



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Instituto de Biociências  
Campus do Litoral Paulista



INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Leishmania (Leishmania)*  
*infantum* EM HAMSTERS: ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS  
NO CÓLON

**Thaís Martins Chucri**

São Vicente -SP

2022



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Instituto de Biociências  
Campus do Litoral Paulista



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“Júlio de Mesquita Filho”  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS  
CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Leishmania (Leishmania)*  
*infantum* EM HAMSTERS: ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS  
NO CÓLON

**Candidata: Thaís Martins Chucri**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Renata de Britto Mari.**

**Co-orientador: Prof.<sup>o</sup> Dr. Luiz Felipe Domingues Passero.**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,  
Câmpus do Litoral Paulista, UNESP, para  
obtenção do título de Doutor no Programa de  
Pós-Graduação em Biodiversidade de Ambientes  
Costeiros.

São Vicente -SP

2022

C559i

Chucrí, Thaís Martins

Infecção experimental por *Leishmania* (*Leishmania*) infantum em hamsters : alterações morfofuncionais no cólon / Thaís Martins

Chucrí. -- São Vicente, 2022

49 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente

Orientador: Renata de Britto Mari

Coorientador: Luiz Felipe Domingues Passero

1. Leishmaniose Visceral. 2. Sistema Nervoso Entérico. 3. Intestino Grosso. 4. Histopatologia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## **Agradecimentos**

À minha orientadora Renata de Britto Mari, agradeço pelo acolhimento, pela excelente condução do trabalho, pela paciência e pela confiança depositada.

Ao meu co-orientador Luiz Felipe Domingues Passero, pelas orientações e ajuda no transcorrer do trabalho.

Aos colegas do laboratório LABMA, em especial à Gabriela P. Marinsek, Ítalo N, Cavallone, Sarah K. Santos de Lima, Karine S. Oliveira, Alexandre R. Gonçalves e Nathalia Sales, vocês me ajudaram demais.

À minha família pela compreensão nas horas de ausência.

Aos meus pais, Antônio Jorge e Vera Lúcia pelo amor e incentivo. Vocês são meu alicerce.

À minha irmã Christiane e à amiga Thaís Trombin pelo companheirismo e por me engajarem sempre.

Ao programa de Pós-graduação em Biodiversidades dos Ambientes Costeiros e a todos colegas, técnicos e funcionários do Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista, pela oportunidade e execução da tese.

À professora Márcia Dalastra Laurenti e ao Laboratório de Patologia de Moléstias infecciosas (LIM 50) pela colaboração na execução de parte do trabalho.

Aos queridos coordenadores Luiz Roberto Biondi e Juliana Plácido Guimarães pelo apoio dispensado. Através deles agradeço as duas Instituições que leciono, UNIMES e Centro Universitário São Judas Tadeu – Campus Unimonte.

Aos meus alunos, fonte de motivação para continuar melhorando sempre.

Finalmente, eu agradeço à Deus por colocar no meu caminho seres tão especiais que me permitiram chegar até aqui, dar-me resiliência, manter a esperança para concluir meu doutorado.

*Dedico este trabalho ao meu filho Arthur,  
você é a conquista mais importante da minha vida.*

O presente trabalho será apresentado em forma de artigo a ser submetido à revista ***Gastroenterology Research***, cujas normas estão em anexo.

**Infecção Experimental por *Leishmania (Leishmania) infantum* em Hamsters:  
Alterações Morfofuncionais do Cólon.**

Thaís Martins Chucrí<sup>1</sup>; Sarah Kymberly Santos Lima<sup>1</sup>; Ítalo Novaes Cavallone<sup>1</sup>;  
Karine Soares de Oliveira<sup>1</sup>; Jéssica Adriana de Jesus<sup>2</sup>; Márcia Dalastra Laurenti<sup>2</sup>;  
Luiz Felipe Domingues Passero<sup>1</sup>; Renata de Brito Mari<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Morfofisiologia Animal, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências – Campus do Litoral Paulista (UNESP – IB/CLP), Praça Infante Dom Henrique, s/n – Parque Bitaru, São Vicente, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Moléstias Infecciosas (LIM 50), Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), Av. Doutor Arnaldo, 455 – Cerqueira César, São Paulo, São Paulo, Brasil.

**Correspondência**

Nome: Thaís Martins Chucrí

Endereço: Delfim Moreira 20

Email: [thais.chucri@saojudas.br](mailto:thais.chucri@saojudas.br)

[Telefone: +55 \(13\)981251070](tel:+5513981251070)

[Fax:](#)

## **Resumo**

### **Background e Objetivo:**

A degradação ambiental e as mudanças climáticas são alguns dos fatores que contribuem para uma maior ocorrência de doenças. Dentre elas, a leishmaniose visceral (LV), uma importante zoonose com letalidade de aproximadamente 95%. É uma infecção sistêmica crônica e quando o parasito atinge o trato gastrointestinal pode provocar alterações morfofisiológicas significativas. No entanto, pouco se sabe sobre o impacto causado por *Leishmania* no sistema nervoso entérico (SNE). Os neurônios desse plexo desempenham importante papel em manter o peristaltismo e auxiliar na resposta imune do órgão. Diante do exposto e dada a importância do SNE para manter a homeostase do organismo, o objetivo desse estudo foi investigar o comprometimento morfofisiológico das subpopulações de neurônios NADH-dp e NADPH-dp e histopatológico do intestino grosso de *hamsters* infectados experimentalmente.

### **Métodos:**

Os animais foram infectados com formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* e aos 30, 60 e 90 dias pós infecção foram conduzidos para a eutanásia. Posteriormente as regiões do cólon ascendente e descendente foram coletadas e destinadas para a análise de unidades *Leishman-Donovan*, técnicas de evidenciação e morfometria neuronal, além das análises histopatológicas através de cortes histológicos por hematoxilina-eosina (HE), ácido periódico de Schiff (PAS+) e Alcian Blue (AB+) pH 2,5.

### **Resultados:**

Foram observadas a presença de amastigotas no intestino dos animais, bem como alterações na densidade e morfometria de ambas as subpopulações neuronais,

causando alterações na plasticidade neuronal. Na análise histopatológica, foram evidenciadas alterações na estratigrafia e nas células da mucosa, no entanto, nenhum sinal clínico da doença foi registrado.

### **Conclusões:**

A infecção por *Leishmania (L.) infantum* causa alterações morfofisiológicas no intestino grosso de *hamsters* infectados, além de alterações no plexo mioentérico que podem ocorrer de forma direta, por ação do patógeno ou indiretamente por mecanismos imunes envolvidos na defesa contra o parasito.

**Palavras-chave:** Leishmaniose visceral; Sistema Nervoso Entérico; Intestino Grosso; Histopatologia.

## **INTRODUÇÃO**

A Leishmaniose é uma doença parasitária de carácter zoonótico causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, na qual os cães são considerados como o principal reservatório do ciclo doméstico [1]. É considerada uma das doenças causadas por protozoários mais preocupantes do mundo [2], sendo um grave problema de saúde pública, onde as condições precárias de higiene, a falta de saneamento básico e a degradação ambiental, são fatores que contribuem com a sua crescente transmissão e propagação [3;4;5].

A forma visceral da leishmaniose, possui como agente etiológico a *Leishmania (Leishmania) infantum*, sendo considerada uma das mais graves, especialmente para pacientes com comorbidades imunossupressoras, como por exemplo, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) [6;7]. No mundo, estima-se que ocorram mais de 50.000 novos casos por ano e, o Brasil, está entre os 10 países que mais notifica, sendo o responsável por 97% dos casos que

ocorrem nas Américas. Quando não tratada, a doença pode ser fatal em 95% dos casos [2;8].

As principais manifestações clínicas e histopatológicas na leishmaniose visceral (LV) ocorrem principalmente no fígado, baço, linfonodo e medula óssea [9;10;11]. No entanto, pode afetar também outros órgãos, como o sistema nervoso, genito-urinário e o trato gastrointestinal, sendo este último o mais comprometido [12;13;14]. Alterações histológicas no intestino de animais e humanos com LV são amplamente discutidas [15;16;17;18;19;20]. A carga parasitária presente no órgão em questão pode levar a presença de infiltrados inflamatórios, hiperplasia celular, alterações na camada mucosa e submucosa, lesão no epitélio, perda de criptas ou fibrose na lâmina própria [21].

