Figure 6, enterocytes increased in height ($p < 0.05$) and decreased in width ($p < 0.05$) in all infected groups when compared to the controls. We observed increases to the nuclei of these cells only in group 2314 (in both infection periods) when compared to the respective controls ($p < 0.001$). For group 2314, the longer infection period (120 days) resulted in a 29% increase to nuclei size when compared to the 90-day group (Figure 6).

In goblet cell quantification, we observed a 41% increase in the number of sulfomucin producers (AB 1.0; $p = 0.028$) and a 38% reduction in the neutral producers (PAS; $p = 0.003$) in group 1655 that were infected for 120 days when compared to the 90-day group. The 1655 group reduced the PAS goblet cells when compared to the 2314 group infected by 120 days ($p = 0.007$). No alterations were observed in the goblet cells that produce sialomucins (AB 2.5; $p > 0.1$) (Figure 7).

Intraepithelial Lymphocytes and TGF- β -Immunoreactive Cells Increased After Infection

When compared to the control, we observed an average increase of IELS of approximately 70% in the groups infected for 90 days ($p < 0.001$) and of 36%, 74%, and 51% in hamsters infected for 120 days in groups 2903 ($p = 0.013$), 2314 ($p < 0.001$), and 1655 ($p < 0.001$), respectively. Mast cell quantities significantly increased in the 2314 ($p = 0.002$) and 1655 ($p < 0.001$) groups at 120 days of infection when compared to 90 days. The number of TGF- β -IR cells increased in all infected groups when compared to the control groups (90 days – 2903: $p = 0.009$; 2314: $p = 0.003$; 1655: $p = 0.012$; 120 days – 2903: $p = 0.020$; 2314: $p = 0.001$; 1655: $p = 0.009$). The two-way ANOVA analyses revealed a significant main effect for the time [$F_{(1,40)} = 16.5$, $p < 0.001$] and infection [$F_{(3,40)} = 24.2$, $p < 0.001$] in IELs; for the time [$F_{(1,40)} = 26.3$, $p < 0.001$] in mast cells; and for the infection [$F_{(3,25)} = 9.02$, $p < 0.001$] in the TGF- β -IR cells (Figure 8).

Infection and Experimental Duration Affect Collagen Fiber Remodeling

To understand the effects of the infection on the ileum cellular matrix, we used histochemistry to evaluate the areas occupied by collagen fibers. Hamsters from group 2903 showed higher total fibrillar collagen at 120 days of infection than at 90 days ($p < 0.001$). At 120 days of infection, group 2903 had higher total

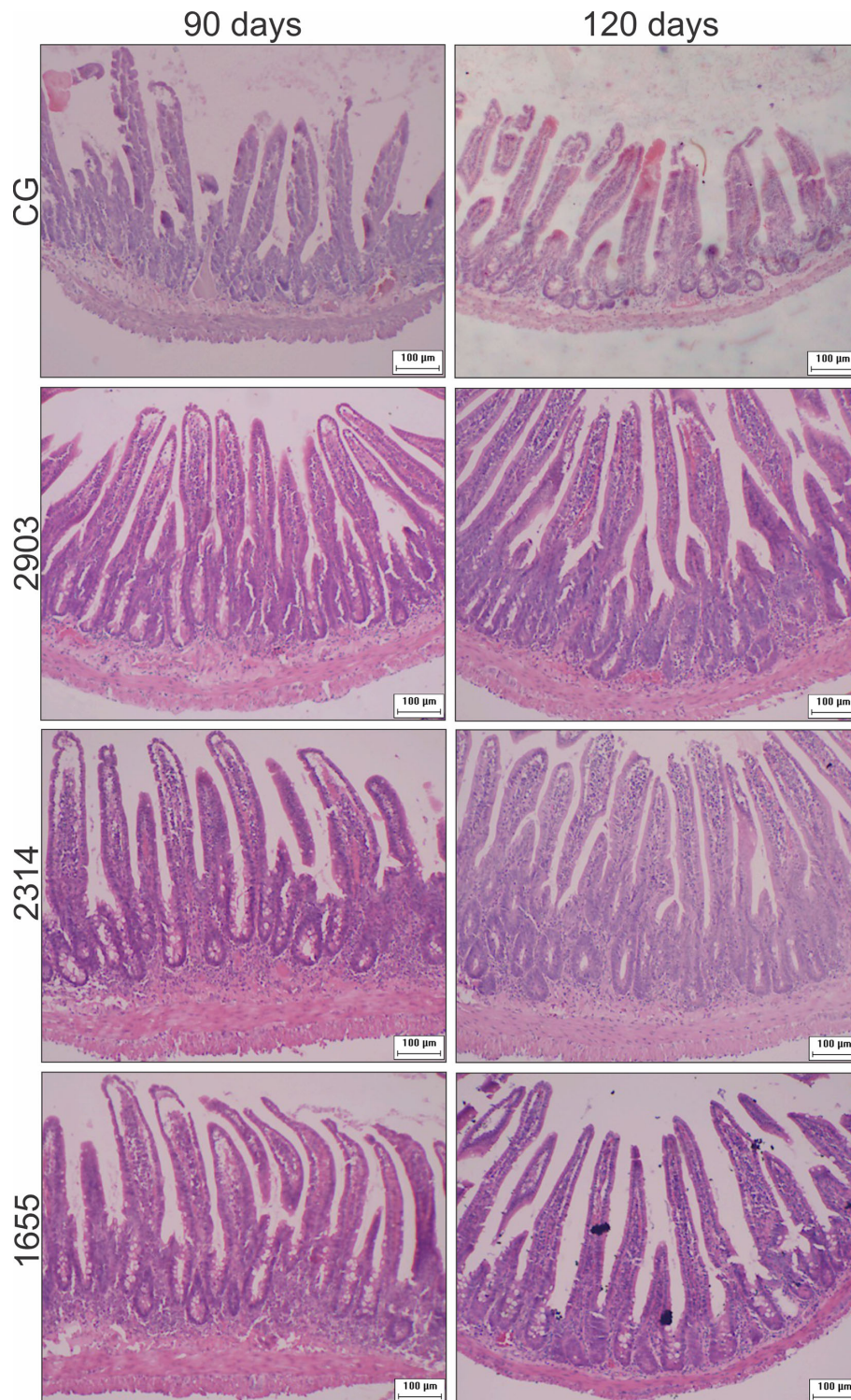


FIGURE 5 | Photomicrograph of cross-sections representing the ileum wall, villi, and crypts of hamsters infected by *L. (V.) braziliensis* (HE staining, 10× magnification, scale bar = 100 µm, Olympus CX31). CG, control group. 2903: group infected with MHOM/BR/1975/M2903. 2314: group infected with MHOM/BR/2003/2314. 1655: group infected with MHOM/BR/2000/1655.

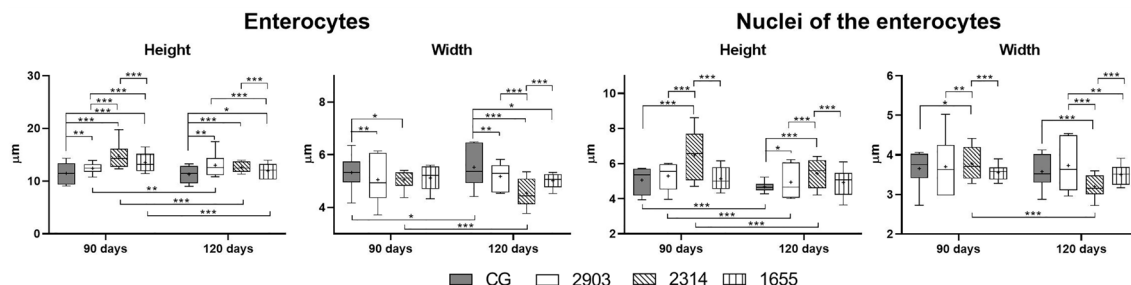


FIGURE 6 | Morphometry of ileum enterocytes from hamsters infected with different *L. (V.) braziliensis* strains at 90 or 120 days of infection (μm). Data represented in box plots (median with 25 to 75 percentile), whiskers (2.5 to 97.5 percentile), and mean (+) ($n = 6$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. CG, control group. 2903: group infected with MHOM/BR/1975/M2903. 2314: group infected with MHOM/BR/2003/2314. 1655: group infected with MHOM/BR/2000/1655.

fibrillar collagen than all other groups in the experiment ($p < 0.001$). The two-way ANOVA demonstrated a significant main effect for the time [$F_{(1,40)} = 4.70$, $p = 0.036$] and infection [$F_{(3,40)} = 3.35$, $p = 0.028$] without interaction between the variables. At 90 days of infection, type I collagen fiber decreased in 2903 ($p = 0.015$), 2314 ($p = 0.001$) and 1655 ($p < 0.001$) groups when compared to the control. Hamsters in groups 2903 ($p = 0.039$) and 2314 ($p = 0.012$) had reductions in type III collagen fiber at 90 days of infection when compared to the controls, but type III fibers increased for both groups in the period between 90 to 120 days of infection (2903: $p = 0.015$; 2314: $p = 0.008$). In the type III collagen fibers was observed the interaction between the variables [$F_{(3,40)} = 4.34$, $p = 0.009$] by two-way ANOVA; while the type I demonstrated a significant main effect only for the infection [$F_{(3,40)} = 4.06$, $p = 0.013$] (Figure 9).

Presence of Amastigotes and Inflammatory Changes in Ileums of Infected Hamsters

As demonstrated in Table 1 after 120 days of infection, NO levels in hamster ileums in group 1655 were higher than in the control group. We observed an increase in myeloperoxidase enzyme activity in group 2903 when compared to group 1655 at 90 days of infection; the opposite was observed for NAG enzymatic activity.

Figure 10 shows an infiltration of mononuclear cells in the mucous layer formed mostly by lymphocytes, plasmocytes, and (to a lesser extent) polymorphonuclear leukocytes. In addition, we observed signs of inflammatory infiltrates in mucosa, submucosa and in crypts, and edemas in villi. Our findings of immune cells inside and around ganglia suggest that ganglionitis and periganglionitis could be correlated with changes observed in the ENS. While using hematoxylin and eosin staining, we also found forms that suggested amastigote presence; this presence was later confirmed by immunohistochemistry.

The Infection Caused Morphometric Changes in Neurons in the Myenteric and Submucosal Plexuses

No quantitative changes in neurons or ganglia were observed in the evaluation of total neuronal populations (immunostained analysis with HuC/HuD) (Table 2).

In the myenteric plexus, the bodies of neurons in groups 2314 ($p = 0.023$) and 1655 ($p < 0.001$) at 90 days of infection were larger than the controls. However, significant reductions to cellular bodies were recorded thereafter (2314: $p = 0.014$; 1655: $p < 0.001$); at 120 days after infection, the cellular body sizes of infected groups were similar to the control groups. However, neuronal body sizes in the submucosal plexus at 120 days of infection decreased by approximately 15% in group 2903, 30% in 2314, and 26% in 1655 when compared to the 120 days control group ($p < 0.001$) (Figure 11).

DISCUSSION

Due to the clinical/epidemiological importance (Ministério da Saúde, 2017; Conceição-Silva and Morgado, 2019; World Health Organization, 2020) of the disease and its ability to use genetic diversity to create more aggressive forms (Guimarães et al., 2016; Rugani et al., 2018), our study evaluated the changes in hamster ileums at 90 days and 120 days of infection from one reference parasite strain and two clinically-isolated strains.

In infection-related lesions, different *L. (V.) braziliensis* strains have presented different biological behaviors (Rêgo et al., 2018) and cytokine and chemokine gene expressions in skin lesions in hamsters (Rêgo et al., 2019). For example, in BALB/c and C57BL/6 mice, different profiles of inflammatory infiltrates in livers and spleens were found with or without the presence of parasite (Pereira et al., 2009). Fernandes et al. (2016) demonstrated various cytokine expressions and macrophage-infectivity rates in *in vitro* experiments with the same strains used in our study.

Almeida and collaborators Almeida et al. (1996) reported the presence of *L. (V.) braziliensis* species in the spleens and livers of hamsters that could multiply *in situ*, which enables the production of secondary metastatic visceral lesions from a primary skin lesion (the reverse could also be possible). We found some *Leishmania* amastigote forms in infected hamster ileums with all strains analyzed in our study. The changes observed in this specific organ cannot be solely linked to the presence of the protozoan, but as a systemic consequence of

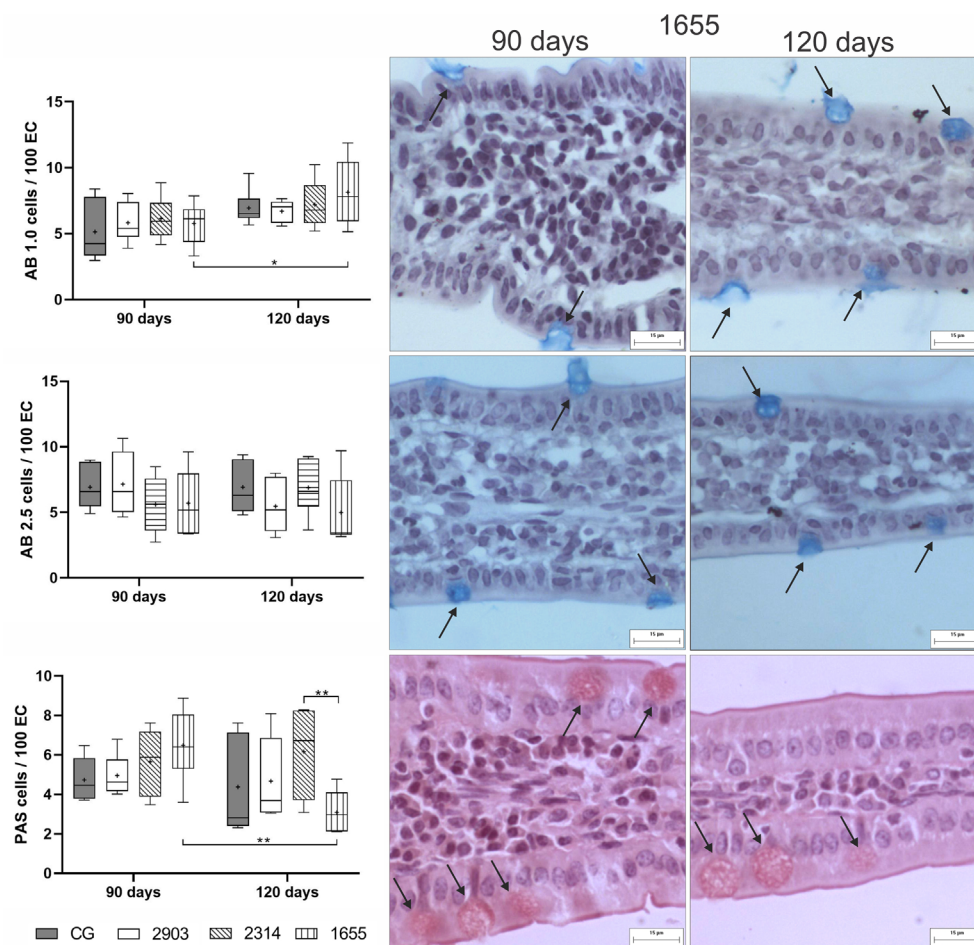


FIGURE 7 | Ratio of goblet cells/100 of epithelial cells (EC) stained using the histochemical techniques of Alcian Blue (AB) pH 1.0, AB pH 2.5, and periodic acid-Schiff (PAS). Data is represented in box plots (median with 25 to 75 percentile), whiskers (2.5 to 97.5 percentile), and mean (+) (n = 6). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Representative photomicrograph of the group 1655 at 90- and 120-days post infection showing goblet cells (black arrows) in each technique (AB pH 1.0 and 2.5 and PAS staining, 40 $\times$ magnification, scale bar = 15 μ m, Olympus BX50). CG, control group. 2903: group infected with MHOM/BR/1975/M2903. 2314: group infected with MHOM/BR/2003/2314. 1655: group infected with MHOM/BR/2000/1655.

infection. Pereira et al. (2009) also reported changes to livers and spleens of mice infected with different *L. (V.) braziliensis* strains, and Passos and collaborators Passos et al. (2020) demonstrated changes to hamster colons infected with *L. infantum*.

Increases of blood leukocytes confirmed the systemic effects of infection and necessity for mobilization of these cells to the site of initial infection and possibly other organs, such as the intestine. The presence of inflammatory infiltrates and increases to submucosa, muscular layers, and villi in the present study and other research (Góis et al., 2016; Santos et al., 2018a; Santos et al., 2018b) support this hypothesis. These effects enable the presence of the parasite in other organs, as defense cells maintain viable parasitic forms in the interior and are used as vehicles of the parasite to infect macrophages (Bogdan, 2020). When migrating from the infection site to the lymph nodes, macrophages and other immune cells can transport the parasite to other organs *via* the lymphatic system, as evidenced by the presence of amastigote forms in the popliteal lymph

and the DNA of the parasite in mesenteric lymph nodes of hamsters chronically-infected with *L. (V.) braziliensis* (Santos et al., 2018b).

The inflammatory infiltrates observed in the lamina propria of infected hamsters mainly contained mononuclear cells, similar to observed in the duodenum of a patient infected by *L. donovani* (Chattopadhyay et al., 2020). At 120 days of infection, decreases were observed in various parameters of the intestinal wall and blood leukocytes when compared to groups infected for 90 days. This might be a natural part of the aging process, as this reduction was also seen in the control groups.

Ganglionitis and periganglionitis have been reported in hamsters infected with *L. (V.) braziliensis* (Santos et al., 2018b) and *L. infantum* (Passos et al., 2020), but our article is the first to numerically and morphometrically evaluate the neurons of both ENS plexuses. The infiltration of immune cells in the ganglia can lead to neuronal degeneration and consequently cause cell dysfunction and loss (De Giorgio et al., 2004). However, the

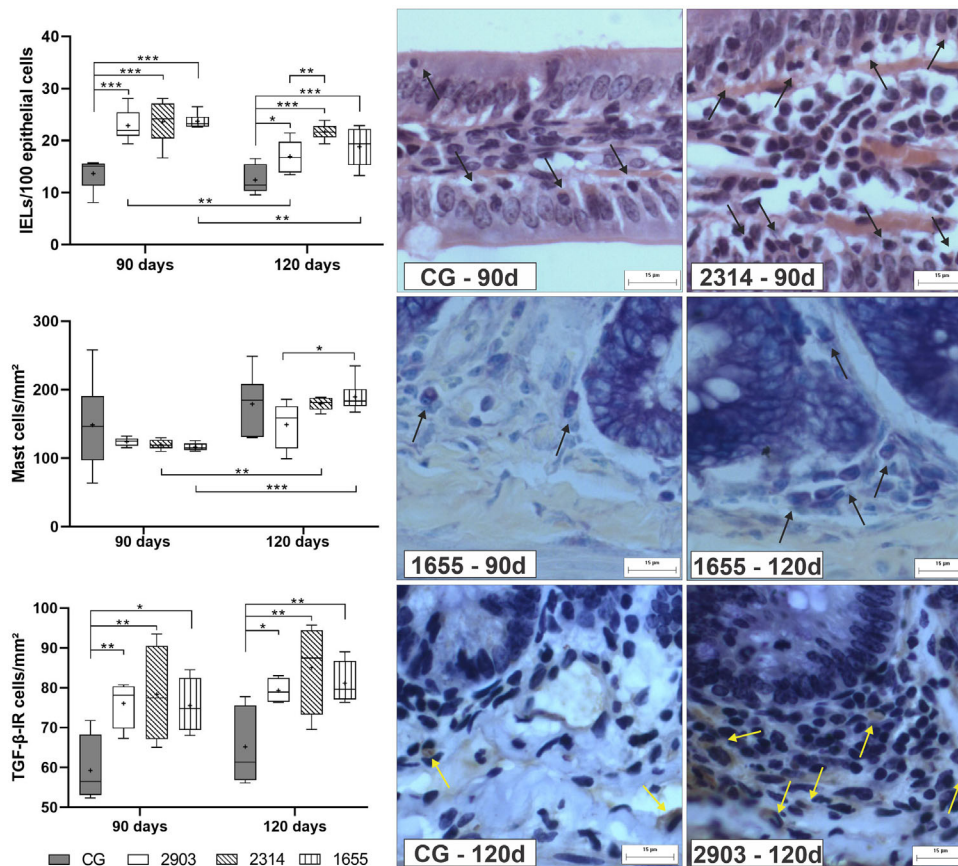


FIGURE 8 | Proportion of intraepithelial lymphocytes (IELs) in 100 epithelial cells, mast cells, and TGF- β -immunoreactive cells (TGF- β -IR) per mm². Data represented in box plots (median with 25 to 75 percentile), whiskers (2.5 to 97.5 percentile), and mean (+) ($n = 6$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Representative photomicrograph of IELs in the control group and 2314 at 90-days post infection (black arrows; HE staining, 40 $\times$ magnification, scale bar = 15 μ m, Olympus BX50); mast cells in group 1655 at 90- and 120-days post infection (black arrows; blue toluidine staining, 40 $\times$ magnification, scale bar = 15 μ m, Olympus BX50); TGF- β -IR of the control group and 2903 at 120-days post infection (yellow arrows; immunohistochemistry, 40 $\times$ magnification, scale bar = 15 μ m, Olympus BX50). CG, control group. 2903: group infected with MHOM/BR/1975/M2903. 2314: group infected with MHOM/BR/2003/2314. 1655: group infected with MHOM/BR/2000/1655.

neuroplastic response to inflammation enables intestinal homeostasis (Mawe et al., 2009).

Hypertrophy of neuron bodies in the myenteric plexus at 90 days of infection suggests an increase in their metabolic activity; this acts as a mechanism of adaptation to adverse conditions suffered by these cells (Araújo, 2015; Trevizan et al., 2019). Such alterations can interfere with intestinal motility and consequently lead to an increase in muscle layers, as this plexus is responsible for the coordinating movements of intestinal relaxation and contraction (Nezami and Srinivasan, 2010; Machado et al., 2021). This relationship has been observed with other protozoa (Araújo, 2015; Machado et al., 2021). At 120 days of infection, we observed reduction in neuronal bodies and muscle layers in group 1655; this may be related to more acidic mucus, and consequently, more fluid and easier secretion (Góis et al., 2016).

The increase in immune cells and the presence of edemas in the mucosal and submucosal layers contributed to the thickening of both layers in the ileal wall. The migration of these cells may have contributed to reductions to the body sizes of submucosal

neurons in all infected groups at 120 days of infection. These data corroborate with those of other authors (da Silva et al., 2017; Schneider et al., 2018) who demonstrated that submucosal neurons are directly affected by intestinal inflammation. The submucosal plexus controls the function of epithelial cells *via* the lumen (Nezami and Srinivasan, 2010), chemical stimuli, and distension of intestinal mucosa (Christofi, 2008). The loss of normal functions of these neurons can cause dysfunction in intestinal permeability and secretion. We evaluated the total population of neurons (marked by HuC/HuD); other markers can also be used to detect possible changes in specific neuronal populations and ENS components.

The increase in cellularity in the lamina propria occurred together with large increases of IELs, demonstrating the attraction of immune cells to the epithelium (Santos et al., 2018a; Santos et al., 2018b). This effect corroborates with the previously discussed changes in submucosal neurons. IELs can play a protective role on enterocytes in the maintenance of epithelial integrity (Hu and Edelblum, 2017), an effect typically

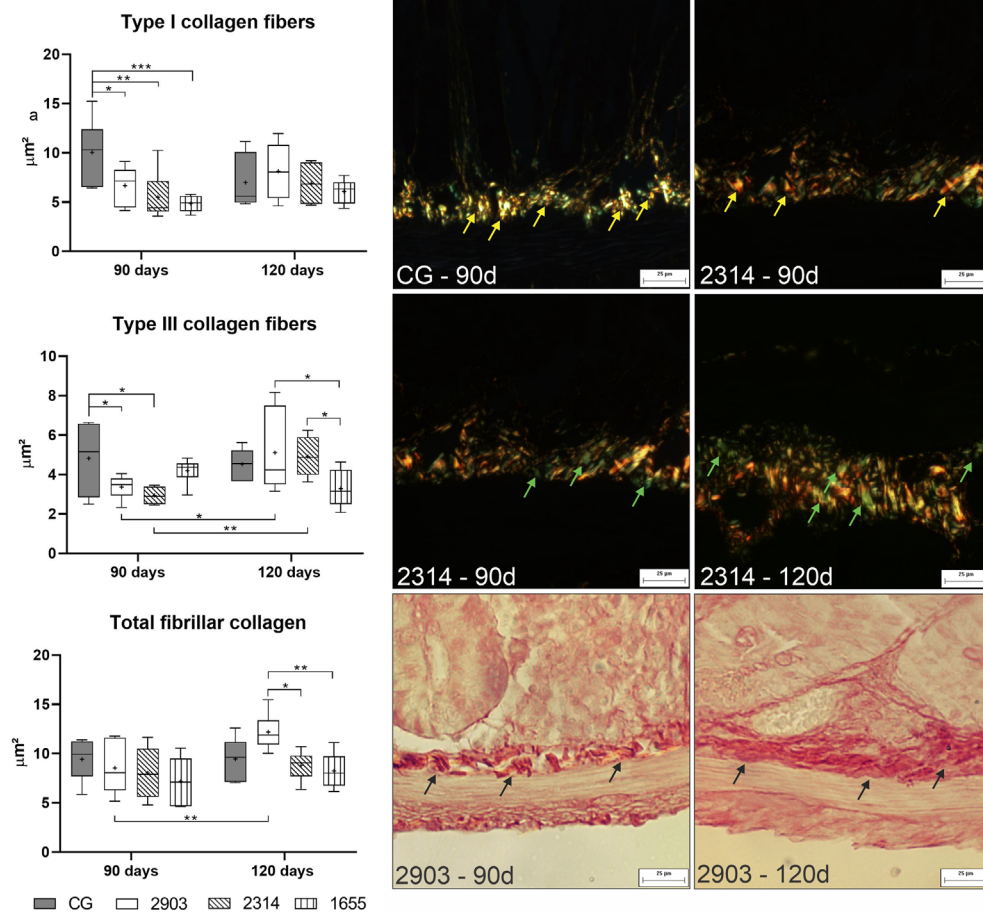


FIGURE 9 | Area occupied by type I, type III, and total fibrillar collagen fibers (μm^2). Data represented in box plots (median with 25 to 75 percentile), whiskers (2.5 to 97.5 percentile), and mean (+) ($n = 6$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Photomicrograph of the area occupied by type I collagen fibers (yellow arrow) in control group and 2314 at 90-days post infection; by type III collagen fibers (green arrow) in group 2314 at 90- and 120-days post infection; and of total fibrillar collagen (black arrow) in group 2903 at 90- and 120-days post infection (Picrosirius Red staining, 20 $\times$ magnification, scale bar = 25 μm , Olympus BX50). CG, control group. 2903: group infected with MHOM/BR/1975/M2903. 2314: group infected with MHOM/BR/2003/2314. 1655: group infected with MHOM/BR/2000/1655.

TABLE 1 | Biochemical analyses of the ileums of hamsters infected with different *L. (V.) braziliensis* strains at 90 and 120 days of infection.

		NO (μM)	MPO (OD)	NAG (OD/g of wet tissue)
90 days	CG	47.41 $\pm$ 8.03	0.19 $\pm$ 0.02	23.23 $\pm$ 0.53
	2903	57.25 $\pm$ 4.59	(0.24 $\pm$ 0.02)	(19.37 $\pm$ 2.01)
	2314	68.29 $\pm$ 8.72	0.20 $\pm$ 0.03	25.17 $\pm$ 2.52
	1655	58.31 $\pm$ 13.27	(0.14 $\pm$ 0.02) [#]	(28.52 $\pm$ 1.85) [#]
120 days	CG	(31.02 $\pm$ 6.20)	0.12 $\pm$ 0.02	17.87 $\pm$ 2.72
	2903	51.32 $\pm$ 12.85	0.17 $\pm$ 0.03	21.71 $\pm$ 4.13
	2314	38.76 $\pm$ 13.26	0.15 $\pm$ 0.06	22.28 $\pm$ 2.25
	1655	(66.51 $\pm$ 17.34)*	0.15 $\pm$ 0.03	21.76 $\pm$ 2.42

The data are expressed as mean $\pm$ SE ($n = 4$). * $p < 0.05$ comparing 1655 to CG at 120 days. [#] $p < 0.05$ comparing 1655 to 2903 at 90 days. CG, control group. 2903: group infected with MHOM/BR/1975/M2903. 2314, group infected with MHOM/BR/2003/2314. 1655, group infected with MHOM/BR/2000/1655. NO, nitric oxide dosage; MPO, enzymatic activity of myeloperoxidase; NAG, enzymatic activity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase; OD, optical density.

associated with inflammatory intestinal diseases (Mahadeva et al., 2002; Ahn et al., 2014; Sergi et al., 2017). Passos and collaborators (2020) found similar results in hamster colons after four months of *L. infantum* infection. In infected hamsters, we

observed deeper crypts, longer and larger villi, and an increase of TGF- β -IR cells (a cytokine that controls growth and differentiation of enterocytes) (Sangild et al., 2009). These effects suggest there was a large proliferation of epithelial cells

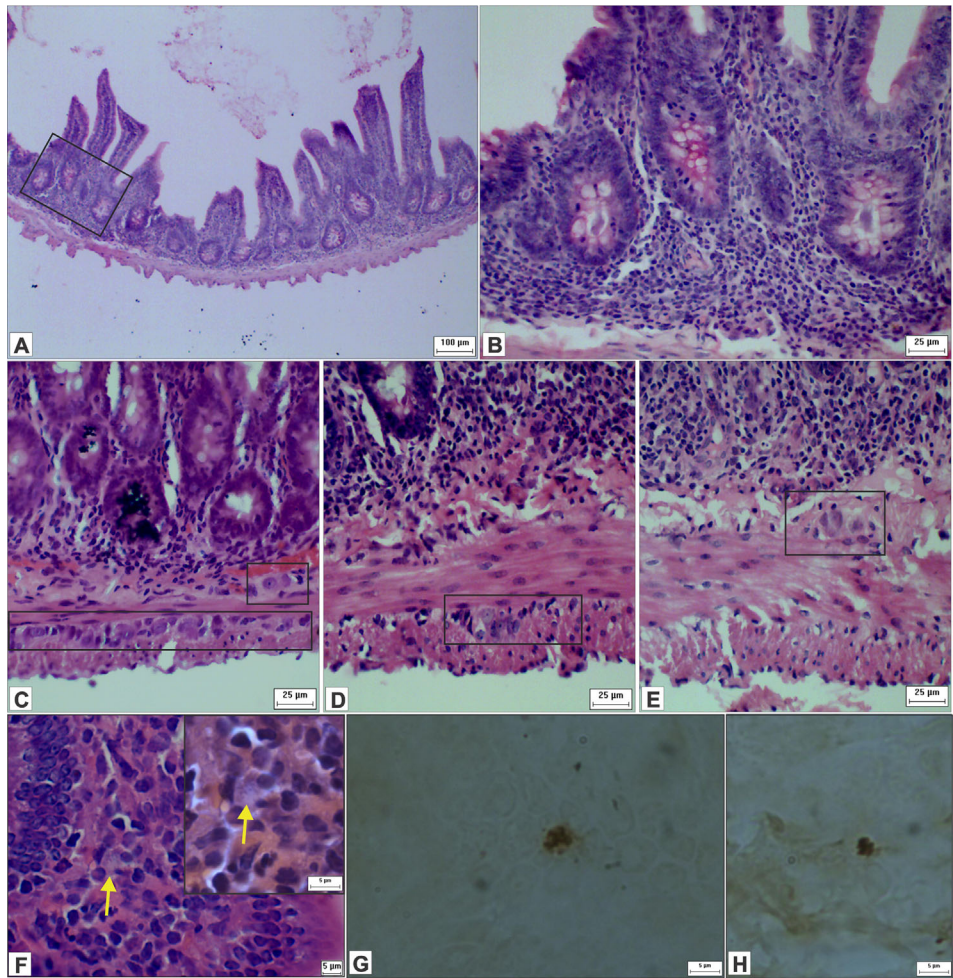


FIGURE 10 | Photomicrograph of cross-sections of the ileum of hamsters infected by *L. (V.) braziliensis*. **(A)** Presence of inflammatory infiltrates in the intestinal wall and in the crypts (HE staining, 10× magnification, scale bar = 100 μm; Olympus CX31). **(B)** Higher magnification of image A (HE staining, 40× magnification, scale bar = 25 μm; Olympus CX31). **(C–E)** Inflammatory cells within and close to the myenteric and submucosal ganglia, suggestive of ganglionitis and periganglionitis (HE staining, 40× magnification, scale bar = 25 μm; Olympus CX31). **(F)** Suggestive amastigotes forms (arrow), presence of immune cells and IELs (HE staining, 100× magnification, scale bar = 5 μm; Olympus CX31) with a higher magnification (HE staining, 100× magnification, scale bar = 5 μm; Olympus BX50). **(G, H)** *Leishmania* amastigotes in the ileum (immunohistochemistry, 100× magnification, scale bar = 5 μm; Olympus BX50).