O trato gastrointestinal (TGI) é composto por diversos órgãos, que compreende o estômago, intestino delgado e o intestino grosso. Estes possuem características distintas permitindo que o corpo mantenha seu metabolismo. A região do intestino grosso, mais especificamente o cólon, é responsável pela absorção de água e eletrólitos, formação e transporte de fezes e, digestão química realizada pela microbiota intestinal [22]. Quando associado ao sistema linfático, o TGI constitui o maior e mais complexo órgão, onde estão presentes aproximadamente 50% dos linfócitos de todo o corpo [23]. A barreira gastrointestinal, possui diversos mecanismos de defesa, sendo eles, a presença de bactérias comensais, a morfologia das túnicas intestinais, a camada de muco, o sistema imunológico da mucosa e o sistema nervoso entérico (SNE) [24;25;26].

O sistema imune do intestino, possui a maior concentração de células do corpo, especialmente de macrófagos, que possuem um papel importante na resposta imune inata e na homeostase do órgão [27]. Dado o constante contato com

diversos microrganismos comensais, patogênicos ou mesmo moléculas derivadas da ingestão de alimentos, o intestino possui uma intrincada interação antigênica. Assim sendo, as respostas imunológicas no órgão devem ser reguladas para que por um lado não sejam exacerbadas e prejudiciais ao organismo frente aos antígenos, e por outro, efetivas contra patógenos quando houver necessidade.

Além disso, no intestino encontra-se o GALT (tecido linfoide associado ao intestino), que contribui com a proteção do organismo gerando respostas imunológicas contra patógenos e, no intestino grosso é representado por folículos isolados [28;29]. Componente importante para a defesa do organismo é a barreira física epitelial do intestino. Dentre as células que compõem essa barreira, estão as células produtoras de muco, como as caliciformes que são produtoras de mucinas que formam uma camada protetora no epitélio intestinal e, os linfócitos intraepiteliais (IELs) que possuem a função proteger a barreira mucosa, participar de respostas inflamatórias e contribuir no reparo de lesões, além, de regular e manter a homeostase intestinal [30;31].

Ao longo de todo o TGI, encontra-se o SNE. Um sistema composto por uma rede de milhares de neurônios entéricos, dispostos em pequenos gânglios que são ligados por fibras nervosas e, embora receba uma ampla contribuição do sistema nervoso central através da inervação simpática e parassimpática, o SNE atua de forma independente [26; 32]. Esse sistema consiste em dois plexos ganglionares principais, o plexo submucoso e o plexo mioentérico, sendo esse último localizado entre a túnica muscular longitudinal externa e a circular interna. Os neurônios do SNE são responsáveis por controlar a motilidade, o transporte de fluidos na mucosa e o fluxo sanguíneo local [26;33].

O SNE está suscetível a sofrer diversas alterações ao longo do tempo, podendo ocasionar distúrbios na motilidade e homeostase do intestino [34]. Além disso, alguns estudos já relataram que infecções ocasionadas por protozoários, como o da espécie *Toxoplasma gondii*, podem acarretar diversas alterações na plasticidade dos neurônios do plexo mioentérico, como mudanças na densidade e morfometria neuronal [35;36;37]. Já com protozoários da espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis*, foi relatada a hipertrofia dos neurônios mioentéricos imunorreativos HuC / HuD no íleo de hamsters, justificada pelo aumento da atividade metabólica dos mesmos, como um mecanismo de adaptação do órgão diante da infecção parasitária [38]. No entanto, pouco se sabe das alterações no sistema nervoso entérico relacionado ao protozoário da LV.

A interação do SNE com o sistema imune, forma uma grande defesa do intestino, atuando em conjunto quando ocorrem infecções, para regular a homeostase e a fisiologia intestinal [39;40]. A interação entre esses sistemas é bidirecional, onde as células do sistema imune são afetadas pelos neurotransmissores, e os neurônios, são afetados pelas citocinas que são liberadas pelas células imunológicas [41;42]. Outra particularidade dos neurônios entéricos é a plasticidade fenotípica, que pode ser alterada em resposta aos patógenos e serve como um mecanismo de resposta adaptativa ao dano produzido no organismo [26]. Ou seja, de acordo com diferentes estímulos pode ocorrer a mudança do seu código químico e liberação de outro neurotransmissor [30]. Fato este de grande relevância para compreensão das doenças intestinais, podendo ser definitivo para determinação de manifestações clínicas e para o desenvolvimento de processos inflamatórios intestinais [39].

Portanto, considerando o que foi supracitado, mediante a complexidade e importância do SNE para o controle e funcionamento de todo TGI e a importância imunológica e fisiológica do cólon, faz-se necessário estudar as alterações neurológicas que ocorrem em neurônios mioentéricos do cólon ascendente e descendente de *hamsters* infectados experimentalmente por *L. (L.) infantum* durante os períodos de 30, 60 e 90 dias pós infecção.

## METODOLOGIA

Foram utilizados 30 hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*), por serem modelos animais que mimetizam as infecções naturais que ocorrem em humanos, cães, gatos e raposas [43]. Os animais utilizados tinham oito semanas de vida e 300 gramas de peso corporal e, durante o experimento foram tratados com ração peletizada industrial, água filtrada “*ad libitum*” e com ciclo de luz de 12h.

Foram montados seis grupos, com cinco animais cada. Três grupos foram considerados controles (GC) e os outros três grupos experimentais (GE). Os animais GE foram infectados com  $2 \times 10^7$  promastigotas de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/72/46) por via intraperitoneal. Já os animais GC foram inoculados pela mesma via apenas com solução fisiológica (100µL/animal). Aos 30, 60 e 90 dias pós infecção (DPI), os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub>.

Todo o procedimento experimental foi aprovado pelo CEUA nº 05/2017. Os parasitos utilizados nos experimentos estavam em fase estacionária de crescimento, além disso, a cepa utilizada no estudo foi cedida pelo Prof. Dr. Fernando Tobias Silveira, do Laboratório de Leishmaniose Prof. Dr. Ralph Laison, Departamento de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas (Pará Estado, Brasil).

Em cada período experimental o baço, o fígado e o cólon ascendente e descendente foram coletados e destinados para as posteriores análises.

### **Análise de carga parasitária**

Baço, fígado e cólon (ascendente e descendente) foram coletados, pesados e aposicionados contra lâminas, as quais foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa.

Posteriormente, as lâminas foram analisadas sob microscópio óptico para contabilizar as formas amastigotas de *L. (L.) infatum*. A análise foi realizada a partir do método de LDU (*Leishman-Donovan units*) [44]. Os resultados foram expressos pela razão do número de amastigotas encontradas em ao menos 1000 células nucleadas e normalizadas de acordo com o peso do respectivo órgão.

$$\text{LDU} = \frac{\text{número de amastigotas} \times 1000 \text{ células nucleadas}}{\text{peso do órgão}}$$

### **Evidenciação Neuronal**

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

Os segmentos intestinais do cólon ascendente e descendente foram lavados e preenchidos com solução de Krebs (pH 7,3). Posteriormente os segmentos passaram por duas lavagens de dez minutos cada em solução de Krebs, e foram incubados em solução de Krebs contendo Triton X-100 a 0,3% durante cinco minutos. Mais duas lavagens de dez minutos em cada solução de Krebs foram realizadas, para posterior incubação em meio de reação para evidenciar os neurônios mioentéricos NADH-dp constituído por 25mL de solução estoque de Nitro Blue Tetrazolium (NBT, solução estoque com concentração de 0,5 mg/mL), 25 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M; pH 7,3), 0,05 g de  $\beta$ -NADH em 50mL de água destilada. O tempo de incubação foi padronizado em 1 hora. Ao final, os segmentos

foram fixados em solução de formolaldeído a 10% em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,3).

*Deteção dos neurônios mioentéricos nitrégicos (NADPH-diaforase positivos) (SCHERER-SINGLER et al., 1983).*

Os segmentos intestinais do cólon ascendente e descendente foram lavados e preenchidos com PBS (pH 7,4). A seguir, os segmentos foram submetidos a duas lavagens em solução de PBS (10 minutos cada) seguidas de permeabilização em PBS contendo Triton X-100 a 0,3% diluídos em tampão fosfato de sódio (pH 7,3) por 10 minutos. Posteriormente, mais duas lavagens em PBS durante 10 minutos cada foram realizadas. Para evidenciar os neurônios mioentéricos NADPH-dr positivos (NADPH-dp), após as lavagens, os segmentos foram incubados em meio de reação constituído por 50 mg de NBT, 100 mg de  $\beta$ -NADPH e 0,3% de Triton X-100 em tampão Tris-HCl (0,1M pH 7,6) por 2 horas. Posteriormente as extremidades foram liberadas e os intestinos imersos em solução de paraformaldeído a 4% para a fixação e armazenagem.