TABLE 2 | Counting of neurons in the myenteric and submucosal plexuses (marked by HuC/HuD) in the ileum of hamsters infected with different *L. (V.) braziliensis* strains at 90 and 120 days of infection.

Myenteric neurons (mm²)			Submucosal plexus (mm²)			
			Number of ganglia	Neurons inside ganglia	Neurons outside ganglia	Submucous neurons
90 days	CG	239.22 ± 4.62	9.13 ± 0.55	45.26 ± 3.27	15.43 ± 0.44	60.70 ± 3.61
	2903	238.96 ± 5.54	11.10 ± 0.40	54.11 ± 1.04	15.26 ± 0.58	69.37 ± 0.87
	2314	241.59 ± 5.00	10.12 ± 0.15	47.98 ± 1.72	14.80 ± 1.02	62.78 ± 1.45
	1655	229.74 ± 1.12	10.87 ± 0.38	51.45 ± 1.50	15.32 ± 0.72	66.77 ± 2.05
	CG	243.27 ± 3.08	9.94 ± 0.25	49.60 ± 0.79	16.36 ± 0.11	65.96 ± 0.87
120 days	2903	245.66 ± 11.40	9.40 ± 0.07	48.40 ± 0.90	16.49 ± 0.07	64.90 ± 0.88
	2314	250.83 ± 7.28	10.02 ± 0.78	48.33 ± 3.26	14.88 ± 0.65	63.21 ± 3.91
	1655	242.65 ± 2.67	10.86 ± 0.35	50.72 ± 1.35	14.56 ± 0.58	65.28 ± 1.93

The data are expressed as mean ± SE in 1 mm² (n = 4). GC, control group. 2903, group infected with MHOM/BR/1975/M2903. 2314, group infected with MHOM/BR/2003/2314. 1655, group infected with MHOM/BR/2000/1655. Number of neuron totals were counted in the myenteric plexus. Number of ganglia, the quantity of neurons inside and outside the ganglia, and the total number of neurons in the plexus were counted in the submucosal plexus.

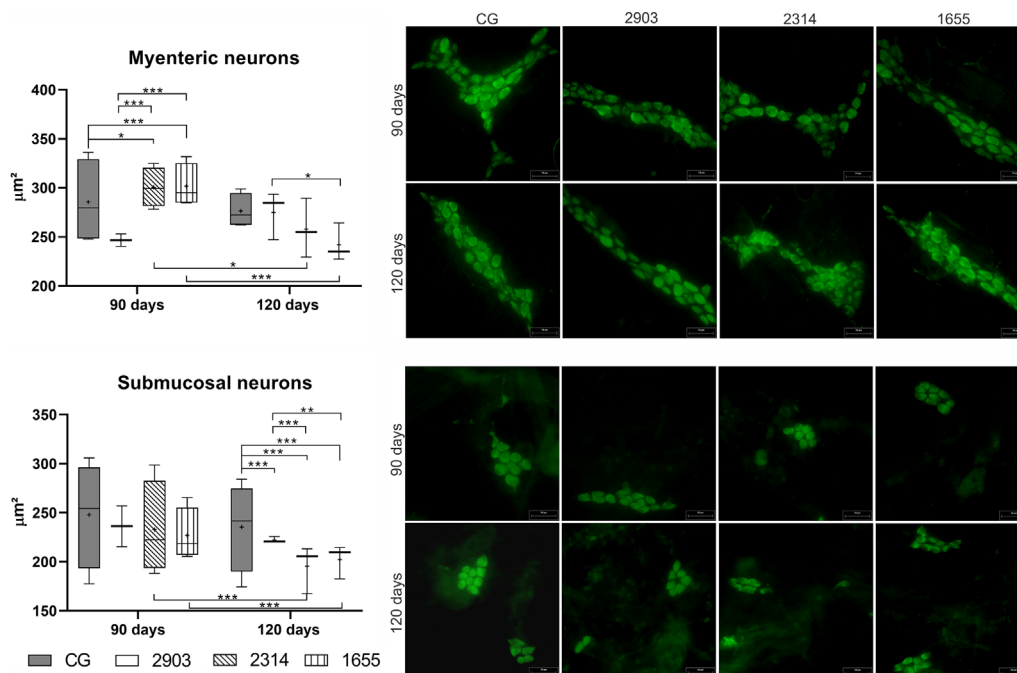


FIGURE 11 | Size of neuron bodies (μm^2) in the myenteric and submucosal plexuses of ileums of hamsters infected by *L. (V.) braziliensis* for 90 or 120 days. Data represented in box plots (median with 25 to 75 percentile), whiskers (2.5 to 97.5 percentile), and mean (+) ($n = 4$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Photomicrograph of neurons from both plexuses (HuC/HuD immunohistochemistry, 20x magnification, scale bar = 50 μm , Olympus FSX100). CG, control group. 2903: group infected with MHOM/BR/1975/M2903. 2314: group infected with MHOM/BR/2003/2314. 1655: group infected with MHOM/BR/2000/1655.

(Trevizan et al., 2016; Santos et al., 2018b); this may have led to the changes observed in the absorptive cells.

TGF- β may have contrasting roles in intestinal inflammation (Feagins, 2010). It possibly maintains intestinal homeostasis (Troncone et al., 2018). On the other hand, increased levels of this cytokine are found in areas of active intestinal inflammation (Feagins, 2010). It also has a role in the susceptibility of infection by *L. (V.) braziliensis* (Barral-Netto et al., 1992; Barral et al., 1995) and other species of *Leishmania* (Li et al., 1999; Gantt et al., 2003; Saha et al., 2007; Farage Frade et al., 2011). TGF- β performs the negative regulation of various macrophage-related microbicidal functions (Gantt et al., 2003; de Oliveira and Brodskyn, 2012). This includes decreasing NO production (Vodovotz et al., 1993; Bogdan, 2020), which is one of the principal defense mechanisms against infection (Bogdan, 2020). *In vitro* studies using the same strains as our study have not detected NO production by macrophages (Fernandes et al., 2016).

TGF- β acts on mast cells and performs opposite roles that may induce chemotaxis (Caslin et al., 2018). It is also capable of inhibiting the proliferation and development of mast cells and suppressing their function and survival (Ryan et al., 2007; Fernando et al., 2013; Caslin et al., 2018). Mast cells are important for tissue regeneration, as they enable the remodeling of collagen fibers (Hamilton et al., 2014). A positive correlation exists between the quantity of mast cells and immature collagen fibers (Ribeiro et al., 2018), which can be observed in group 2314

at 120 days of infection. Mature collagen fibers decreased after infection, demonstrating tissue remodeling (Pastre et al., 2019).

In the experimental conditions used in our study, *L. (V.) braziliensis* infection caused distinct alterations dependent by strain and infection duration in hamster ileum. In fact, in group 1655, some changes observed at 90 days of infection, approached values of the control group at 120 days. Ileums generally seemed to adapt to infection, considering the reduction of inflammatory cells and increase of elements involving tissue regeneration at 120 days of infection. The changes observed in hamsters infected with the MHOM/BR/2000/1655 strain were milder, although this strain was isolated from a patient with a reactivation of a lesion that had been previously considered cured. The groups infected with the strain isolated from a patient effectively treated with Glucantime® (MHOM/BR/2003/2314) presented a greater effect in the ileum histoarchitecture that remained at 120 days of infection. These results show the significance of the host and their specific response to infection by different strains of the parasite.

Our results revealed that *L. (V.) braziliensis* infection leads to different morphological, cellular, biochemical and ENS neurons changes in hamster ileum. Although clinical signs were not observed during the experimental period, our results show that the intestine is a possible target for future studies of the *L. (V.) braziliensis* host relationship. Further studies are needed to clarify the impacts of these changes on the function of the organ and the mechanisms involved in the process.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Ethical Committee on Animal Use of the Universidade Estadual de Maringá under protocol number 7587260416.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AS, AF, TS, DS, and GN-M contributed to the conception, experimental design and implementation of the study. AS, MS, EC, and LL contributed to methodology and analyses. AS and GN-M was responsible for interpretation of data. AS and GN-M wrote the article. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

REFERENCES

- Abbas, A., Lichtman, A., and Pillai, S. (2017). *Cellular and Molecular Immunology*. 9th ed (Philadelphia: Elsevier).
- Ahn, J. Y., Lee, K. H., Choi, C. H., Kim, J. W., Lee, H. W., Kim, J. W., et al. (2014). Colonic Mucosal Immune Activity in Irritable Bowel Syndrome: Comparison With Healthy Controls and Patients With Ulcerative Colitis. *Dig. Dis. Sci.* 59, 1001–1011. doi: 10.1007/s10620-013-2930-4
- Almeida, M. C., Cuba-Cuba, C. A., Moraes, M. A. P., and Miles, M. A. (1996). Dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *J. Comp. Pathol.* 115, 311–316. doi: 10.1016/S0021-9975(96)80088-0
- Araújo, E. J. d. (2015). *Toxoplasma Gondii* Causes Death and Plastic Alteration in the Jejunal Myenteric Plexus. *World J. Gastroenterol.* 21:4829. doi: 10.3748/wjg.v21.i16.4829
- Baba, C. S., Makharia, G. K., Mathur, P., Ray, R., Gupta, S. D., and Samantaray, J. C. (2006). Chronic Diarrhea and Malabsorption Caused by *Leishmania Donovanii*. *Indian J. Gastroenterol.* 25, 309–310.
- Barral, A., de Freitas, L. A. R., Carvalho, E. M., Almeida, R. P., Barral-Netto, M., and de Jesus, A. M. R. (1996). Biological Behavior of *Leishmania Amazonensis* Isolated From Humans With Cutaneous, Mucosal, or Visceral Leishmaniasis in Balb/C Mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54, 178–184. doi: 10.4269/ajtmh.1996.54.178
- Barral-Netto, M., Barral, A., Brownell, C. E., Skeiky, Y. A. W., Ellingsworth, L. R., Twardzik, D. R., et al. (1992). Transforming Growth Factor- β in Leishmanial Infection: A Parasite Escape Mechanism. *Sci. (80-)* 257, 545–548. doi: 10.1126/science.1636092
- Barral, A., Teixeira, M., Reis, P., Vinas, V., Costa, J., Lessa, H., et al. (1995). Transforming Growth Factor-Beta in Human Cutaneous Leishmaniasis. *Am. J. Pathol.* 147, 947–954.
- Bogdan, C. (2020). Macrophages as Host, Effector and Immunoregulatory Cells in Leishmaniasis: Impact of Tissue Micro-Environment and Metabolism. *Cytokine X* 2:100041. doi: 10.1016/j.cytex.2020.100041
- Caslin, H. L., Kiwanuka, K. N., Haque, T. T., Taruselli, M. T., MacKnight, H. P., Paranjape, A., et al. (2018). Controlling Mast Cell Activation and Homeostasis: Work Influenced by Bill Paul That Continues Today. *Front. Immunol.* 9, 868. doi: 10.3389/fimmu.2018.00868
- Chassaing, B., Kumar, M., Baker, M. T., Singh, V., and Vijay-Kumar, M. (2014). Mammalian Gut Immunity. *Biomed. J.* 37, 246–258. doi: 10.4103/2319-4170.130922
- Chattopadhyay, A., Mittal, S., Gupta, K., Dhir, V., and Jain, S. (2020). Intestinal Leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Infect.* 26, 1345–1346. doi: 10.1016/j.cmi.2020.05.003
- Christofi, F. L. (2008). Purinergic Receptors and Gastrointestinal Secretomotor Function. *Purinergic Signal.* 4, 213–236. doi: 10.1007/s11302-008-9104-4

FUNDING

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq) - Grant Number: 4226522016-4.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, the Leishmaniasis Laboratory, and the Laboratories of Parasitology and Clinical Parasitology, especially the Professor Max Jean de Ornelas Toledo. Also, the Department of Morphological Sciences and the Department of Clinical Analysis and Biomedicine at Universidade Estadual de Maringá.

- Conceição-Silva, F., and Morgado, F. N. (2019). *Leishmania* Spp-Host Interaction: There Is Always an Onset, But Is There An End? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 330. doi: 10.3389/fcimb.2019.00330
- Cruz, A. A. V., Alves-Ferreira, E. V. C., Milbratz-Moré, G., Chahud, F., Ruy, P. C., Duarte, M. I. S., et al. (2017). Case Report: Sclerosing Orbital Inflammation Caused by *Leishmania braziliensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 96, 197–199. doi: 10.4269/ajtmh.16-0389
- da Silva, M. V., Marosti, A. R., Mendes, C. E., Palombit, K., and Castelucci, P. (2017). Submucosal Neurons and Enteric Glial Cells Expressing the P2X7 Receptor in Rat Experimental Colitis. *Acta Histochem.* 119, 481–494. doi: 10.1016/j.acthis.2017.05.001
- De Giorgio, R., Guerrini, S., Barbara, G., Stanghellini, V., De Ponti, F., Corinaldesi, R., et al. (2004). Inflammatory Neuropathies of the Enteric Nervous System. *Gastroenterology* 126, 1872–1883. doi: 10.1053/j.gastro.2004.02.024
- de Oliveira, C. I., and Brodskyn, C. I. (2012). The Immunobiology of *Leishmania braziliensis* Infection. *Front. Immunol.* 3:145. doi: 10.3389/fimmu.2012.00145
- De Oliveira, C. I., Teixeira, M. J., Gomes, R., Barral, A., and Brodskyn, C. (2004). Animal Models for Infectious Diseases Caused by Parasites: Leishmaniasis. *Drug Discovery Today Dis. Model.* 1, 81–86. doi: 10.1016/j.ddmod.2004.07.005
- Drokhlyansky, E., Smillie, C. S., Van Wittenberghe, N., Ericsson, M., Griffin, G. K., Eraslan, G., et al. (2020). The Human and Mouse Enteric Nervous System at Single-Cell Resolution. *Cell* 182, 1606–1622.e23. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.003
- Farage Frade, A., Campos de Oliveira, L., Lamounier Costa, D., Henrique Nery Costa, C., Aquino, D., Van Weyenberg, J., et al. (2011). TGF β 1 and IL8 Gene Polymorphisms and Susceptibility to Visceral Leishmaniasis. *Infect. Genet. Evol.* 11, 912–916. doi: 10.1016/j.meegid.2011.02.014
- Feagins, L. A. (2010). Role of Transforming Growth Factor- β in Inflammatory Bowel Disease and Colitis-Associated Colon Cancer. *Inflamm. Bowel Dis.* 16, 1963–1968. doi: 10.1002/ibd.21281
- Fernandes, A. C. B. S., Pedrosa, R. B., de Mello, T. F. P., Donatti, L., Venazzi, E. A. S., Demarchi, I. G., et al. (2016). *In Vitro* Characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Isolates From Patients With Different Responses to Glucantime® Treatment From Northwest Paraná, Brazil. *Exp. Parasitol.* 167, 83–93. doi: 10.1016/j.exppara.2016.05.003
- Fernando, J., Faber, T. W., Pullen, N. A., Falanga, Y. T., Kolawole, E. M., Oskertizian, C. A., et al. (2013). Genotype-Dependent Effects of TGF- β 1 on Mast Cell Function: Targeting the Stat5 Pathway. *J. Immunol.* 191, 4505–4513. doi: 10.4049/jimmunol.1202723
- Figueiredo, M. M., Deoti, B., Amorim, I. F., Pinto, A. J. W., Moraes, A., Carvalho, C. S., et al. (2014). Expression of Regulatory T Cells in Jejunum, Colon, and Cervical and Mesenteric Lymph Nodes of Dogs Naturally Infected With *Leishmania Infantum*. *Infect. Immun.* 82, 3704–3712. doi: 10.1128/IAI.01862-14

- Gagini, T., De Oliveira Schubach, A., De Fatima Madeira, M., Valet-Rosalino, C. M., Pimentel, M. I. F., and Da Silva Pacheco, R. (2017). Genotypic Profiles of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* Strains From Cutaneous Leishmaniasis Patients and Their Relationship With the Response to Meglumine Antimoniate Treatment: A Pilot Study. *Parasite* 24, 1–11. doi: 10.1051/parasite/2017035
- Gantt, K. R., Schultz-Cherry, S., Rodriguez, N., Jeronimo, S. M. B., Nascimento, E. T., Goldman, T. L., et al. (2003). Activation of TGF- β by *Leishmania Chagasi*: Importance for Parasite Survival in Macrophages. *J. Immunol.* 170, 2613–2620. doi: 10.4049/jimmunol.170.5.2613
- Góis, M. B., Hermes-Uliana, C., Barreto Zago, M. C., Zanoni, J. N., da Silva, A. V., de Miranda-Neto, M. H., et al. (2016). Chronic Infection With *Toxoplasma Gondii* Induces Death of Submucosal Enteric Neurons and Damage in the Colonic Mucosa of Rats. *Exp. Parasitol.* 164, 56–63. doi: 10.1016/j.exppara.2016.02.009
- Gomes-Silva, A., Valverde, J. G., Ribeiro-Romão, R. P., Plácido-Pereira, R. M., and da-Cruz, A. M. (2013). Golden Hamster (*Mesocricetus Auratus*) as an Experimental Model for *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* Infection. *Parasitology* 140, 771–779. doi: 10.1017/S0031182012002156
- Gontijo, C. M., Pacheco, R. S., Oréfice, F., Lasmar, E., Silva, E. S., and Melo, M. N. (2002). Concurrent Cutaneous, Visceral and Ocular Leishmaniasis Caused by *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* in a Kidney Transplant Patient. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 751–753. doi: 10.1590/S0074-02762002000500029
- Guimarães, L. H., Queiroz, A., Silva, J. A., Silva, S. C., Magalhães, V., Lago, E. L., et al. (2016). Atypical Manifestations of Cutaneous Leishmaniasis in a Region Endemic for *Leishmania braziliensis*: Clinical, Immunological and Parasitological Aspects. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0005100. doi: 10.1371/journal.pntd.0005100
- Hamilton, M. J., Frei, S. M., and Stevens, R. L. (2014). The Multifaceted Mast Cell in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 20, 2364–2378. doi: 10.1097/MIB.0000000000000142
- Hoyos, C. L., Quipildor, M., Bracamonte, E., Lauthier, J. J., Cajal, P., Uncos, A., et al. (2019). Simultaneous Occurrence of Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis Caused by Different Genotypes of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*. *J. Dermatol.* 46, e320–e322. doi: 10.1111/1346-8138.14866
- Hu, M. D., and Edelblum, J. K. L. (2017). Sentinels at the Frontline: The Role of Intraepithelial Lymphocytes in Inflammatory Bowel Disease. *Curr. Pharmacol. Rep.* 3, 321–334. doi: 10.1007/s40495-017-0105-2
- Jacobson, A., Yang, D., Vella, M., and Chiu, J. I. M. (2021). The Intestinal Neuro-Immune Axis: Crosstalk Between Neurons, Immune Cells, and Microbes. *Mucosal Immunol.* 14, 555–565. doi: 10.1038/s41385-020-00368-1
- Lewis, M. D., Paun, A., Romano, A., Langston, H., Langner, C. A., Moore, I. N., et al. (2020). Fatal Progression of Experimental Visceral Leishmaniasis is Associated With Intestinal Parasitism and Secondary Infection by Commensal Bacteria, and is Delayed by Antibiotic Prophylaxis. *PLoS Pathog.* 16, e1008456. doi: 10.1371/journal.ppat.1008456
- Li, J., Hunter, C. A., and Farrell, J. P. (1999). Anti-TGF-Beta Treatment Promotes Rapid Healing of *Leishmania Major* Infection in Mice by Enhancing *In Vivo* Nitric Oxide Production. *J. Immunol.* 162, 974–979.
- Machado, C. C. A., Watanabe, P., Mendes, d., de L. J. D., Pupim, A. C. E., Ortigoza, S. M., et al. (2021). *Toxoplasma Gondii* Infection Impairs the Colonic Motility of Rats Due to Loss of Myenteric Neurons. *Neurogastroenterol. Motil.* 33:13967. doi: 10.1111/nmo.13967
- Mahadeva, S., Wyatt, J. I., and Howdle, P. D. (2002). Is a Raised Intraepithelial Lymphocyte Count With Normal Duodenal Villous Architecture Clinically Relevant? *J. Clin. Pathol.* 55, 424–428. doi: 10.1136/jcp.55.6.424
- Mawe, G. M., Strong, D. S., and Sharkey, K. A. (2009). Plasticity of Enteric Nerve Functions in the Inflamed and Postinflamed Gut. *Neurogastroenterol. Motil.* 21, 481–491. doi: 10.1111/j.1365-2982.2009.01291.x
- Ministério da Saúde (2017). “Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana,” 1st ed (Brasília: Ministério da Saúde). Available at: http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana.pdf.
- Mowat, A. M., and Agace, W. W. (2014). Regional Specialization Within the Intestinal Immune System. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 667–685. doi: 10.1038/nri3738
- Nezami, B. G., and Srinivasan, S. (2010). Enteric Nervous System in the Small Intestine: Pathophysiology and Clinical Implications. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 12, 358–365. doi: 10.1007/s11894-010-0129-9
- Pan American Health Organization (2019). *Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas* (Washington, D.C.). Available at: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/50505>.
- Panza, S. B., Vargas, R., Balbo, S. L., Bonfleur, M. L., Granzotto, D. C. T., Sant’Ana, D. M. G., et al. (2021). Perinatal Exposure to Low Doses of Glyphosate-Based Herbicide Combined With a High-Fat Diet in Adulthood Causes Changes in the Jejunums of Mice. *Life Sci.* 275, 119350. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119350
- Passos, F. C., Gois, M. B., Sousa, A. D., de Marinho, A. I. L., Corvo, L., Soto, M., et al. (2020). Investigating Associations Between Intestinal Alterations and Parasite Load According to Bifidobacterium Spp. And Lactobacillus Spp. Abundance in the Gut Microbiota of Hamsters Infected by *Leishmania Infantum*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 115, 1–11. doi: 10.1590/0074-02760200377
- Pastre, M. J., Casagrande, L., Gois, M. B., Pereira-Severi, L. S., Miqueloto, C. A., Garcia, J. L., et al. (2019). *Toxoplasma Gondii* Causes Increased ICAM-1 and Serotonin Expression in the Jejunum of Rats 12 H After Infection. *Biomed. Pharmacother.* 114:108797. doi: 10.1016/j.biopha.2019.108797
- Patino, L. H., Muñoz, M., Cruz-Saavedra, L., Muskus, C., and Ramírez, J. D. (2020). Genomic Diversification, Structural Plasticity, and Hybridization in *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 582192. doi: 10.3389/fcimb.2020.582192
- Pereira, C. G., Silva, A. L. N., de Castilhos, P., Mastrantonio, E. C., Souza, R. A., Romão, R. P., et al. (2009). Different Isolates From *Leishmania braziliensis* Complex Induce Distinct Histopathological Features in a Murine Model of Infection. *Vet. Parasitol.* 165, 231–240. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.07.019
- Quaresma, P. F., De Brito, C. F. A., Rugani, J. M. N., Freire, J. D. M., Baptista, R. D. P., Moreno, E. C., et al. (2018). Distinct Genetic Profiles of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* Associate With Clinical Variations in Cutaneous-Leishmaniasis Patients From an Endemic Area in Brazil. *Proc. Int. Astron. Union* 145, 1161–1169. doi: 10.1017/S0031182018000276
- Raina, S., Raina, R. K., Bodh, A., Rana, B. S., and Sharma, R. (2017). Gastrointestinal Leishmaniasis in Non-Endemic Region. *J. Assoc. Phys. India* 65, 106–107.
- Rêgo, F. D., da Rocha Lima, A. C. V. M., Pereira, A. A. S., Quaresma, P. F., Pascoal-Xavier, M. A., Shaw, J. J., et al. (2018). Genetic Variant Strains of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* Exhibit Distinct Biological Behaviors. *Parasitol. Res.* 117, 3157–3168. doi: 10.1007/s00436-018-6014-4
- Rêgo, F. D., Fradico, J. R. B., Teixeira-Carvalho, A., and Gontijo, C. M. F. (2019). Molecular Variants of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* Trigger Distinct Patterns of Cytokines and Chemokines Expression in Golden Hamster. *Mol. Immunol.* 106, 36–45. doi: 10.1016/j.molimm.2018.12.013
- Ribeiro, L. S. F., dos Santos, J. N., Rocha, C. A. G., and Cury, P. R. (2018). Association Between Mast Cells and Collagen Maturation in Chronic Periodontitis in Humans. *J. Histochem. Cytochem.* 66, 467–475. doi: 10.1369/0022155418765131
- Ribeiro-Romão, R. P., Moreira, O. C., Osorio, E. Y., Cysne-Finkelstein, L., Gomes-Silva, A., Valverde, J. G., et al. (2014). Comparative Evaluation of Lesion Development, Tissue Damage, and Cytokine Expression in Golden Hamsters (*Mesocricetus Auratus*) Infected by Inocula With Different *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* Concentrations. *Infect. Immun.* 82, 5203–5213. doi: 10.1128/IAI.02083-14
- Rugani, J. N., Quaresma, P. F., Gontijo, C. F., Soares, R. P., and Monte-Neto, R. L. (2018). Intraspecies Susceptibility of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* to Antileishmanial Drugs: Antimony Resistance in Human Isolates From Atypical Lesions. *Biomed. Pharmacother.* 108, 1170–1180. doi: 10.1016/j.biopha.2018.09.149
- Ryan, J. J., Kashyap, M., Bailey, D., Kennedy, S., Speiran, K., Brenzovich, J., et al. (2007). Mast Cell Homeostasis: A Fundamental Aspect of Allergic Disease. *Crit. Rev. Immunol.* 27, 15–32. doi: 10.1615/critrevimmunol.v27.i1.20
- Saha, S., Mondal, S., Ravindran, R., Bhowmick, S., Modak, D., Mallick, S., et al. (2007). IL-10- and TGF- β -Mediated Susceptibility in Kala-Azar and Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis: The Significance of Amphotericin B in the Control of *Leishmania Donovanii* Infection in India. *J. Immunol.* 179, 5592–5603. doi: 10.4049/jimmunol.179.8.5592

- Sangild, P. T., Mei, J., Fowden, A. L., and Xu, R. J. (2009). The Prenatal Porcine Intestine has Low Transforming Growth Factor-Beta Ligand and Receptor Density and Shows Reduced Trophic Response to Enteral Diets. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 296, R1053–R1062. doi: 10.1152/ajpregu.90790.2008
- Santaolalla, R., Fukata, M., and Abreu, M. T. (2011). Innate Immunity in the Small Intestine. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 27, 125–131. doi: 10.1097/MOG.0b013e3283438dea
- Santos, A.G.A.d., Ferlini, J. de P., Vicentino, S. L., Lonardoni, M. V. C., Sant'Ana, D., de, M. G., et al. (2018a). Alterations Induced in the Ileum of Mice Upon Inoculation With Different Species of *Leishmania*: A Preliminary Study. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 51, 537–541. doi: 10.1590/0037-8682-0348-2017
- Santos, A.G.A.d., Lima, L.L. de, Mota, C. A., Gois, M. B., Fernandes, A. C. B. S., Silveira, T. G. V., et al. (2018b). Insights of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection in Golden Hamster (*Mesocricetus Auratus*) Intestine. *Biomed. Pharmacother.* 106, 1624–1632. doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.120
- Schneider, L. C. L., do Nascimento, J. C. P., Trevizan, A. R., Gois, M. B., Borges, S. C., Beraldi, E. J., et al. (2018). *Toxoplasma Gondii* Promotes Changes in VIPergic Submucosal Neurons, Mucosal Intraepithelial Lymphocytes, and Goblet Cells During Acute Infection in the Ileum of Rats. *Neurogastroenterol. Motil.* 30, e13264. doi: 10.1111/nmo.13264
- Sergi, C., Shen, F., and Bouma, G. (2017). Intraepithelial Lymphocytes, Scores, Mimickers and Challenges in Diagnosing Gluten-Sensitive Enteropathy (Celiac Disease). *World J. Gastroenterol.* 23, 573–589. doi: 10.3748/wjg.v23.i4.573
- Silva, D.T. da, Alves, M. L., Spada, J. C. P., Silveira, R. de C.V., Oliveira, T.M.F.d., and Starke-Buzetti, W. A. (2018). Neutrophils, Eosinophils, and Mast Cells in the Intestinal Wall of Dogs Naturally Infected With *Leishmania Infantum*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 27, 430–438. doi: 10.1590/s1984-296120180085
- Silva, L., Damrose, E., and Fernandes, A.-M.-F. (2017). Laryngeal Leishmaniasis, a Rare Manifestation of an Emerging Disease. *Eur. Ann. Otorhinolaryngol. Head Neck Dis.* 134, 211–212. doi: 10.1016/j.anorl.2015.11.013
- Silva, D. T., Neves, M. F., Queiroz, N. M. G. P., de Spada, J. C. P., Alves, M. L., Flóro e Silva, M., et al. (2016). Correlation Study and Histopathological Description of Intestinal Alterations in Dogs Infected With *Leishmania Infantum*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 25, 24–36. doi: 10.1590/S1984-29612016009
- Silva, E.S. da, Pacheco, R. S., Gontijo, C. M. F., Carvalho, I. R., and Brazil, R. P. (2002). Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a Patient Infected With Human Immunodeficiency Virus. *Rev. do Inst. Med. Trop. São Paulo* 44, 145–149. doi: 10.1590/S0036-46652002000300006
- Soria López, E., Olalla Sierra, J., Del Arco Jiménez, A., Pereda Salguero, T., Abitei, C., and de la Torre Lima, J. (2016). Colonic Leishmaniasis in a Patient With HIV: A Case Report. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 108, 838–840. doi: 10.17235/reed.2016.4038/2015
- Souza, K. D., Fernandes, E. P. A., Santos, A. G. A., Lima, L. L., Gonzaga, W. F. K. M., Xander, P., et al. (2019). Infection by *Leishmania (Leishmania) Infantum Chagasi* Causes Intestinal Changes B-1 Cells Dependent. *Parasit. Immunol.* 41, e12661. doi: 10.1111/pim.12661
- Trevizan, A. R., Schneider, L. C. L., Araújo, E. J., de, A., Garcia, J. L., Buttow, N. C., et al. (2019). Acute *Toxoplasma Gondii* Infection Alters the Number of Neurons and the Proportion of Enteric Glial Cells in the Duodenum in Wistar Rats. *Neurogastroenterol. Motil.* 31, e13523. doi: 10.1111/nmo.13523
- Trevizan, A. R., Vicentino-Vieira, S. L., da Silva Watanabe, P., Gois, M. B., de Melo, G., de, A. N., et al. (2016). Kinetics of Acute Infection With *Toxoplasma Gondii* and Histopathological Changes in the Duodenum of Rats. *Exp. Parasitol.* 165, 22–29. doi: 10.1016/j.exppara.2016.03.015
- Troncone, E., Marafini, I., Stolfi, C., and Monteleone, G. (2018). Transforming Growth Factor- β 1/Smad7 in Intestinal Immunity, Inflammation, and Cancer. *Front. Immunol.* 9, 1407. doi: 10.3389/fimmu.2018.01407
- Vieira, T., da, S., Rugani, J. N., Nogueira, P. M., Torrecilhas, A. C., Gontijo, C. M. F., et al. (2019). Intraspecies Polymorphisms in the Lipophosphoglycan of *L. braziliensis* Differentially Modulate Macrophage Activation via TLR4. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 240. doi: 10.3389/fcimb.2019.00240
- Vodovotz, Y., Bogdan, C., Paik, J., Xie, Q. W., and Nathan, C. (1993). Mechanisms of Suppression of Macrophage Nitric Oxide Release by Transforming Growth Factor γ . *J. Exp. Med.* 178, 605–613. doi: 10.1084/jem.178.2.605
- World Health Organization (2020). *Global Leishmaniasis Surveillance 2017–2018, and First Report on 5 Additional Indicators* (Genebra). Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/339849/WER9608-eng-fre.pdf>.
- Yoo, B. B., and Mazmanian, S. K. (2017). The Enteric Network: Interactions Between the Immune and Nervous Systems of the Gut. *Immunity* 46, 910–926. doi: 10.1016/j.immuni.2017.05.011
- Yu, Y., Daly, D. M., Adam, I. J., Kitsanta, P., Hill, C. J., Wild, J., et al. (2016). Interplay Between Mast Cells, Enterochromaffin Cells, and Sensory Signaling in the Aging Human Bowel. *Neurogastroenterol. Motil.* 28, 1465–1479. doi: 10.1111/nmo.12842