### **Obtenção dos preparados de membrana**

Após período de fixação, cada intestino foi seccionado ao longo do eixo longitudinal na margem mesentérica e microdissecado sob estereomicroscópio, para retirada das túnicas mucosa e submucosa e preservação das túnicas muscular e serosa. Os preparados de membrana obtidos foram montados entre lâmina e lamínula de vidro com resina sintética Permount®.

### **Densidade Neuronal**

Por meio dos preparados de membrana obtidos foi possível observar os perfis ganglionares. A densidade neuronal foi avaliada em 60 gânglios [19] com o auxílio

de microscópio de luz (aumento de 100X) sendo as imagens capturadas pela câmera digital Motic Image® e transferidas para o computador. Todos os neurônios presentes no perfil ganglionar fotografado foram quantificados. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

#### **Área do perfil do corpo celular dos neurônios mioentéricos ( $\mu\text{m}^2$ )**

A mensuração da área do perfil do corpo celular dos neurônios mioentéricos, foi realizada com o auxílio do programa de análise de imagem computadorizado Image-Pro-Plus 3.0.1. Para tanto, as imagens dos neurônios capturadas para a análise de densidade neuronal foram utilizadas para a análise morfométrica. Foram mensurados o perfil celular (PC) dos 100 primeiros neurônios observados por animal. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

#### **Análise histopatológica e morfométrica do intestino grosso**

Fragmentos com aproximadamente três centímetros do cólon ascendente (porção proximal) e descendente (porção proximal) dos animais foram coletados e fixados em formol a 10%. Após a fixação por 48 horas, os segmentos foram lavados em álcool etílico a 70%, desidratados em série crescente de álcoois até o absoluto e diafanizados em xilol. Posteriormente, passaram para etapa de inclusão em parafina.

Os materiais foram submetidos a três cortes transversais semi-seriados com 5 $\mu\text{m}$ , com espaçamento de 300 $\mu\text{m}$  entre cada corte, no qual cada corte foi dividido em quatro campos amostrais, totalizando 12 quadrantes por animal (Figura 1).

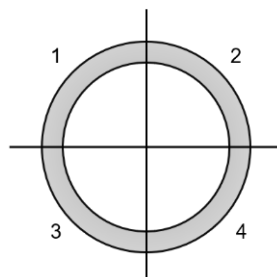


**Figura 1.** Esquema da divisão em quadrantes para amostragem dos campos microscópicos do intestino de *Mesocricetus auratus*

Os cortes foram corados com a técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) para avaliação geral da morfologia do cólon e para análises de morfometria das pregas intestinais, espessura da túnica muscular e parede total, todas as medidas em micrômetro ( $\mu\text{m}$ ). Para contagem de linfócitos intra-epiteliais (IELs) e das células mucosecretoras (PAS+), os cortes foram corados pela técnica Periodic Acid-Schiff (PAS) e para contagem de células mucosecretoras (AB+), os cortes foram corados por Alcian Blue (AB) pH 2,5 e contra corados com Hematoxilina. Foram analisadas a densidade de células caliciformes e IELs, relacionando à quantidade de enterócitos em campos escolhidos aleatoriamente. Todos os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

### **Análise estatística**

Os dados obtidos pelas análises de densidade e morfometria neuronal foram inicialmente submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para a verificação da normalidade e teste de Levene para avaliar a homoscedasticidade. Foram testadas diferenças estatísticas entre os grupos controle e experimental para cada período de exposição (30, 60 e 90 dias). Para tanto, utilizou-se o teste *t-student*, seguido pelo teste de Tukey, quando seguidas as premissas para o uso de testes paramétricos. Quando violadas essas premissas, o teste de Mann-Whitney foi empregado seguido pelo pós-teste de Dunn's.

Os resultados obtidos foram analisados no GraphPad Prism 9.0 e o nível de significância adotado para os resultados obtidos foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

A análise LDU, indicou aumento da carga parasitária durante todos os períodos experimentais, progressivamente, em todos os órgãos analisados (Supl. 1). No cólon ascendente e descendente, formas amastigotas foram detectadas em todos os períodos analisados, entretanto, apenas no cólon ascendente observou-se aumento progressivo do parasitismo de maneira significativa ( $p < 0,05$ ) (Figura 2).

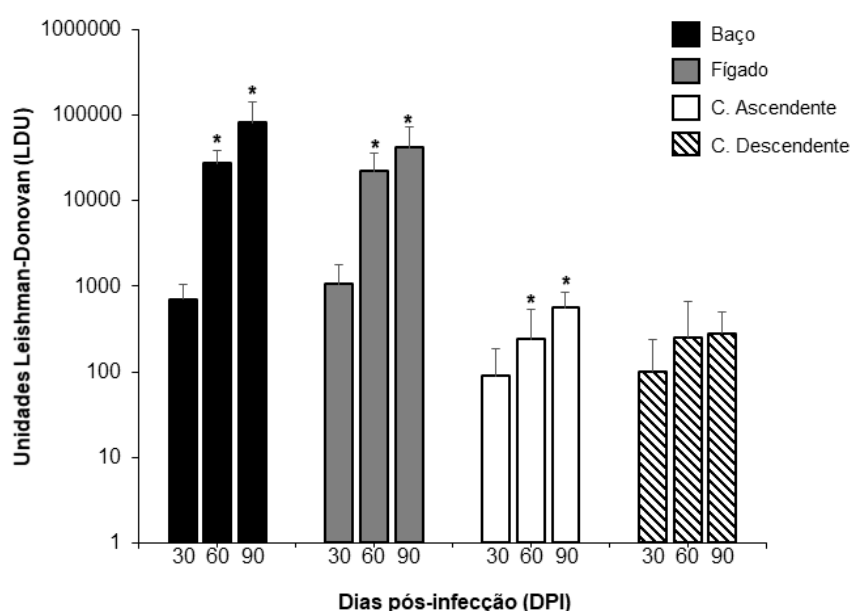


**Figura 2.** Unidades de Leishman-Donovan (LDU) expressas em média, do baço, fígado, cólon ascendente e descendente dos hamsters em 30, 60 e 90 dias pós-infecção (DPI) por *L. (L.) infantum*.

Os resultados referentes a densidade dos neurônios NADH-dp e NADPH-dp, encontram-se suplementados em anexo (Supl. 2). No cólon ascendente (Figura 3a), a densidade dos neurônios NADH-dp, reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) durante todos os períodos estudados. Já no cólon descendente (Figura 3b), apenas no período de 60 DPI houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de 23%.