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Santos, da Silva, Carneiro, de Lima, Fernandes, Silveira, Sant'Ana and Nogueira-Melo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Artigo 2:

“A infecção crônica por *Leishmania (Viannia) braziliensis* afeta a morfologia e o sistema nervoso entérico do íleo de hamsters”

Manuscrito nas normas do periódico *Biomedical Journal*.

Normas disponíveis em: <https://www.elsevier.com/journals/biomedical-journal/2319-4170/guide-for-authors>

A infecção crônica por *Leishmania (Viannia) braziliensis* afeta a morfologia e o sistema nervoso entérico do íleo de hamsters

Amanda Gubert Alves dos Santos^a; Maria Gabriela Lima da Silva^a; Erick Lincoln Carneiro^b; Lainy Leiny de Lima^c; Andrea Claudia Bekner Silva Fernandes^b; Thaís Gomes Verzignassi Silveira^d; Roberto Kenji Nakamura Cuman^d; Debora de Mello Gonçalves Sant'Ana^a; Gessilda de Alcantara Nogueira-Melo^a

^aPrograma de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil

^bDepartamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil

^cPrograma de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil

^dPrograma de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil

Introdução

A espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a principal causadora de leishmaniose no Brasil. Recentes trabalhos demonstraram que essa espécie é capaz de causar alterações morfológicas e neuronais no íleo de hamsters. O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos da infecção por *L. (V.) braziliensis* no que se refere a componentes da matriz extracelular, do sistema nervoso entérico e do sistema imunológico intestinal.

Material e Métodos

Hamsters fêmeas foram distribuídas em dois grupos controles não infectados e dois grupos infectados com diferentes cepas de *L. (V.) braziliensis*: MHOM/BR/2003/2311 (2311) e MHOM/BR/2009/3476 (3476) para cada tempo de infecção. Os animais foram eutanasiados após 90 ou 120 dias de infecção (6 grupos; $n = 6$). O íleo foi coletado para análises bioquímicas, avaliação histológica das fibras de colágeno, quantificação de mastócitos, vasos sanguíneos, células imunorreativas ao fator de transformação do crescimento beta (TGF- β -IR) e da área imunomarcada pelo peptídeo vasoativo intestinal (VIP-IR). Foi realizada a quantificação e morfometria dos neurônios dos plexos mientérico e submucoso.

Resultados

Redução da área ocupada pelas fibras colágenas do tipo I aos 90 dias de infecção e da área VIP-IR nos grupos infectados, aumento das células TGF- β -IR nos grupos 3476, enquanto no 2311 houve redução quando comparados aos controles. Os corpos dos neurônios do plexo submucoso sofreram diminuição aos 120 dias de infecção e no plexo mientérico houve redução do número de neurônios no grupo 2311.

Conclusão

A infecção por *L. (V.) braziliensis* causa alterações sugestivas de inflamação e degeneração neuronal e estas alterações dependem da cepa e do tempo de infecção.

Palavras-chave: Leishmaniose; Intestino delgado; Sistema nervoso entérico.

1. Introdução

As leishmanioses são um conjunto de doenças apresentam diferentes manifestações clínicas [1]. São causadas por protozoários do gênero *Leishmania* [2] e transmitidas pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas [3,4]. A espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a principal causadora das formas tegumentar e mucosa da leishmaniose no Brasil e na América Latina [5]. No ano de 2020, foram reportados à OMS 208.356 novos casos de leishmaniose cutânea no mundo e destes, 16,056 casos foram no Brasil [6].

L. (V.) braziliensis apresenta ampla distribuição geográfica [5] e causa lesões destrutivas [2] que podem se apresentar de formas distintas devido ao grande polimorfismo genético que esta espécie possui [7]. O polimorfismo genético do parasito [8–10] juntamente com características do hospedeiro, como a sua resposta imunológica [11], estado clínico e fatores genéticos [12] influenciam no no curso da infecção e nas manifestações clínicas.

Durante a infecção experimental por esta espécie já foram relatadas alterações histopatológicas em órgãos como baço, linfonodos, fígado [13,14] e intestino [15–17]. O estudo do intestino durante a leishmaniose é principalmente focado na infecção pelas espécies causadoras da forma visceral da doença. Em hamsters com leishmaniose visceral, foram encontrados infiltrados inflamatórios por toda a extensão do intestino [18], granulomas [19], aumento da altura dos vilos, da profundidade de cripta e da proporção de linfócitos intraepiteliais, com redução das células caliciformes, dos corpos celulares de neurônios mientéricos e na densidade populacional neuronal [20].

Alterações semelhantes foram observadas no íleo durante a infecção por diferentes cepas de *L. (V.) braziliensis*, cujo DNA e a presença de amastigotas também foi confirmada no órgão [16,17]. Tais alterações foram relacionadas ao tempo e a cepa causadora da infecção, que inclusive levaram a alterações na morfometria neuronal [17]. Sendo assim, este estudo traz um aprofundamento dos efeitos da infecção por *L. (V.) braziliensis* a fim de contribuir para o entendimento da relação parasito-intestino no que se refere a componentes da matriz extracelular, do sistema nervoso entérico e do sistema imunológico intestinal.

2. Material e Métodos

2.1 Aspectos éticos

O Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá aprovou (protocolo número 7587260416) os procedimentos experimentais realizados com animais no presente trabalho.

2.2 *Desenho experimental*

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 36 hamsters fêmeas com, aproximadamente, 21 dias de vida. Estas, foram separadas em três grupos: o grupo controle não infectado e dois grupos infectados com diferentes cepas de *L. (V.) braziliensis*. As cepas do parasito foram isoladas de pacientes atendidos pelo Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC/UEM) e identificadas no Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil [11].

As cepas MHOM/BR/2003/2311 e MHOM/BR/2009/3476 foram selecionadas do acervo do Laboratório de Leishmanioses da UEM devido a apresentarem, nos pacientes humanos, diferentes lesões e respostas terapêuticas. A cepa MHOM/BR/2009/3476 causou uma lesão atípica, que necessitou de diversas intervenções terapêuticas até a cura do paciente. Enquanto a lesão causada pela MHOM/BR/2003/2311 era típica, e apresentou uma resposta terapêutica considerada moderadamente resistente, uma vez que houve cura após o segundo tratamento [11].

2.3 *Infecção experimental*

Após a seleção das cepas, os parasitos foram descongelados, reativados e cultivados no meio 199 (Gibco Laboratories®, Grand Island, USA) suplementado com 1% L-glutamina, 1% de urina humana e 10% de soro bovino fetal. Para a infecção, foi utilizada uma suspensão de $2 \times 10^7/100 \mu\text{l}$ promastigotas de cada cepa, na fase estacionária de crescimento, na quinta passagem *in vitro*. As hamsters foram anestesiadas com uma combinação de xilazina (Calmiun Agener-Union Animal Health) e cetamina (Francotar®-Virbac Animal health) e receberam no dorso da pata esquerda traseira a suspensão de *Leishmania* via intradérmica, a depender se eram do grupo infectado com a cepa MHOM/BR/2003/2311 (2311) ou com a cepa MHOM/BR/2009/3476 (3476). Os animais do grupo controle (GC) receberam da mesma forma 100 μl de tampão fosfato salino (PBS) estéril.

Os animais foram pesados antes da infecção e antes da eutanásia, sendo mantidos em caixas ventiladas, com ar filtrado, maravalha autoclavada e água filtrada e ração *ad libitum*. Durante todo o período experimental, os animais eram observados em relação aos seus sinais clínicos e as patas traseiras eram medidas com um paquímetro digital e analisadas para lesões e edema uma vez na semana. Após 90 ou 120 dias de infecção, eles foram eutanasiados por aprofundamento anestésico e o seu íleo foi coletado.

2.4 *Processamento do íleo*

Aproximadamente, 1 cm do íleo de todos os animais foi coletado para processamento histológico, que consistiu na fixação em paraformaldeído tamponado, desidratação em bateria crescente de álcool etílico, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Em seguida, foram realizados cortes semisseriados de 5 µm em micrótomo (Leica RM2145, Nussloch, Alemanha) que foram depositados em lâminas para a realização de imuno-histoquímica e diferentes colorações histológicas.

Outros 0,5 cm do íleo foram coletados para a realização das análises bioquímicas de dosagem de óxido nítrico (NO) e da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) e da N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG). Esse material foi limpo, pesado, congelado em nitrogênio líquido e mantido em refrigerador a -80°C até a utilização. Por fim, aproximadamente 2 cm do íleo foi coletado para as análises neuronais, sendo fixado em paraformaldeído a 4%, lavado em PBS e armazenado em PBS com azida sódica (0,08%) a 4°C.

2.5 Análises histológicas

As lâminas obtidas após a microtomia foram submetidas a diferentes técnicas. Para a análise das fibras colágenas, foi realizada a coloração de picrosirius red e 32 imagens por animal foram capturadas: 16 imagens utilizando um filtro polarizador (Olympus U-POT, Japão), para a quantificação da área média ocupada pelas fibras colágenas dos tipos I e III; e 16 imagens sem o filtro polarizador, para a mensuração das fibras colágenas totais (µm²). Essas capturas foram realizadas no microscópio ótico Olympus BX50 (Minato-Ku, Japão) na objetiva de 20x [17,21]. Em lâminas coradas com azul de toluidina, foram quantificados os mastócitos totais presentes em 100 campos microscópicos, na objetiva de 100x (Nikon Eclipse E200). Esse resultado foi expresso em número de mastócitos/mm² [17,22]. E em lâminas coradas pela técnica de hematoxilina e eosina, foram quantificados os vasos sanguíneos encontrados abaixo de 100 criptas intestinais [23]. Estes foram classificados em arteríolas ou vênulas de acordo com a espessura da camada muscular da parede do vaso observada em microscopia ótica. Sendo a camada de músculo liso mais espessa e mais pronunciada nas arteríolas [24]. O resultado foi expresso em número de arteríolas ou vênulas / 100 criptas.

Também foi realizada a técnica de imuno-histoquímica, para a marcação de células imunorreativas para TGF-β (TGF-β-IR) e do peptídeo vasoativo intestinal (VIP) no tecido. As lâminas histológicas foram submetidas ao processo de desparafinização, reidratação e recuperação antigênica com tampão citrato. Em seguida, foi realizada o bloqueio da peroxidase endógena e das ligações inespecíficas. Então, as lâminas foram incubadas separadamente com os anticorpos primários anti-TGF-β (diluição 1:100; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA) e anti-VIP (diluição 1:100; Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA) *over night* em câmara

úmida a 4°C. No dia seguinte, elas foram incubadas com o conjugado polímero (Life Technologies Corp., Frederick, MD, EUA), reveladas com o *stable* DAB (Life Technologies Corp., Frederick, MD, EUA), contracoradas com hematoxilina e montadas com lamínulas [16]. A coloração marrom nas lâminas indica uma marcação positiva.

Para as análises das células TGF- β -IR foram capturadas 16 imagens da túnica mucosa e tela submucosa de cada animal (objetiva de 40x, microscópio Olympus CX31, câmera digital Moticam 2000, 2.0 Megapixel) e quantificadas todas as células marcadas [17]. Já para as análises da imunomarcação de VIP, foram capturadas 16 imagens das camadas muscular e submucosa, próxima aos gânglios (objetiva de 20x, microscópio Olympus BX50, câmera digital 3CCD) nas quais foi realizada a mensuração da área imunomarcada por VIP, utilizando o programa Image-Pro Plus (versão 4.5.0.29). Por meio do sistema de seleção de cores, foi selecionada a coloração marrom acastanhada proveniente da revelação pelo DAB. O resultado foi expresso em % da área imunomarcada por VIP (VIP-IR).

2.6 Análises bioquímicas

As análises foram realizadas como descrito por Santos, 2021 [17]. Brevemente, o fragmento do íleo foi homogeneizado com PBS, centrifugado e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem de NO por meio da determinação indireta de nitrito pelo método de Griess e para a avaliação da atividade enzimática da MPO com a solução de o-diasidina. Ambas as reações foram lidas em leitor de microplacas (Spectra Max Plus) nos comprimentos de onda de 550 nm e 450 nm, e expressos em concentração de NO²⁻ (μ M) e em densidade ótica (DO), respectivamente.

O pellet foi ressuspendido em PBS com brometo de hexadeciltrimetilamônio, homogeneizado e centrifugado novamente. O sobrenadante foi utilizado para a avaliação da atividade enzimática da NAG com tampão citrato e p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosamina também em leitor de microplaca, a 405 nm. Os resultados foram expressos em OD.

2.7 Análises neuronais

Assim como descrito por Santos, 2021 [17], o material utilizado para as análises neuronais dos plexos mientérico e submucoso foi dissecado em estereomicroscópio para a obtenção dos preparados totais de membrana, que foram submetidos a técnica de imuno-histoquímica com o anticorpo primário anti-HuC/HuD (1:300, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) para a marcação dos neurônios entéricos. Após 48 horas em agitação a temperatura ambiente, o material foi lavado com PBS e incubado com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (1:300; Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Ao final da técnica, as lâminas foram mantidas em refrigeração a 4°C protegidas da luz.

Nessas lâminas, foram capturadas 32 imagens aleatoriamente utilizando a objetiva de 20x em um microscópio Olympus FSX100 (Olympus, Tóquio, Japão) com filtros de fluorescência, que foram utilizadas para a mensuração e contagem de neurônios utilizando o *software* Image-Pro® Plus (version 4.5.0.29). Nessas imagens, foi realizada a mensuração da área (μm^2) do corpo de 100 neurônios HuC/HuD-imunorreativos dos plexos mientérico e submucoso. No plexo mientérico, foram quantificados todos os neurônios presentes nas imagens e no plexo submucoso, foram quantificados os neurônios dentro e fora dos gânglios e a quantidade de gânglios.

2.8 Análises estatísticas

Primeiramente, foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, para verificar a distribuição dos dados. Aqueles cuja distribuição foi considerada normal, foram comparados pelo teste de Análise de Variância de dois fatores seguido do pós teste de Tukey. Já nos que tiveram distribuição livre, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. Todas as análises foram realizadas no software GraphPad Prism 8.0.1 e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram representados em *box plots* (mediana e percentis 25 a 75), *whiskers* (percentis 2,5 a 97,5) e média.

3. Resultados

A confirmação da infecção foi realizada pelo desenvolvimento da lesão na pata onde o parasito foi inoculado. Todos os animais do presente estudo desenvolveram edema, seguido de lesão no primeiro mês após a infecção. Não houve diferença significativa nas lesões entre as cepas (Figura 1) e o único sinal clínico observado foi a dificuldade de locomoção devido a progressão da lesão.

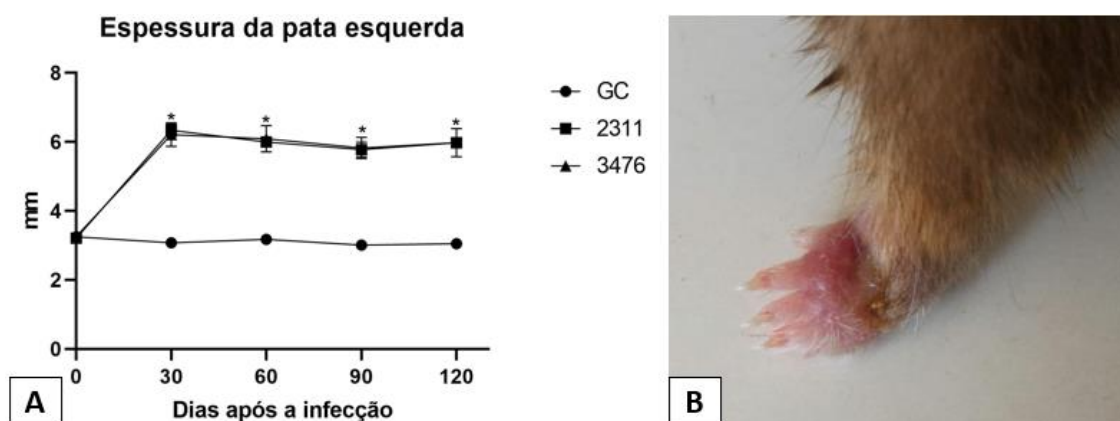


Figura 1. (A) Espessura da pata esquerda traseira dos hamsters infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis* antes da infecção e após 30, 60, 90 e 120 dias de infecção. (B) Fotografia representativa de uma lesão aos 120 dias de infecção por *L. (V.) braziliensis*. * $p < 0,001$ dos grupos infectados em relação ao controle. GC: grupo controle. 2311: grupo infectado com a cepa MHOM/BR/2003/2311 de *L. (V.) braziliensis*. 3476: grupo infectado com a cepa MHOM/BR/2009/3476 de *L. (V.) braziliensis*.

Os animais do presente estudo são os mesmos utilizados no experimento de Santos, 2018, no qual foi relatado a detecção do DNA do parasito no íleo e linfonodo mesentérico e de amastigotas imunomarcadas no íleo. Além disso, diversas alterações morfológicas foram observadas, como aumento de linfócitos intraepiteliais, infiltrados inflamatórios e ganglionite [16].

Devido a essas alterações sugestivas de um processo inflamatório, nesse estudo realizamos a dosagem de NO e a avaliação da atividade enzimática da MPO. Apesar das dosagens apresentarem valores semelhantes ao controle, estavam reduzidas em aproximadamente 60% aos 120 dias de infecção no grupo 3476 quando comparado ao grupo de 90 dias. Ambas as análises apresentaram um efeito significativo para o tempo de infecção [NO: $F_{(1, 18)} = 5,43$; $p = 0.0316$; MPO: $F_{(1, 18)} = 17$; $p < 0,001$]. Por outro lado, a atividade enzimática da NAG não demonstrou alterações significativas (Figura 2).

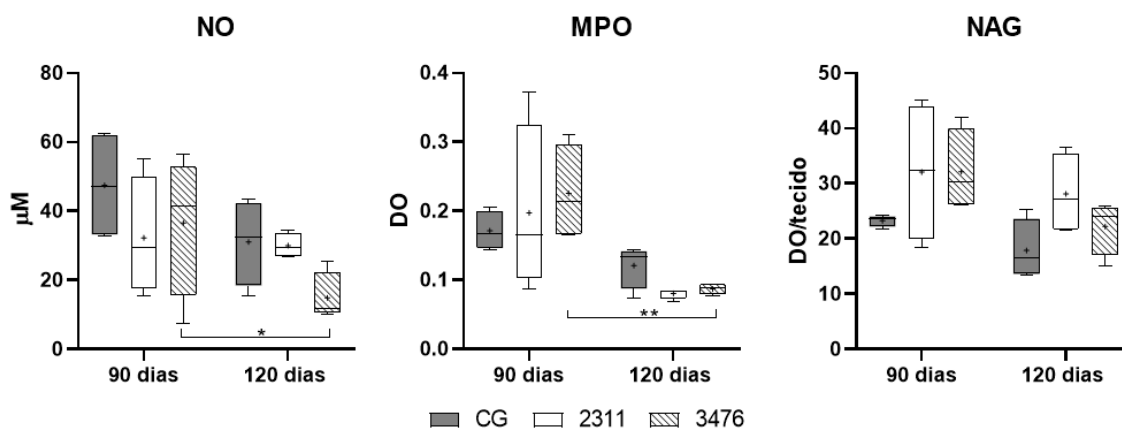


Figura 2. Análises bioquímicas. Dosagem de óxido nítrico (NO) e avaliação da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) e da N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) em hamsters infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis* por 90 ou 120 dias. Dados representados em *box plots* (mediana e percentis 25 a 75), *whiskers* (percentis 2,5 a 97,5) e média (+) ($n = 4$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. DO: Densidade ótica. GC: grupo controle. 2311: grupo infectado com a cepa MHOM/BR/2003/2311 de *L. (V.) braziliensis*. 3476: grupo infectado com a cepa MHOM/BR/2009/3476 de *L. (V.) braziliensis*.

Em relação ao colágeno, nas fibras colágenas totais e do tipo III não foram observadas alterações significativas em nenhum dos grupos infectados. Contudo, nas fibras colágenas do tipo I foi observado uma interação significativa entre as variáveis [$F_{(2, 30)} = 4,59$; $p = 0,018$] com redução de mais de 38% nos dois grupos infectados aos 90 dias em relação ao respectivo GC (Figura 3).

O número de mastócitos dispersos na lâmina própria não apresentou alterações quantitativas. Contudo, a contagem das células TGF-β-IR apresentou efeito significativo para a infecção [$F_{(2, 18)} = 53,6$; $p < 0,0001$] com resultados distintos dependentes da cepa. O grupo 2311 demonstrou uma redução de aproximadamente 24% e 39% na quantidade dessas células em relação ao GC aos 90 e 120 dias de infecção, respectivamente. Por outro lado, os animais do grupo 3476

apresentaram um aumento de 52% e 22% aos 90 e 120 dias de infecção, respectivamente, quando comparados aos GCs (Figura 4).

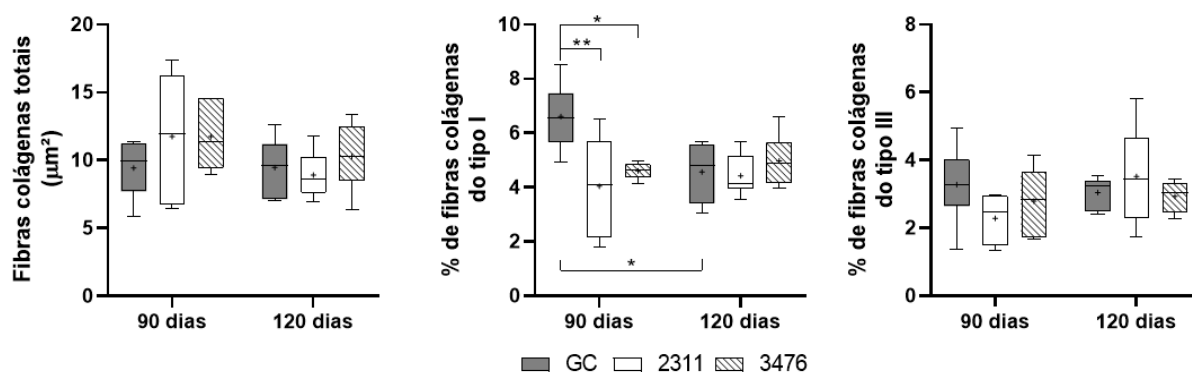


Figura 3. Área média ocupada pelas fibras colágenas totais (μm^2) e a porcentagem dos tipos I e III no íleo de hamsters infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis* por 90 ou 120 dias. Dados representados em *box plots* (mediana e percentis 25 a 75), *whiskers* (percentis 2,5 a 97,5) e média (+) ($n = 6$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. GC: grupo controle. 2311: grupo infectado com a cepa MHOM/BR/2003/2311 de *L. (V.) braziliensis*. 3476: grupo infectado com a cepa MHOM/BR/2009/3476 de *L. (V.) braziliensis*.

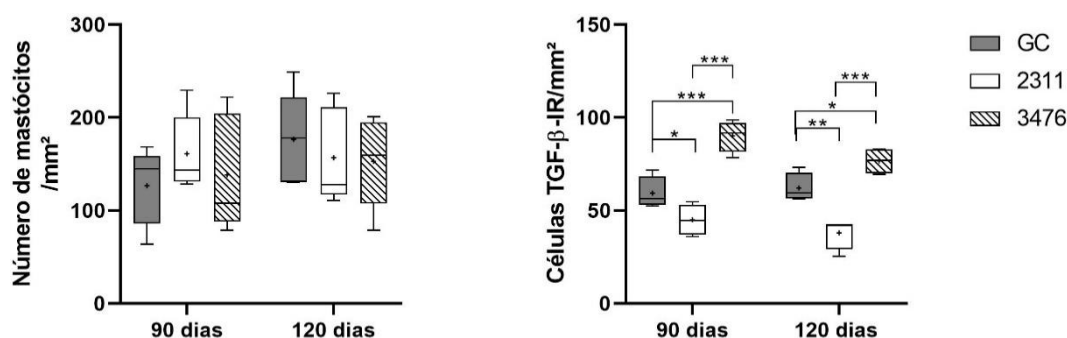


Figura 4. Proporção de mastócitos totais ($n = 6$) e células TGF- β imunorreativas (TGF- β -IR; $n = 4$) em 1 mm^2 do íleo de hamsters infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis* por 90 ou 120 dias. Dados representados em *box plots* (mediana e percentis 25 a 75), *whiskers* (percentis 2,5 a 97,5) e média (+). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. GC: grupo controle. 2311: grupo infectado com a cepa MHOM/BR/2003/2311 de *L. (V.) braziliensis*. 3476: grupo infectado com a cepa MHOM/BR/2009/3476 de *L. (V.) braziliensis*.

Outro parâmetro avaliado foi a densidade vascular no íleo das hamsters. Para essa análise, os vasos sanguíneos foram classificados em arteríolas e vênulas, dependendo da sua constituição morfológica. Em ambos os casos, houve um efeito significativo da infecção [arteríolas: $F_{(2, 24)} = 17,6$; $p < 0,0001$; vênulas: $F_{(2, 26)} = 10,6$; $p = 0,0004$], com um aumento na quantidade de arteríolas nos dois grupos infectados aos 90 dias e no grupo 2311 aos 120 dias de infecção, em relação aos respectivos controles. O número de vênulas estava aumentado nos grupos 3476 aos 90 dias e 2311 e 3476 aos 120 dias de infecção ao ser comparado com os controles (Figura 5). Tendo em vista as alterações já citadas, nós realizamos a morfometria e contagem dos neurônios dos plexos mientérico e submucoso. A morfometria dos corpos neuronais do plexo mientérico não apresentou alterações significativas. Por outro lado, no plexo submucoso, houve uma influência significativa da infecção [$F_{(2, 18)} = 8,34$; $p = 0,0027$], com uma redução de 24% na área do corpo neuronal no grupo 2311 aos 90 dias de infecção quando comparado ao controle

e aos 120 dias, houve redução de aproximadamente 37% no grupo 2311 e de 23% no 3476 (Figura 6).

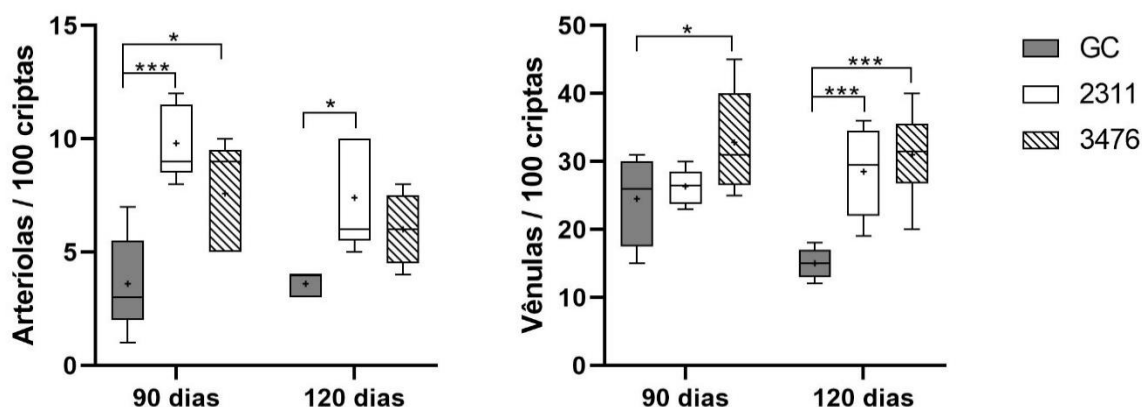


Figura 5. Quantificação de arteríolas e vênulas em 100 criptas do íleo de hamsters infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis* por 90 ou 120 dias. Dados representados em *box plots* (mediana e percentis 25 a 75), *whiskers* (percentis 2,5 a 97,5) e média (+) ($n = 6$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. GC: grupo controle. 2311: grupo infectado com a cepa MHOM/BR/2003/2311 de *L. (V.) braziliensis*. 3476: grupo infectado com a cepa MHOM/BR/2009/3476 de *L. (V.) braziliensis*.