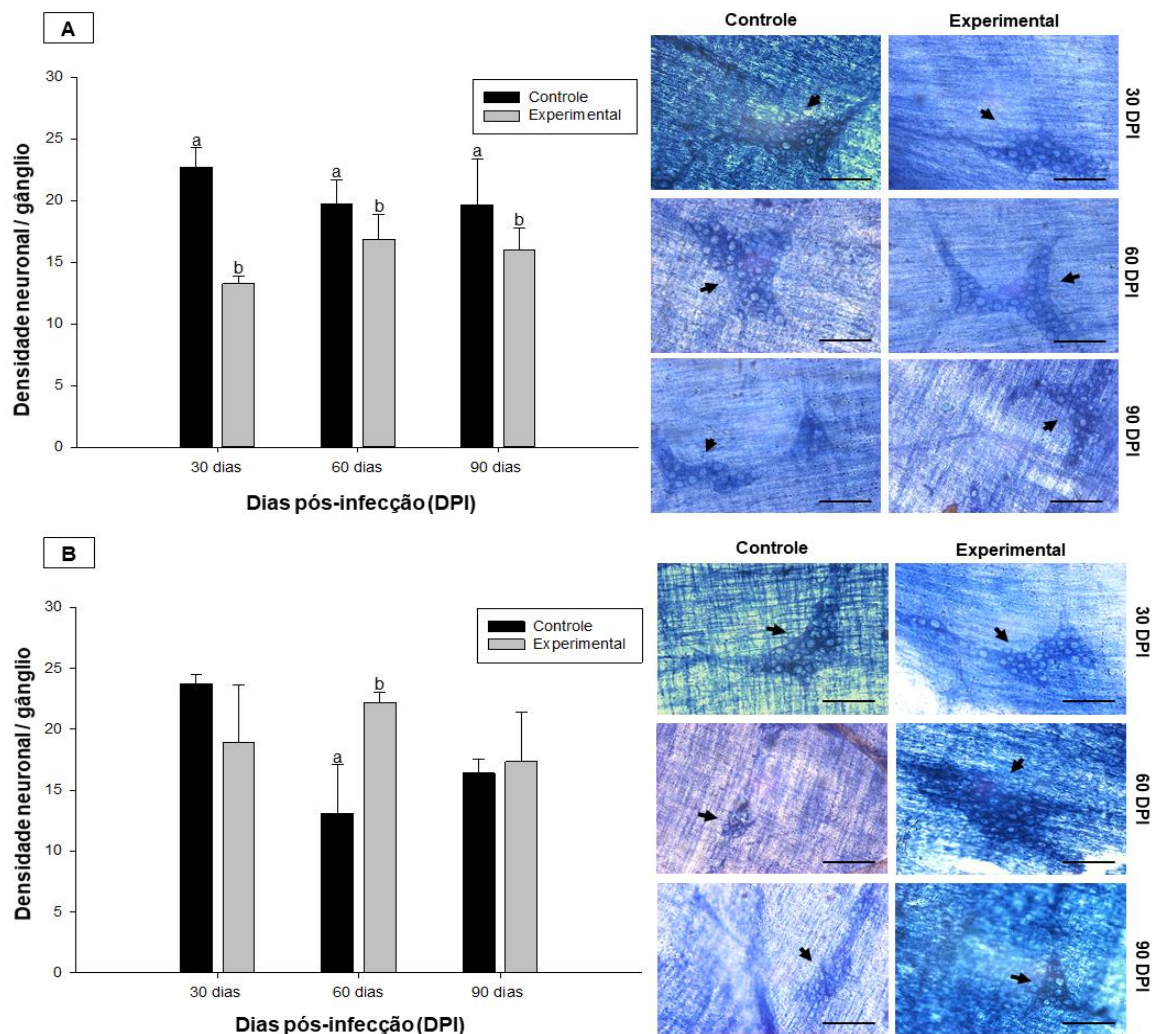


**Figura 3** - Densidade dos neurônios metabolicamente ativos (NADH-dp), cólon ascendente (A) e descendente (B) do plexo mioentérico dos hamsters após 30, 60 e 90 dias de infecção (DPI) por *L. (L.) infantum*. Fotomicrografias (barra=100 $\mu$ m) evidenciando os gânglios com setas pretas. \*Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) com seus respectivos grupos controles.

A análise de densidade dos neurônios NADPH-dp, no cólon ascendente (Figura 4a), apenas no período de 60 DPI foi observado aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de 69% quando comparado com seu respectivo controle. No entanto, no cólon descendente (Figura 4b), no período de 90 DPI a redução na densidade foi de 26%. Assim como ocorreu com a outra subpopulação neuronal, a análise do perfil

quantitativo dos neurônios NADPH-dp também apresentou alterações na plasticidade em ambos os segmentos intestinais quando comparados com seus respectivos controles.

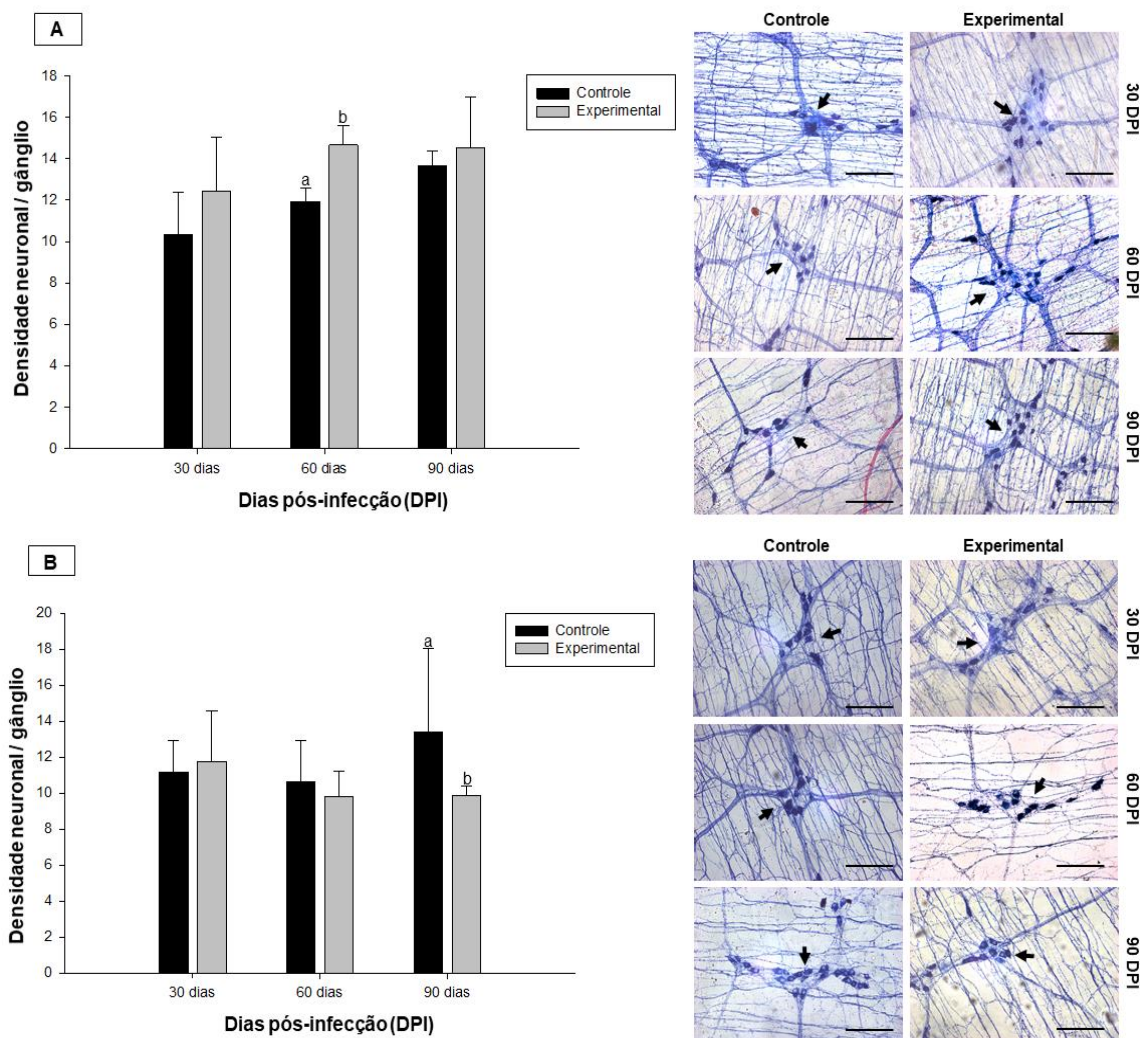


**Figura 4** - Densidade dos neurônios nitrérgicos (NADPH-dp), cólon ascendente (A) e descendente (B) do plexo mioentérico dos hamsters após 30, 60 e 90 dias de infecção (DPI) por *L. (L.) infantum*. Fotomicrografias (barra=100 μm) evidenciando os gânglios com setas pretas. \*Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) com seus respectivos grupos controles.

Os resultados da morfometria do perfil celular dos neurônios NADH-dp e NADPH-dp encontram-se suplementados em anexo (Supl. 3). A análise do perfil celular dos neurônios da subpopulação NADH-dp do cólon ascendente (Imagem 5a),

apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em sua morfometria nos períodos 30 DPI e 90 DPI, com redução de 9% e aumento de 20%, respectivamente. No cólon descendente (Imagem 5b), apenas no período de 60 DPI houve redução de 52% quando comparado com seu respectivo controle.

Na análise dos neurônios NADPH-dp, no cólon ascendente (Imagem 5c), houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) nos períodos de 30 DPI e 90 DPI, de 20% em ambos os períodos. No cólon descendente (Imagem 5d) apenas no período de 90 DPI houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de 26%.

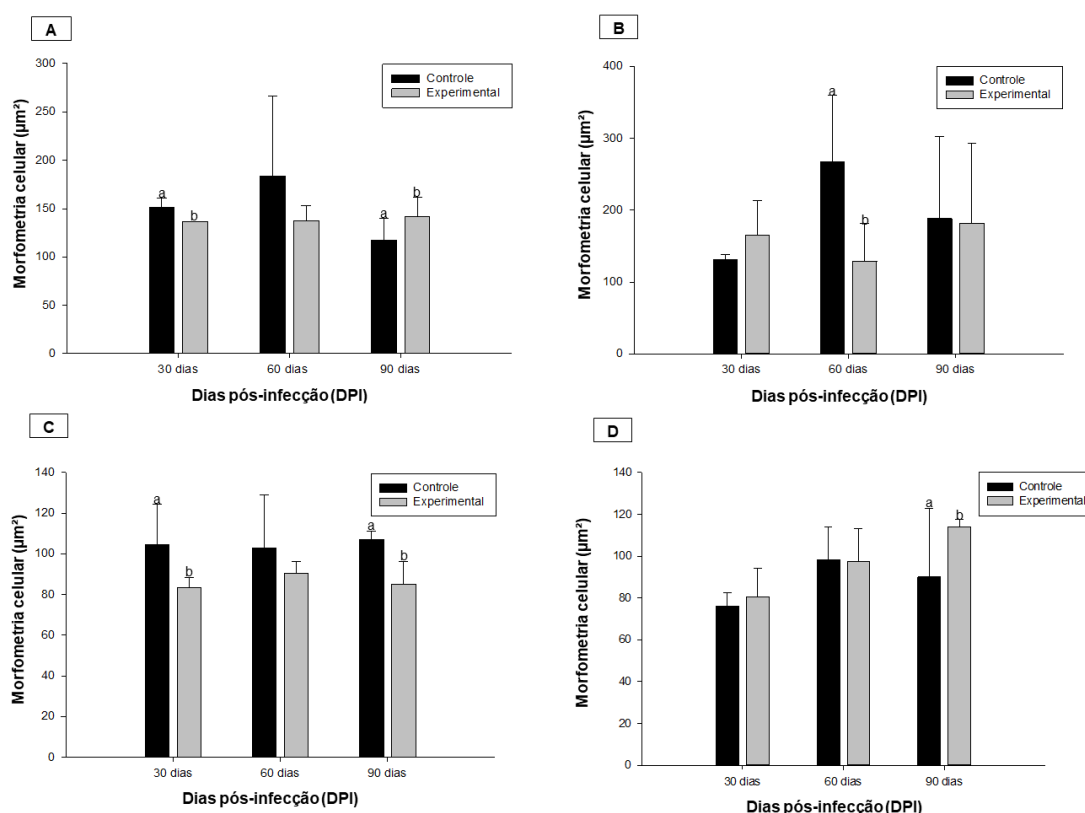


**Figura 5** – Morfometria (μm²) do perfil celular expressa em média ± desvio padrão dos neurônios metabolicamente ativos (NADH-dp), cólon ascendente (A) e descendente (B) e, dos neurônios nitrérgicos (NADPH-dp), cólon ascendente (C) e descendente (D), do plexo mioentérico dos hamsters com 30, 60 e 90 dias pós-infecção (DPI) por *L. (L.) infantum*. \*Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) com seus respectivos grupos controles.

Os resultados morfoquantitativos mostram alterações nos neurônios do plexo mioentérico em ambos os segmentos intestinais. Embora as alterações tenham ocorrido de maneiras diferentes em cada parte do cólon, é possível verificar que a infecção parasitária afetou significativamente ( $p < 0,05$ ) a plasticidade dos neurônios NADH-dp e NADPH-dp durante todos os períodos experimentais estudados.

Em uma análise macroscópica do intestino, não foi observada nenhuma ulceração em ambos os segmentos. Os resultados da estratigrafia intestinal encontram-se em anexo (Supl. 4).

A estratigrafia intestinal do cólon ascendente (Figura 6a), indicou hipertrofia ( $p < 0,05$ ) na espessura das pregas da mucosa nos períodos de 30 DPI e 60 DPI, de 43% e 29%, respectivamente. A túnica muscular apresentou hipertrofia de 41% e 18% nos períodos de 30 DPI e 60 DPI, no entanto, no período de 90 DPI, houve atrofia da túnica de 4%. A parede total do órgão apresentou hipertrofia de 40% e 22% nos períodos de 30 DPI e 60 DPI, respectivamente, seguido de atrofia em 90 DPI de 4%, sendo essas alterações significativas ( $p < 0,05$ ) em todos os períodos estudados.

No cólon descendente (Figura 6b), sua estratigrafia apresentou atrofia das pregas da mucosa de 22% em 60 DPI. No mesmo período, também foi observada a redução da parede total do órgão em 17%.

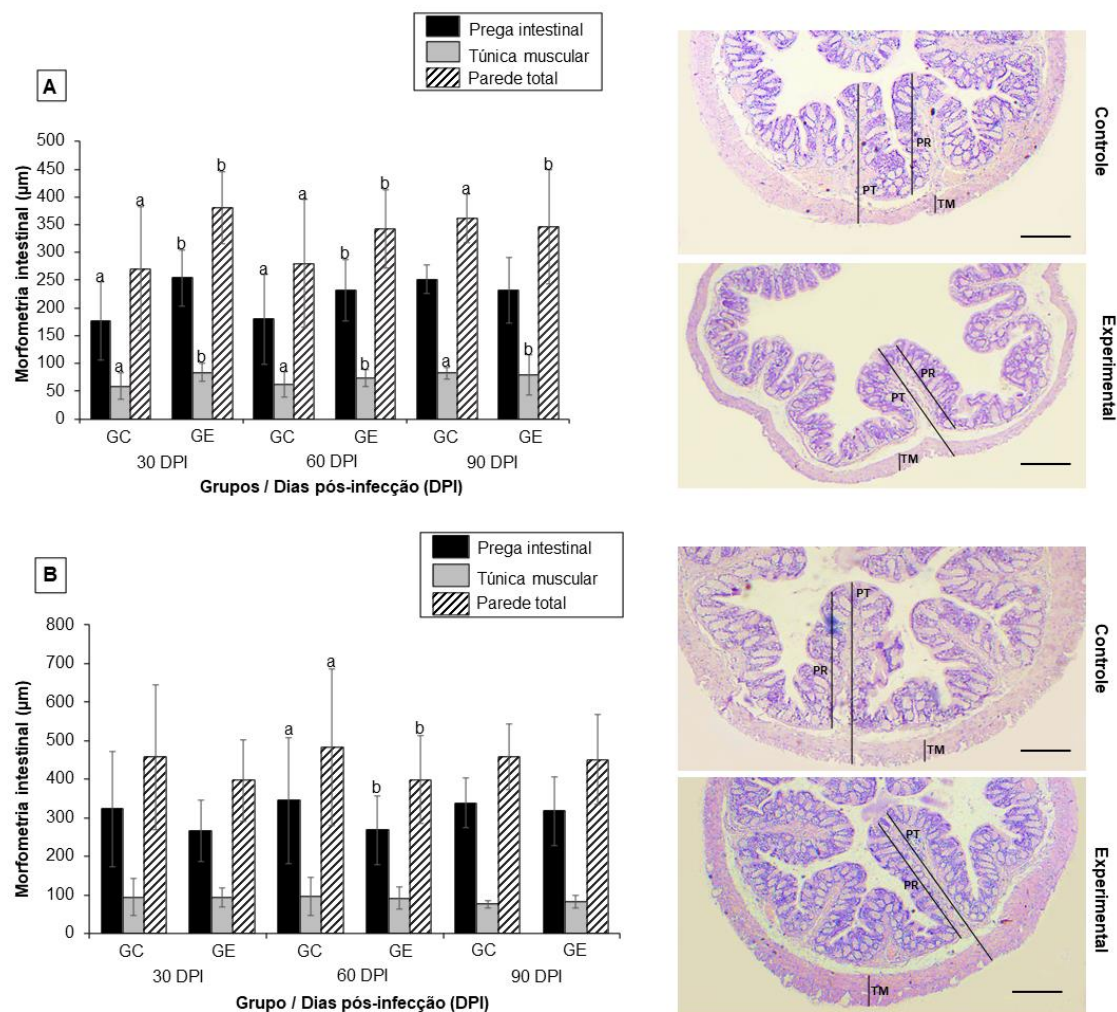


**Figura 6.** Estratigrafia intestinal (μm) das mensurações de altura da prega da mucosa, espessura da túnica muscular e parede total expressas em média  $\pm$  desvio padrão do cólon ascendente (A) e descendente (B) nos grupos controle (GC) e experimental (GE), durante os períodos de 30, 60 e 90 DPI. Fotomicrografia do cólon ascendente (A) e descendente (B) em 100 μm, apresentando as pregas da mucosa (PR), a túnica muscular (TM) e a parede total do intestino (PT). \*Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) com seus respectivos grupos controles.