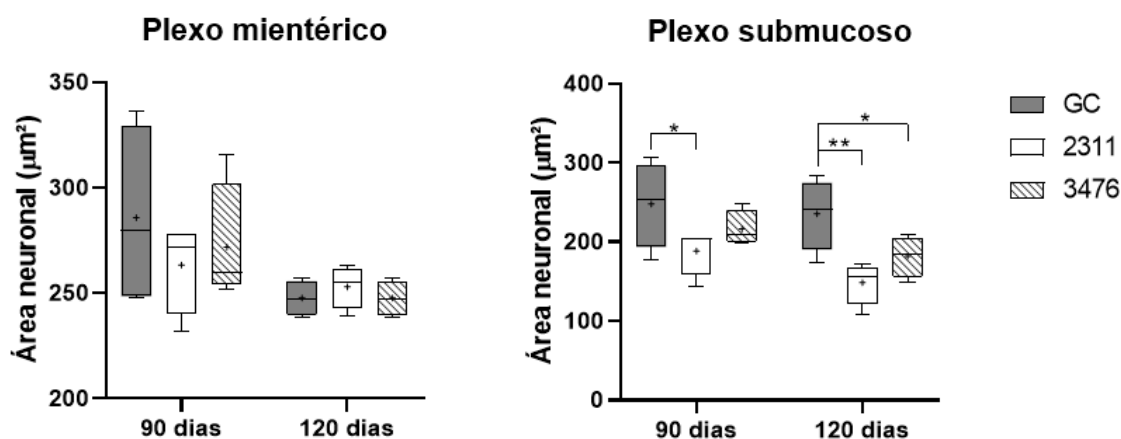


Figura 6. Área do corpo neuronal (μm^2) nos neurônios do plexo mientérico e submucoso do íleo de hamsters infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis* por 90 ou 120 dias. Dados representados em *box plots* (mediana e percentis 25 a 75), *whiskers* (percentis 2,5 a 97,5) e média (+) ($n = 4$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. GC: grupo controle. 2311: grupo infectado com a cepa MHOM/BR/2003/2311 de *L. (V.) braziliensis*. 3476: grupo infectado com a cepa MHOM/BR/2009/3476 de *L. (V.) braziliensis*.

É interessante ressaltar que, apesar de não haver alterações morfométricas nos neurônios do plexo mientérico, houve redução de 11% no número dessas células no grupo 2311 aos 120 dias de infecção, quando comparado ao seu controle [infecção: $F_{(2, 18)} = 7,21$; $p = 0,005$]. Já no plexo submucoso, observamos no grupo 2311 aos 120 dias de infecção, um maior número de neurônios fora de gânglios quando comparado ao 2311 de 90 dias e ao 3476 aos 120 dias, demonstrando assim o efeito da interação entre as variáveis [$F_{(2, 18)} = 6,6$; $p = 0,0071$] (Figura 7).

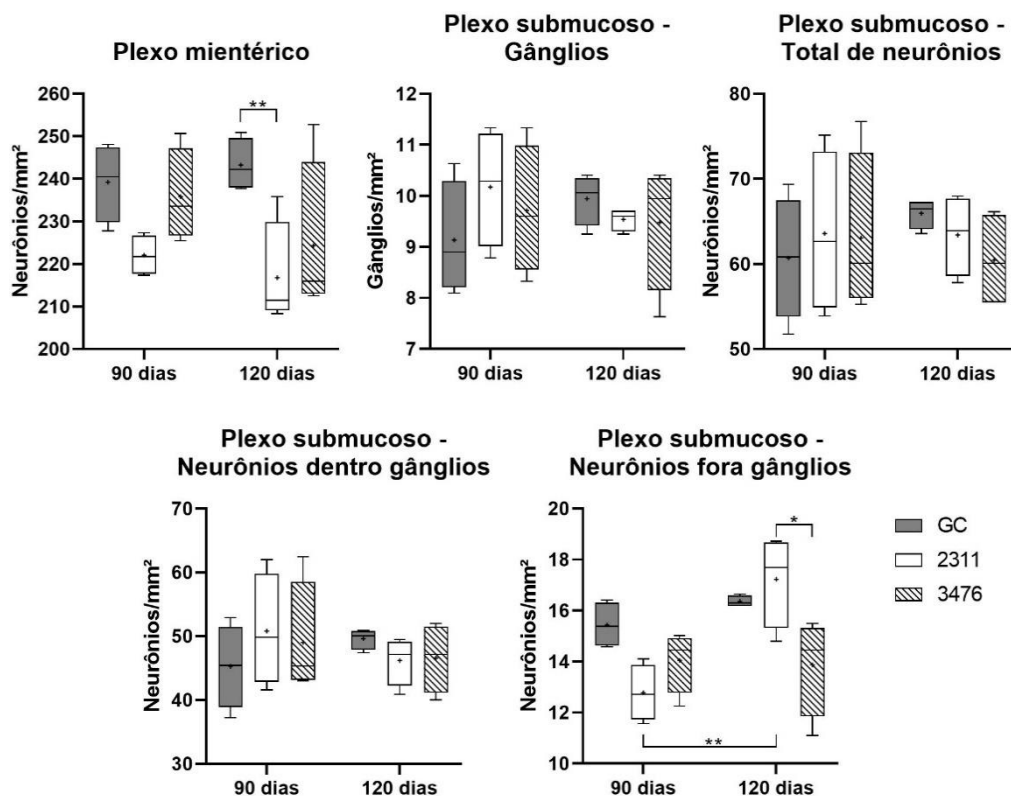


Figura 7. Quantificação dos neurônios do plexo mientérico e dos gânglios e neurônios dentro, fora de gânglios e o total no plexo submucoso no íleo de hamsters infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis* por 90 ou 120 dias. Dados representados em *box plots* (mediana e percentis 25 a 75), *whiskers* (percentis 2,5 a 97,5) e média (+) ($n = 4$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. GC: grupo controle. 2311: grupo infectado com a cepa MHOM/BR/2003/2311 de *L. (V.) braziliensis*. 3476: grupo infectado com a cepa MHOM/BR/2009/3476 de *L. (V.) braziliensis*.

Por fim, a análise da área imunomarcada por VIP demonstrou uma redução de 24% no grupo 2311 aos 90 dias de infecção e de mais de 22% nos grupos infectados aos 120 dias quando comparados aos respectivos controles. Houve ainda a redução da expressão desse hormônio no íleo dos animais do grupo 3476 aos 120 dias quando comparado ao mesmo grupo de 90 dias. Observou-se um efeito significativo para a infecção [$F_{(2, 17)} = 29,1$; $p < 0,0001$] e a interação entre as variáveis [$F_{(2, 17)} = 6,92$; $p = 0,0063$] (Figura 8).

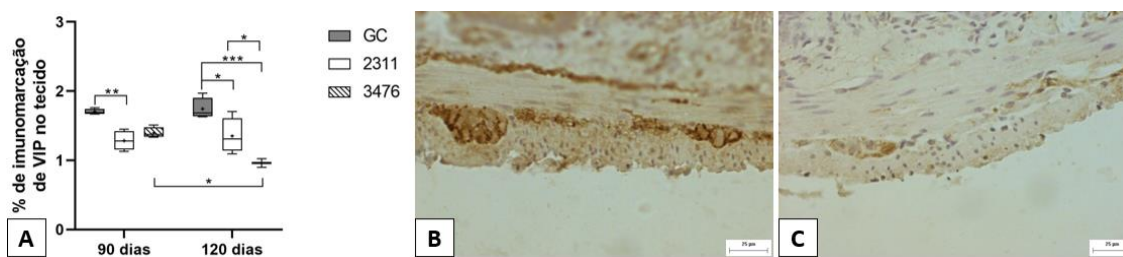


Figura 8. (A) Porcentagem da área imunorreativa ao VIP no íleo de hamsters infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis* por 90 ou 120 dias. Fotomicrografias representativas dos grupos (B) GC e (C) 3476 aos 120 dias de infecção. Dados representados em *box plots* (mediana e percentis 25 a 75), *whiskers* (percentis 2,5 a 97,5) e média (+) ($n = 4$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. GC: grupo controle. 2311: grupo infectado com a cepa MHOM/BR/2003/2311 de *L. (V.) braziliensis*. 3476: grupo infectado com a cepa MHOM/BR/2009/3476 de *L. (V.) braziliensis*.

4. Discussão

A infecção por *L. (V.) braziliensis* é responsável por causar lesões destrutivas na pele [2], com o possível acometimento de mucosas [5]. Contudo, estudos têm mostrado que essa espécie de *Leishmania* pode ser encontrada disseminada [13,25,26] e causar alterações histopatológicas em outros órgãos como o baço e em linfonodos [13,14].

Recentemente, nosso grupo de pesquisa vem investigando as possíveis consequências da infecção por *L. (V.) braziliensis* no intestino de roedores [15–17]. Um estudo prévio utilizando os mesmos animais deste trabalho detectou o DNA do parasito no íleo e linfonodo mesentérico e a imunomarcagem de amastigotas no íleo. Além disso, foram demonstradas diversas alterações intestinais, como a presença de infiltrados inflamatórios, o aumento nos linfócitos intraepiteliais, aumento na espessura das camadas que compõe a parede intestinal e na largura e altura de vilos [16]. Para um melhor entendimento dos processos envolvidos no acometimento intestinal durante essa infecção, neste trabalho avaliamos outros parâmetros, como as fibras colágenas, atividade enzimática e componentes do SNE.

A infecção com cepas utilizadas nesse estudo levou a formação de infiltrados inflamatórios no íleo destes animais [16], predominantemente formados por leucócitos mononucleares, mas também contendo neutrófilos e eosinófilos. Os leucócitos podem produzir substâncias como collagenases e gelatinases [27] que são responsáveis pela degradação das fibras de colágeno [28]. Aos 90 dias de infecção, observamos uma redução de fibras colágenas do tipo I nos dois grupos infectados, possivelmente devido a sua degradação. Aos 120 dias de infecção, não foram observadas alterações nas fibras colágenas, o que pode estar relacionado aos níveis de NO e MPO mais baixos.

A MPO é uma enzima considerada um marcador de dano tecidual e inflamação, encontrada no ambiente extracelular após a ativação de neutrófilos [29]. No sangue periférico de nossos animais, foi observado um aumento de neutrófilos circulantes no grupo 3476 aos 90 dias de infecção [16], que podem estar sendo atraídos para a lesão cutânea ou outros órgãos. No íleo, a atividade da MPO nos grupos infectados foi semelhante à do GC. Portanto, sugerimos que neste órgão, durante a infecção crônica por *L. (V.) braziliensis* não há uma atração ou ativação neutrofílica expressiva. Observamos também que, ao comparar os tempos de infecção, há a redução da atividade da enzima MPO no grupo 3476 aos 120 dias o que pode estar relacionado ao aumento de células TGF- β -IR nos grupos 3476, uma vez que, essa citocina é capaz de inibir a degranulação de neutrófilos [30], o que pode ter ficado mais evidente com o passar do tempo. Este mesmo grupo também apresentou redução nos valores de NO quando comparado ao grupo 3476 de 90 dias de infecção. Sabe-se que o TGF- β está também envolvido no *downregulation*

de algumas funções dos macrófagos, como por exemplo a produção de NO [31,32]. Esta, é uma das substâncias mais importantes contra a *Leishmania* intracelular [32], logo, a sua diminuição poderia tornar o hospedeiro mais suscetível a infecção [33]. É importante ressaltar que, o grupo 3476 aos 120 dias de infecção, foi o único em que o DNA do parasito foi detectado por qPCR no íleo de todos os animais analisados [16].

Este é o primeiro trabalho a demonstrar o aumento significativo da densidade vascular (arteríolas e vênulas) no íleo das hamsters após a infecção crônica por *L. (V.) braziliensis*. Essa alteração poderia ser consequência do aumento de células TGF- β -IR, uma vez que essa citocina está relacionada à angiogênese [34]. Por outro lado, esse aumento na densidade vascular também foi observado no grupo 2311, que apresentou redução na quantidade destas células, logo, outros fatores podem estar atuando neste processo. Contudo, nós não realizamos a dosagem de TGF- β , o que seria importante uma vez que, apesar da redução das células imunorreativas, estas poderiam estar secretando maiores quantidades da citocina.

A redução na quantidade de células TGF- β -IR no íleo dos animais do grupo 2311 poderia estar associada a redução na disponibilidade de VIP próxima aos gânglios no íleo dos animais infectados, uma vez que esse hormônio peptídico é importante neurotransmissor secretado pelos neurônios de ambos os plexos do SNE [35,36] e apresenta propriedades anti-inflamatórias que regulam a liberação de TGF- β pelos linfócitos T [37]. Em trabalhos com outros protozoários, foi verificada a diminuição na proporção de neurônios VIPérgicos, fato que pode ser associado a ruptura da barreira epitelial [38] e consequentemente favorece a invasão de microrganismos da microbiota [39]. Sendo assim, a redução de VIP pode estar envolvida no aumento da resposta inflamatória descrita nesses animais por Santos [16], como aumento da altura e largura de vilos, aumento de linfócitos intraepiteliais, ganglionite e periganglionite.

A ganglionite já foi descrita na leishmaniose causada por *L. infantum* [40] e por outras cepas de *L. (V.) braziliensis* [17]. Uma vez que a inflamação dos glânglios pode causar degeneração neuronal, redução no número de neurônios e consequente perda da função [41]. Nesse trabalho avaliamos os neurônios dos plexos mientérico e submucoso. O plexo mientérico é responsável pela regulação da motilidade intestinal [42], realizando o relaxamento e a contração do órgão [43]. Nossos resultados demonstraram uma redução quantitativa nos neurônios do plexo mientérico no grupo 2311 aos 120 dias de infecção. Na infecção por *Trypanosoma cruzi* foi relatado que a degeneração neuronal está associada a hipertrofia das camadas musculares [44], o que também foi observado nesses animais [16].

Já no plexo submucoso, não foram encontradas alterações quantitativas, porém a área dos corpos neuronais dos grupos 2311 nos dois tempos de infecção e do 3476 aos 120 dias se

apresentaram reduzidas quando comparadas aos respectivos controles. Esses neurônios realizam o controle da secreção das células epiteliais, do fluxo sanguíneo [43] e a distensão da mucosa intestinal [45] a partir das alterações luminiais. Há relatos de redução na área do corpo neuronal no plexo submucoso associada a um ambiente intestinal sugestivo de inflamação [17,38,46]. Essa redução pode estar associada a menor liberação de seus neurotransmissores, como o VIP, o que poderia resultar na redução da área imunomarcada próxima aos gânglios, como observado em nosso experimento. Contudo, o VIP também é expresso em células imunes, como células T ativadas [47], células B, mastócitos e eosinófilos e está presente em tecidos linfoides como as placas de Peyer [48]. Portanto, a quantificação dos neurônios VIPérgicos e de células VIP-IR na camada mucosa são necessárias para um melhor entendimento das implicações deste hormônio peptídico em nosso modelo experimental.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho e dos demais artigos que utilizaram do mesmo modelo experimental [16,17], revelamos que a infecção por *L. (V.) braziliensis* afeta o íleo de hamsters de formas diferentes de acordo com a cepa e espécie de infecção. Nestes trabalhos, sugerimos mecanismos que podem elucidados em próximos estudos, para melhor entendimento desta relação parasito-hospedeiro. Apontamos como possíveis alvos de pesquisa a avaliação de outros neurotransmissores e citocinas, além do estudo da microbiota intestinal e da funcionalidade intestinal durante essa infecção.