Os resultados da análise das células do cólon ascendente e descendente, encontram-se suplementados em anexo (Supl. 5).

No cólon ascendente (Figura 7a), a densidade de células caliciformes PAS+ reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) nos períodos de 30 DPI e 90 DPI, em 15% e 13% respectivamente. Já, as células caliciformes AB+, apresentou redução

significativa ( $p < 0,05$ ) nos períodos de 60 DPI e 90 DPI, de 14% e 30%. No cólon descendente (Figura 7b), as células caliciformes PAS+ apresentaram redução na densidade nos períodos de 30 DPI e 60 DPI, de 52% e 25% respectivamente e, no período de 90 DPI, aumento na densidade em 64%, sendo significativo ( $p < 0,05$ ) em todos os períodos. As caliciformes AB+ desse segmento intestinal, no período de 30 DPI houve redução de 38% e aumento de 96% no período de 90 DPI.

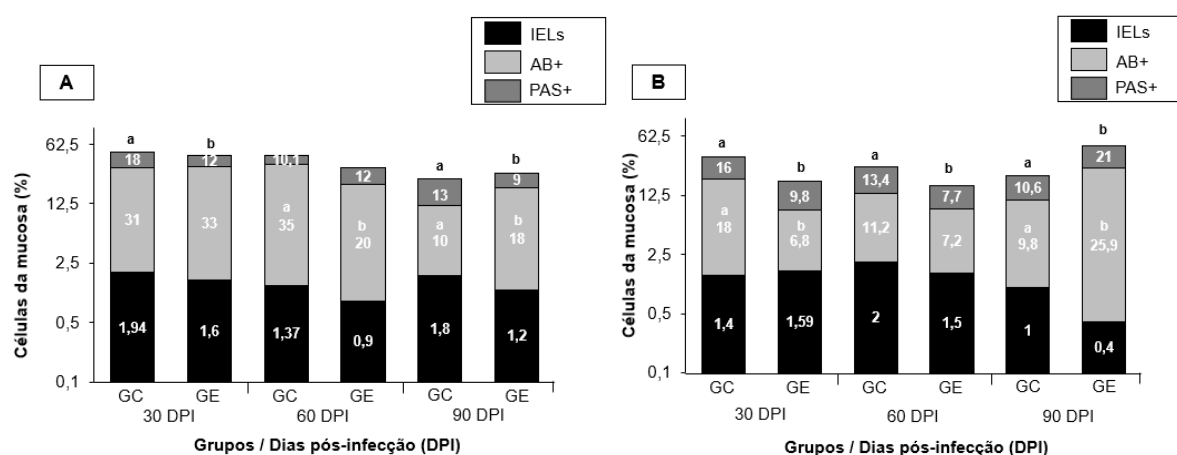


**Figura 7.** Porcentagem da razão entre a densidade de células caliciformes Alcian Blue (AB), Ácido Periódico de Schiff (PAS), linfócitos intraepiteliais (IELs) por densidade de enterócitos da mucosa do cólon ascendente (A) e descendente (B) nos grupos controle (GC) e experimental (GE), durante os períodos experimentais de 30, 60 e 90 DPI. \*Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) com seus respectivos grupos controles.

As análises da parede intestinal mostraram que ambos os segmentos intestinais estudados sofreram diversas alterações na estratigrafia do intestino assim, como, na densidade de células da mucosa ao longo da infecção parasitária. Entretanto, apenas no cólon ascendente observou-se alterações significativas ( $p < 0,05$ ) em toda a parede intestinal durante todos os períodos estudados.

## DISCUSSÃO

Os presentes resultados demonstram as alterações morfofisiológicas no cólon ascendente e descendente em hamsters, decorrente da infecção causada por *L. (L.) infantum* durante os três períodos experimentais. Tais alterações são provenientes da presença das formas amastigotas encontradas no cólon desses animais. Assim como no intestino grosso, observou-se também um crescente parasitismo no fígado e baço com a evolução da doença. A presença das formas amastigotas no intestino foi relatada em infecções naturais [16;20;45;46] e experimentais [18;19;38;47].

A doença possui como principais sinais clínicos febre prolongada, aumento do baço e fígado e perda de peso [48]. Em nosso estudo, as manifestações clínicas listadas acima não foram avaliadas, entretanto, as alterações histológicas clássicas da doença, como a hipertrofia e hiperplasia de macrófagos infectados em baço e fígado, diminuição de áreas de polpa branca em baço e a presença de nódulos macrofágicos em fígado denotam comprometimento sistêmico da doença. Adicionalmente, observou-se expansão de parasitos a órgão não clássico, como o intestino, demonstrando que a resposta imunológica dos animais não foi suficiente para conter os parasitos. Corroborando com nossos achados, em estudo semelhante realizado no jejuno de hamsters [19], foram observadas alterações semelhantes no intestino, oriundas do parasitismo no órgão.

O parasitismo no intestino desencadeou alterações nas populações dos neurônios mioentéricos NADH-dp e NADPH-dp. No cólon ascendente a densidade dos neurônios metabolicamente ativos reduziu durante todo o período de infecção parasitária e apresentou atrofia no período de 30 DPI, sugerindo que a infecção afeta negativamente o funcionamento desses neurônios, resultando em baixa atividade metabólica, assim como também foi observado no jejuno de ratos

infectados com *Toxoplasma gondii* [49;50]. Já, no período de 90 DPI, a hipertrofia desses neurônios indica uma adaptação para atender todas as demandas do organismo frente à progressão do parasito [51;52;53].

O aumento na densidade juntamente com a atrofia dos neurônios NADH-dp observado no período de 60 DPI no cólon descendente, sugere adaptação do organismo frente à infecção parasitária. Infecções causadas por *Leishmania (L) infantum* mostraram resultados similares com os neurônios metabolicamente ativos do plexo mioentérico no jejuno de hamsters [21].

No cólon ascendente, o aumento na densidade de citocinas inflamatórias liberadas pelo sistema imunológico, com o objetivo de combater o parasito, leva ao aumento da densidade de neurônios nitrérgicos, acarretando na hipertrofia da túnica muscular. Isso porque, a subpopulação dos neurônios NADPH-dp produz óxido nítrico (NO) e, utilizam desse neurotransmissor criando uma barreira protetora, tornando-os menos vulneráveis a morte e mantendo o funcionamento do intestino [56;57;58]. A atrofia celular observada nos períodos de 30 DPI e 90 DPI pode estar relacionada ao processo de adaptação às necessidades do TGI [55]. Assim como no jejuno de hamsters com *L. (L) infantum* [19], a atrofia desses neurônios pode ter ocorrido em resposta à infecção parasitária, resultando em um aumento a produção de NO, já que este é uma molécula citotóxica que inibe as enzimas essenciais mitocondriais e nucleares. Entretanto, quantidades excessivas de NO são prejudiciais não só para o parasita, mas também para as células intestinais [59]. O comprometimento das enzimas citoplasmáticas neuronais pode estar correlacionado com a diminuição da área celular.

No segmento do cólon descendente, há redução na densidade dos neurônios NADPH-dp no período de 90 DPI, que pode ser explicado como um reflexo da carga

parasitária no órgão e cronicidade da infecção, assim como já mencionado em estudos realizados com infecções de *T. gondii* e *Trypanossoma cruzi*, onde os autores indicam essa resposta como aumento das atividades do sistema imunológico [60;61;62;63]. Uma outra explicação pode se dar devido a uma compensação pelo aumento no metabolismo desses neurônios, já que no mesmo período, os neurônios apresentaram hipertrofia ou, até mesmo, uma resposta compensatória à imunidade, assim como observado nos neurônios nitrérgicos do intestino delgado de hamsters infectados por *L. (L.) infantum* [19]. No entanto, no intestino grosso, as perdas neuronais são mais acentuadas e, os neurônios viáveis, sofrem hipertrofia [27] atuando como um mecanismo de adaptação as condições adversas sofridas pelas células no organismo [37;54].

Há nos dois segmentos intestinais, uma resposta compensatória entre ambas as subpopulações neuronais, pois o processo inflamatório desencadeia um desequilíbrio na resposta imunológica da barreira intestinal [32], estando os resultados relacionados ao processo de adaptação neuronal às necessidades do TGI [55]. Alterações na plasticidade ocorrem como efeito da adaptação à novas condições de estresse, mantendo a homeostase do intestino [64].

Além das alterações nos neurônios do plexo mioentérico, também foram observadas alterações na dinâmica da estratigrafia intestinal em ambos os segmentos estudados. A musculatura do TGI é composta por uma grande rede de células que desempenham um importante papel na mediação da resposta imunológica. A hipertrofia da túnica muscular observada no presente estudo, pode estar relacionada com o aumento da resposta imunológica conduzindo a eventos pró-inflamatórios que foi induzido pela instalação do parasita no intestino [47;65;66]. Em um estudo de infecção induzida por *T. gondii*, foi observado o mesmo no jejuno

de ratos [49]. Por outro lado, assim como observado em estudo no duodeno de gatos infectados com toxoplasmose [67], a atrofia da túnica muscular pode indicar tolerância imune, resultado da cronificação da doença [68].

O aumento das pregas intestinais demonstra a adaptação do órgão para que haja maior superfície de contato com o lúmen intestinal. No entanto, a atrofia das pregas pode estar relacionada ao processo de *turnover* celular, que quando acelerado pode influenciar de forma negativa a diferenciação das células epiteliais, ocasionando disfunção do intestino [66]. Entretanto, as alterações observadas na morfometria da parede total, tanto do cólon ascendente quanto do cólon descendente, apresentaram-se como um reflexo das alterações da túnica muscular e das pregas intestinais do órgão.

As avaliações histológicas, indicaram que durante todos os períodos de infecção, a camada mucosa adaptou-se morfológicamente para manter a homeostase intestinal [15], tendo uma participação efetiva, influenciando e interagindo com as demais camadas, células e substâncias do intestino grosso. A camada mucosa controla a passagem de substâncias através do epitélio interagindo com a microbiota e auxiliando na criação da barreira intestinal, tornando um mecanismo essencial que mantém o bom funcionamento dos tecidos [69]. Portanto, quaisquer modificações na superfície de contato da barreira intestinal ou em sua composição mediada por patógenos, podem induzir a um processo inflamatório, como, distúrbios intestinais [70].

O intestino, possui uma barreira mecânica e imunobiológica, constituída por células como os IELs e as células caliciformes. Estes linfócitos são células da imunidade inata que atuam na defesa do hospedeiro secretando citocinas para o recrutamento e sinalização celular [69]. No entanto, em nossos resultados não foi

observada nenhuma modificação na densidade de IELs durante toda a infecção parasitária.

No presente estudo, houve redução das células caliciformes secretoras de mucinas neutras (PAS+) e ácidas (AB+) nos períodos de 30 DPI e 60 DPI, em ambos os segmentos intestinais. Em trabalhos similares, a infecção por *T. gondii* e *L. (L.) infantum* também foi observada a redução de células caliciformes, o que indica um processo de desenvolvimento de defesa do organismo frente a infecção [19; 67]. No entanto, no período de 90 DPI, foi observado aumento na densidade em ambas as populações celulares. Essas células são abundantes nas criptas do intestino grosso e formam ligações cruzadas entre si, que servem para originar o muco que protege e lubrifica o revestimento do intestino [72]. O aumento na densidade de células caliciformes no cólon indica uma reação de defesa do intestino em decorrência do estresse causado pela infecção, assim como observado em infecções causadas por *T. gondii* e *Leishmania spp* [66;67;73] corroborando com nossos resultados.

Portanto, é possível afirmar que a infecção causada pelo protozoário *Leishmania (L.) infantum*, resulta em problemas além dos descritos anteriormente na literatura, como os sinais clínicos e as alterações histopatológicas, pois também acarreta em diversas alterações morfofisiológicas no intestino grosso dos animais infectados. Essas alterações são um reflexo da relação intrínseca relação entre o sistema imune e os neurônios do plexo mioentérico, que buscam manter a homeostase do intestino enquanto enfrentam o patógeno. Os resultados são consistentes com a literatura, indicando a importância do SNE diante da resposta em defesa ao hospedeiro.

## REFERÊNCIAS

1. Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008; 2(10): e313.
2. WHO (World Health Organization). *Leishmaniasis: epidemiology and access to medicines*. Geneva, Switzerland. 2018.
3. MS (Ministério da Saúde). *Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas 1990 a 2015*. 2017.
4. Malafaia G. Leishmaniose visceral e desnutrição: uma relação ainda muito negligenciada. *Ver Soc Bras Med Trop*. 2010; 43(4): 478-479.
5. Almeida AS, Werneck GL, Resendes APC. Classificação orientada a objeto de imagens de sensoriamento remoto em estudos epidemiológicos sobre leishmaniose visceral em área urbana. *Cad Saúde Públ*. 2014; 30(8):1639-1653.
6. WHO (World Health Organization). *Leishmaniasis*. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (Acesso em 04 de dezembro de 2021).
7. Yeshaw Y, Tsegaye AT, Nigatu SG. Incidence of Mortality and Its Predictors among Adult Visceral Leishmaniasis Patients at the University of Gondar Hospital: A Retrospective Cohort Study. *Infect. Drug Resist*. 2020; 13: 881.
8. Organização Pan-Americana da Saúde. *Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas*. Núm. 9, dezembro de 2020. Washington, D.C.: OPAS; 2020. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>
9. Baltazar PI, Da Silva LM, Pessoa GT, De Sá RPR, Sanches MP, Das Neves AD, et al. Comparative B-Mode and Doppler Renal Ultrasonography with

- Histopathological Findings in Dogs Positive for Canine Visceral Leishmaniasis. *Microsc Res Tech*. 2016; 79: 637–645.
10. Lisboa AR, Leite FC, Dantas AEF, Oliveira IB, Evangelista TR, Sousa JBG. Análise Epidemiológica de Leishmaniose Visceral Em Municípios Do Sertão Paraibano. *Rev Bras Educ Saúde*. 2016; 6: 5.
  11. Marinho CP, Souza IM, Xavier MEB, Dourisboure CJ, Braz PH. Achado Citopatológico de Formas Amastigota de *Leishmania* Spp. Na Língua de Um Canino: Relato de Caso. *Pubvet*. 2017; 11: 1104–1107.
  12. Moreira PRR, Franciscato DA, Rossit SM, Munari DP, Vasconcelos RO. Influence of apoptosis on liver and spleen resistance in dogs with visceral leishmaniasis. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2016; 25(3): 342-347.
  13. Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol*. 2004; 57: 1-88.
  14. Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Fiuza VOP, Brazil RP. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2018; 96: 285-291.
  15. Figueiredo MM, Deoti B, Amorim IF, Pinto AJW, Moraes A, Carvalho CS, Da Silva SM, et al. Expression of regulatory T cells in jejunu, colon and cervical and mesenteric lymph nodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun*. 2014; 82(9): 3704-3712.
  16. Silva DT, Neves MF, Queiroz NMGPD, Spada JCP, Alves ML, Flóro SM, et al. Correlation study and histopathological description of intestinal alterations in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2016; 25 (1): 24-36.

17. 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. *Parasit. Immunol.* 2019; 41, e12661. doi: 10.1111/pim.12661.
18. Passos FC, Gois MB, Sousa AD, Marinho AIL, Corvo L, Soto M, Barral-Netto 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: e200377.
19. De Lima SKS, Cavallone IN, Oliveira KS, Passero LFD, Laurenti MD, Jesus JÁ, et al. Infection with *Leishmania (Leishmania) infantum* Changes the Morphology and Myenteric Neurons of the Jejunum of Golden Hamsters. *Parasitolo.* 2021; 1.4: 225-238.
20. Luz KG, Tuon FF, Duarte MIS, Maia GM, Matos P, Ramos AMDO, Nicodemo AC. Cytokine expression in the duodenal mucosa of patients with visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010; 43: 393-395.
21. Casanova MI, Martín S, Marco A, Solano-Gallego L. Detection of *Leishmania* Spp. Infection by Immunohistochemistry in Archived Biopsy Samples from Dogs with Colitis in an Area Endemic for Leishmaniasis. *J Comp. Pathol.* 2019; 167: 12–17.
22. NIGAM Y, KNIGHT J, WILLIAMS N. Gastrointestinal tract 5: the anatomy and functions of the large intestine. *Nursing Times.* 2019, 115(10): 50-3.
23. Figueiredo MM, Amorim IFG, Pinto AJW, Barbosa VS, Pinheiro LJ, Deoti B, Faria AMC, 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(1): 1-12.
24. Keita AV, Söderholm JD. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. Neurogastroenterol Motil. 2010; 22: 718-733.
  25. Bailey MT, Dowd SE, Galley JD, Hufnagle AR, Allen RG, Lyte M. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: Implications for stressor-induced immunomodulation. Brain Behav Immun. 2011; 25(3): 397-407.
  26. Furness JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. Nat Rev Gastroenterol Hepatol., 2012; 9: 286–294.
  27. Powell N, Walker MM, Talley NJ. The mucosal immune system: master regulator of bidirectional gut-brain communications. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2017; 14(3): 143-159.
  28. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai SHIV. Imunologia celular e molecular. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019.
  29. Matteoli G, Gomez-Pinilla PJ, Nemethova A, Di Giovangiulio M, Cailotto C, van Bree SH, et al. A distinct vagal anti-inflammatory pathway modulates intestinal muscularis resident macrophages independent of the spleen. Gut. 2014, 63(6): 938-948.
  30. Gonçalves JL, Yaochite JNU, Almeida de Queiroz CA, Câmara CC, Oriá RB. Bases do sistema imunológico associado à mucosa intestinal. Oriá RB, Brito GAC. Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica. Blucher Open Acess. 2016: 369-388.
  31. Solé D, Silva LR, Cocco RR, Ferreira CT, Sarni RO, Oliveira LC, et al. Consenso Brasileiro sobre Alergia Alimentar: 2018-Parte 1-Etiopatogenia,