5. Conclusões

Em nosso modelo experimental, observamos que a infecção por *L. (V.) braziliensis* leva a alterações de componentes da matriz extracelular e do SNE, que são dependentes da cepa e do tempo de infecção. Assim como na proporção das células TGF- β -IR e na secreção de VIP próximo aos gânglios. Essas alterações podem desempenhar um papel na imunidade do íleo e no curso da infecção. Outros estudos devem ser realizados para um melhor entendimento dessa relação, para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos e das possíveis consequências.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, o Laboratório de Leishmanioses, de Inflamação e os Laboratórios de Parasitologia e Parasitologia Clínica da UEM, especialmente o professor Max Jean de Ornelas Toledo. Também agradecemos os departamentos de Análises Clínicas e Biomedicina, de Ciências Morfológicas e de Farmacologia e Terapêutica da UEM. Por fim, agradecemos o Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia e o laboratório de Neurogastroenterologia da UEM.

Fontes de Financiamento

Este trabalho foi financiado em parte pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq) – [número de concessão: 4226522016-4] e com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Referências

- [1] De Brito RCF, Aguiar-Soares RD de O, Cardoso JM de O, Coura-Vital W, Roatt BM, Reis AB. Recent advances and new strategies in Leishmaniasis diagnosis. *Appl Microbiol Biotechnol* 2020;104:8105–16. <https://doi.org/10.1007/S00253-020-10846-Y/TABLES/2>.
- [2] Neves DP, Melo AL de, Linardi PM, Vitor RWA. *Parasitologia humana*. 13. ed.-. São Paulo: Atheneu; 2016.
- [3] Moraes CS, Aguiar-Martins K, Costa SG, Bates PA, Dillon RJ, Genta FA. Second Blood Meal by Female *Lutzomyia longipalpis*: Enhancement by Oviposition and Its Effects on Digestion, Longevity, and *Leishmania* Infection. *Biomed Res Int* 2018;2018:2472508. <https://doi.org/10.1155/2018/2472508>.
- [4] Serafim TD, Coutinho-Abreu I V., Dey R, Kissinger R, Valenzuela JG, Oliveira F, et al. Leishmaniasis: the act of transmission. *Trends Parasitol* 2021;37:976–87. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2021.07.003>.
- [5] Ministério da Saúde. Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar. 1ª. Brasília: 2017.
- [6] Ruiz-Postigo JA, Jain S, Mikhailov A, Valadas S, Warusavithana S, Osman M, et al. Global leishmaniasis surveillance: 2019-2020, a baseline for the 2030 roadmap. *Relev Épidémiologique Hebd* 2021;35:19.
- [7] Patino LH, Muñoz M, Cruz-Saavedra L, Muskus C, Ramírez JD. Genomic Diversification, Structural Plasticity, and Hybridization in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;10:1. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.582192>.
- [8] Vieira T da S, Rugani JN, Nogueira PM, Torrecilhas AC, Gontijo CMF, Descoteaux A, et al. Intraspecies Polymorphisms in the Lipophosphoglycan of *L. braziliensis* Differentially Modulate Macrophage Activation via TLR4. *Front Cell Infect Microbiol* 2019;9:240. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00240>.
- [9] Indiani de Oliveira C, Teixeira MJ, Teixeira CR, Ramos de Jesus J, Bomura Rosato A, Silva JS da, et al. *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. *Microbes Infect* 2004;6:977–84.

- <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.05.009>.
- [10] Alves-Ferreira EVC, Toledo JS, De Oliveira AHC, Ferreira TR, Ruy PC, Pinzan CF, et al. Differential Gene Expression and Infection Profiles of Cutaneous and Mucosal *Leishmania braziliensis* Isolates from the Same Patient. PLoS Negl Trop Dis 2015;9:e0004018. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004018>.
 - [11] Fernandes ACBS, Pedroso RB, de Mello TFP, Donatti L, Venazzi EAS, Demarchi IG, et al. In vitro characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolates from patients with different responses to Glucantime® treatment from Northwest Paraná, Brazil. Exp Parasitol 2016;167:83–93. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.05.003>.
 - [12] Quaresma PF, De Brito CFA, Rugani JMN, Freire JDM, Baptista RDP, Moreno EC, et al. Distinct genetic profiles of *Leishmania (Viannia) braziliensis* associate with clinical variations in cutaneous-leishmaniasis patients from an endemic area in Brazil. Proc Int Astron Union 2018;145:1161–9. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000276>.
 - [13] Gomes-Silva A, Valverde Jg, Ribeiro-Romão Rp, Plácido-Pereira Rm, Da-Cruz Am. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. Parasitology 2013;140:771–9. <https://doi.org/10.1017/S0031182012002156>.
 - [14] Pereira CG, Silva ALN, de Castilhos P, Mastrantonio EC, Souza RA, Romão RP, et al. Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. Vet Parasitol 2009;165:231–40. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.019>.
 - [15] Santos AGA dos, Ferlini J de P, Vicentino SL, Lonardoni MVC, Sant’Ana D de MG, Melo G de AN de, et al. Alterations induced in the ileum of mice upon inoculation with different species of *Leishmania*: a preliminary study. Rev Soc Bras Med Trop 2018;51:537–41. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0348-2017>.
 - [16] Santos AGA dos, Lima LL de, Mota CA, Gois MB, Fernandes ACBS, Silveira TGV, et al. Insights of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) intestine. Biomed Pharmacother 2018;106:1624–32. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.120>.
 - [17] Santos AGA dos, da Silva MGL, Carneiro EL, de Lima LL, Fernandes ACBS, Silveira TGV, et al. A New Target Organ of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Chronic Infection: The Intestine. Front Cell Infect Microbiol 2021;0:626. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.687499>.
 - [18] González JL, Insa F, Novoa C, Pizarro M. Intestinal amyloidosis in hamsters with

- visceral leishmaniasis. *Br J Exp Pathol* 1986;67:353–60.
- [19] Mangoud AM, Ramadan ME, Morsy TA, Amin AM, Mostafa SM. Histopathological studies of Syrian golden hamsters experimentally infected with *Leishmania D. infantum*. *J Egypt Soc Parasitol* 1997;27:689–702.
- [20] Santos De Lima SK, Novais Cavallone I, Soares Oliveira K, Felipe L, Passero D, Dalastra Laurenti M, et al. Infection with *Leishmania (Leishmania) infantum* Changes the Morphology and Myenteric Neurons of the Jejunum of Golden Hamsters. *Parasitol* 2021, Vol 1, Pages 225-237 2021;1:225–37. <https://doi.org/10.3390/PARASITOLOGIA1040024>.
- [21] Panza SB, Vargas R, Balbo SL, Bonfleur ML, Granzotto DCT, Sant’Ana DMG, et al. Perinatal exposure to low doses of glyphosate-based herbicide combined with a high-fat diet in adulthood causes changes in the jejunks of mice. *Life Sci* 2021;275:119350. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119350>.
- [22] Pastre MJ, Casagrande L, Gois MB, Pereira-Severi LS, Miqueloto CA, Garcia JL, et al. *Toxoplasma gondii* causes increased ICAM-1 and serotonin expression in the jejunum of rats 12 h after infection. *Biomed Pharmacother* 2019;114:108797. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2019.108797>.
- [23] Moghadamrad S, McCoy KD, Geuking MB, Sägesser H, Kirundi J, Macpherson AJ, et al. Attenuated portal hypertension in germ-free mice: Function of bacterial flora on the development of mesenteric lymphatic and blood vessels. *Hepatology* 2015;61:1685–95. <https://doi.org/10.1002/HEP.27698/SUPPINFO>.
- [24] Elkerton JS, Xu Y, Pickering JG, Ward AD. Differentiation of arterioles from venules in mouse histology images using machine learning. *J Med Imaging* 2017;4:021104. <https://doi.org/10.1117/1.JMI.4.2.021104>.
- [25] Almeida MC, Cuba-Cuba CA, Moraes MAP, Miles MA. Dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *J Comp Pathol* 1996;115:311–6. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(96\)80088-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(96)80088-0).
- [26] Ribeiro-Romão RP, Moreira OC, Osorio EY, Cysne-Finkelstein L, Gomes-Silva A, Valverde JG, et al. Comparative evaluation of lesion development, tissue damage, and cytokine expression in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by inocula with different *Leishmania (Viannia) braziliensis* concentrations. *Infect Immun* 2014;82:5203–13. <https://doi.org/10.1128/IAI.02083-14>.
- [27] MacColl E, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases as Regulators of Vein Structure and Function: Implications in Chronic Venous Disease. *J Pharmacol Exp Ther*

- 2015;355:410–28. <https://doi.org/10.1124/jpet.115.227330>.
- [28] Teles RMB, Teles RB, Amadeu TP, Moura DF, Mendonça-Lima L, Ferreira H, et al. High matrix metalloproteinase production correlates with immune activation and leukocyte migration in leprosy reactional lesions. *Infect Immun* 2010;78:1012–21. <https://doi.org/10.1128/IAI.00896-09>.
- [29] Aratani Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys* 2018;640:47–52. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2018.01.004>.
- [30] Shen L, Smith JM, Shen Z, Eriksson M, Sentman C, Wira CR. Inhibition of human neutrophil degranulation by transforming growth factor- β 1. *Clin Exp Immunol* 2007;149:155–61. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2249.2007.03376.X>.
- [31] de Oliveira CI, Brodskyn CI. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Front Immunol* 2012;3:145. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00145>.
- [32] Bogdan C. Macrophages as host, effector and immunoregulatory cells in leishmaniasis: Impact of tissue micro-environment and metabolism. *Cytokine X* 2020;2:100041. <https://doi.org/10.1016/j.cytex.2020.100041>.
- [33] Calegari-Silva TC, Vivarini AC, Pereira R de MS, Dias-Teixeira KL, Rath CT, Pacheco ASS, et al. *Leishmania amazonensis* downregulates macrophage iNOS expression via Histone Deacetylase 1 (HDAC1): a novel parasite evasion mechanism. *Eur J Immunol* 2018;48:1188–98. <https://doi.org/10.1002/EJI.201747257>.
- [34] Prud'homme GJ. Pathobiology of transforming growth factor β in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations. *Lab Invest* 2007 8711 2007;87:1077–91. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700669>.
- [35] Iwasaki M, Akiba Y, Kaunitz JD. Recent advances in vasoactive intestinal peptide physiology and pathophysiology: focus on the gastrointestinal system. *F1000Research* 2019;8. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.18039.1>.
- [36] Costa M, Furness JB. The origins, pathways and terminations of neurons with VIP-like immunoreactivity in the guinea-pig small intestine. *Neuroscience* 1983;8:665–76. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(83\)90002-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(83)90002-7).
- [37] Chandrasekharan B, Nezami BG, Srinivasan S. Emerging neuropeptide targets in inflammation: NPY and VIP. *Am J Physiol Liver Physiol* 2013;304:G949–57. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00493.2012>.
- [38] Schneider LCL, do Nascimento JCP, Trevizan AR, Góis MB, Borges SC, Beraldi EJ, et al. *Toxoplasma gondii* promotes changes in VIPergic submucosal neurons, mucosal

- intraepithelial lymphocytes, and goblet cells during acute infection in the ileum of rats. *Neurogastroenterol Motil* 2018;30:e13264. <https://doi.org/10.1111/nmo.13264>.
- [39] Cohen SB, Denkers EY. The gut mucosal immune response to *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol* 2015;37:108–17. <https://doi.org/10.1111/pim.12164>.
- [40] Passos FC, Gois MB, Sousa AD, de Marinho AIL, Corvo L, Soto M, et al. Investigating associations between intestinal alterations and parasite load according to *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. abundance in the gut microbiota of hamsters infected by *Leishmania infantum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2020;115:1–11. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200377>.
- [41] De Giorgio R, Sarnelli G, Corinaldesi R, Stanghellini V. Advances in our understanding of the pathology of chronic intestinal pseudo-obstruction. *Gut* 2004;53:1549–52. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.043968>.
- [42] Buhner S, Schemann M. Mast cell-nerve axis with a focus on the human gut. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2012;1822:85–92. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.06.004>.
- [43] Nezami BG, Srinivasan S. Enteric nervous system in the small intestine: Pathophysiology and clinical implications. *Curr Gastroenterol Rep* 2010;12:358–65. <https://doi.org/10.1007/s11894-010-0129-9>.
- [44] Ricci MF, Béla SR, Moraes MM, Bahia MT, Mazzeti AL, Oliveira ACS, et al. Neuronal Parasitism, Early Myenteric Neurons Depopulation and Continuous Axonal Networking Damage as Underlying Mechanisms of the Experimental Intestinal Chagas' Disease. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;10:583899. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.583899>.
- [45] Christofi FL. Purinergic receptors and gastrointestinal secretomotor function. *Purinergic Signal* 2008;4:213–36. <https://doi.org/10.1007/s11302-008-9104-4>.
- [46] da Silva MV, Marosti AR, Mendes CE, Palombit K, Castelucci P. Submucosal neurons and enteric glial cells expressing the P2X7 receptor in rat experimental colitis. *Acta Histochem* 2017;119:481–94. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2017.05.001>.
- [47] Leceta J, Martinez MC, Delgado M, Garrido E, Gomariz RP. Lymphoid cell subpopulations containing vasoactive intestinal peptide in the rat. *Peptides* 1994;15:791–7. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(94\)90031-0](https://doi.org/10.1016/0196-9781(94)90031-0).
- [48] Martinez C, Delgado M, Abad C, Gomariz RP, Ganea D, Leceta J. Regulation of VIP production and secretion by murine lymphocytes. *J Neuroimmunol* 1999;93:126–38. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(98\)00216-1](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(98)00216-1).

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

A partir de nossos trabalhos, podemos concluir que, no modelo experimental utilizado, a infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* causa diversas alterações no íleo de hamsters. Estas alterações podem ser morfológicas, como na espessura das camadas que compõe o órgão e na quantificação e morfometria de células epiteliais ou presentes na lâmina própria. Ou ainda em parâmetros bioquímicos e em componentes do Sistema Nervoso Entérico.

Essas alterações são muito diversificadas, sendo dependentes de fatores como: a cepa causadora da infecção e do tempo que o animal permaneceu infectado. Portanto, com nossos resultados, nós alcançamos um maior entendimento da infecção por *L. (V.) braziliensis* e de suas consequências sistêmicas.

Contudo, ao mesmo tempo em que descobertas sobre essa relação são feitas, novas hipóteses surgem e abrem caminhos para a continuidade do estudo desta infecção. Os mecanismos propostos podem ser elucidados em novas pesquisas.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Os trabalhos do nosso grupo de pesquisa envolvendo o estudo do intestino durante a infecção por *L. (V.) braziliensis* desvendaram aspectos importantes da relação *Leishmania*-hospedeiro que ainda não haviam sido explorados. Para uma melhor compreensão desta relação, outras análises poderiam ser realizadas, como:

- Realizar a avaliação do trânsito intestinal antes da eutanásia como forma de verificação da funcionalidade do órgão. Assim como a avaliação quantitativa e qualitativa das fezes e consumo de água e ração.

- Para um melhor entendimento da reação inflamatória seria muito interessante a análise de outras citocinas como Interferon- γ , IL-4, IL-13, entre outras. Além disso, a marcação das células imunes com marcadores específicos auxiliaria na diferenciação celular nos infiltrados inflamatórios.

- Realização de um escore inflamatório e avaliação dos mastócitos encontrados na camada muscular e próximos aos vasos sanguíneos. Pois, apesar de não haver alterações na população total de mastócitos na mucosa intestinal, aqueles encontrados na muscular e nos vasos podem estar contribuindo para a inflamação do órgão.

- Avaliação de morte e renovação epitelial devido ao encontro de alterações histológicas sugestivas de aumento na proliferação celular.
- Avaliação das células e neurônios imunomarcados pelo peptídeo intestinal vasoativo e por outros neurotransmissores, como óxido nítrico e acetilcolina.
- Realizar a avaliação da rede perineural que ainda é pouco explorada no Sistema Nervoso Entérico, mas que no Sistema Nervoso Central é responsável por manter o equilíbrio excitatório/inibitório.