- clínica e diagnóstico. Documento conjunto elaborado pela Sociedade Brasileira de Pediatria e Associação Brasileira de Alergia e Imunologia. Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia. 2018, 2(1): 7-38.
32. Yoo B, Mazmanian SK. The Enteric Network: Interactions between the Immune and Nervous Systems of the Gut. *Immun.* 2017; 46(6): 910–926.
  33. Furness JB. The enteric nervous system: normal functions and enteric neuropathies. *Neurogastroenterol Motil.* 2008, 20(1): 32-38.
  34. Verheijden SB, Boeckxstaens GE. The Vagus Nerve in Appetite Regulation, Mood, and Intestinal Inflammation. *Gastroenterology*. W.B. Saunders. 2017, 405(6785): 458-462, 2017.
  35. Sant’Ana DMG, Góis MB, Hermes-Uliana C, et al. Acute infection with an avirulent strain of *Toxoplasma gondii* causes decreasing and atrophy of nitrergic myenteric neurons of rats. *Acta Histochemica* 2017; 119(4): 423-427.
  36. Tironi LMT, Beraldi EJ, Borges SC, et al. Toxoplasmic Infection-induced Injury in the Ileal Myenteric Plexus in Rats Depends on the Dose of *Toxoplasma gondii* Oocysts. *J. Morphol. Scien.* 2018; 35: 80–86. doi: <https://doi.org/10.1055/s-0038-1660494>.
  37. Trevizan AR, Schneider LCL, Araújo EJA, Garcia JL, Buttow NC, Nogueira-Melo GA, Sant’Ana DMG. Acute *Toxoplasma gondii* infection alters the number of neurons and the proportion of enteric glial cells in the duodenum in Wistar rats. *Neurogastroenterol Motil.* 2019; 31(3): e13523.
  38. Dos Santos AGA, Da Silva MGL, Carneiro EL, De Lima LL, Fernandes ACBS, Silveira TGV, Sant’Ana DMG, et al. A New Target Organ of *Leishmania*

- (*Viannia*) *braziliensis* Chronic Infection: The Intestine. Front Cell Infect Microbiol. 2021; <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.687499>.
39. Kabouridis PS, Pachnis V. Emerging roles of gut microbiota and the immune system in the development of the enteric nervous system. J Clin Investig. 2015; 125(3): 956-964.
  40. Braga-Silva CF, Suhett CSR, Drozino RN, Moreira NM, Sant'Ana DMG, Araújo SM. Biotherapeutic of *Toxoplasma gondii* reduces parasite load, improves experimental infection, protects myenteric neurons and modulates the immune response in mice with toxoplasmosis. Eur J Integr Med. 2016; 8: 865–874.
  41. Barbosa BJP, Araújo EJA, Silva AV, Sant'Ana DMG. Atrofia neuronal mientérica no íleo de ratos infectados cronicamente por uma cepa genótipo I de *Toxoplasma gondii*. Arq Ciên Vet e Zool. 2009; 12:101-108.
  42. Moreira NM, Zanoni JN, Dalálio MMO, Araújo EJA, Braga CF, Araújo SM. Physical exercise protects myenteric neurons and reduces parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. Exp Parasitol. 2014; 141: 68-74.
  43. Andrade ME, Araújo RS, De Barros PA, Soares AD, ABRANTES FA, Generoso SV, Fernandes SO, Cardoso VN. The role of imunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models. E Spen Eur E J Clin Nutr Metab. 2015; 34(6): 1080-1087.
  44. Nico D, Feijó DF, Maran N, Morrot A, Scharfstein J, Palatnik M, Palatnik-de-Sousa CB. Resistance to visceral leishmaniasis is severely compromised in mice deficient of bradykinin B2-receptors. Parasit Vectors. 2012; 5: 261.
  45. Pinto AJ, Figueiredo MM, Silva FL, Martins T, Michalick MS, Tafuri WL, Tafuri WL. Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of

- dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. Acta Vet Scand. 2011; 53(1): 67.
46. Silva DT, Alves ML, Spada JCP, Silveira RCV, Oliveira TMF, 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, 430–438. doi: 10.1590/s1984-296120180085
  47. Santos AGA, Ferlini JP, Vicentino SL, Lonardoni MVC, Sant’Ana DMC, Melo GAN. Alterations induced in the ileum of mice upon inoculation with different species of *Leishmania*: a preliminary study. Ver Soc Bras Med Trop. 2018; 51(04): 537-541.
  48. Drugs for Neglected Diseases Initiative Leishmaniasis. Available online: <https://dndi.org/diseases/visceral-leishmaniasis/facts/> (Acesso em 08 de dezembro de 2021).
  49. Vicentino-Vieira SL, Melo GAN, Góis MB, et al. Oral dependent-dose toxoplasmic infection model induced by oocysts in rats: Myenteric plexus and jejunal wall changes. Exp parasitol. 2015; 156: 12-18.
  50. Góis MB, Hermes-Uliana C, Zago MCB, et al. Chronic infection with *Toxoplasma gondii* induces death of submucosal enteric neurons and damage in the colonic mucosa of rats. Exp Parasitol. 2016; 164: 56–63.
  51. Hermes-Uliana C, Panizzon CPNB, Trevizan AR, Sehaber CC, Ramalho FV, Martins HA, Zanoni JN. Is I-Glutathione More Effective Than I-Glutamine in Preventing Enteric Diabetic Neuropathy? Dig Dis Sci. 2013; 59(5): 937–948.
  52. Arantes RME, Marche HHF, Bahia MT, Cunha FQ, Rossi MA, Silva JS. Interferon- $\gamma$ -Induced Nitric Oxide Causes Intrinsic Intestinal Denervation in *Trypanosoma cruzi*-Infected Mice. Am J Pathol. 2004; 164(4): 1367-1368.

53. Schneider LCL, Araújo SM, Buttow NC. *Trypanosoma cruzi* (Cepa CL) promove perda neuronal no Plexo Mioentérico do Cólon de ratos. Ver Saúde Pesq. 2016; 9(2): 235-242.
54. Araújo EJA, Zaniolo LM, Vicentino SL, Gois MB, Zanoni JN, Silva AV, Sant'Ana DMG. *Toxoplasma gondii* causes death and plastic alteration in the jejunal myenteric plexus. World J Gastroenterol, 2015; 21(16): 4829-4839.
55. Pereira LS, Da Silva AV, Araújo EJA, Sant'Ana DMG. Hypertrophy of NADH-diaphorase positive myenteric neurons in rat jejunum after acute infection caused by *Toxoplasma gondii*. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2010; 16(2): 28-310.
56. Chandrasekharan B, Srinivasan S. Diabetes and the enteric nervous system. Neurogastroenterol Motil. 2007; 19(12): 951–960.
57. Nishikawa Y, Kawase O, Vielemeyer O, Suzuki H, Joiner KA, Xuan X, Nagasawa H. *Toxoplasma gondii* infection induces apoptosis in noninfected macrophages: role of nitric oxide and other soluble factors. Parasite Immunol. 2007; 29(7): 375-385.
58. Sugauara EYY, Sant'Ana DMG, Silva AV, Souza EA, Araújo EJA. Hypertrophy of the neurons in the ileum of rats infected with cysts of *Toxoplasma gondii* (genotype II). Acta Scientiarum. Int J Biol Sci. 2009; 31(2): 195-201.
59. Brunet LR. Nitric oxide in parasitic infections. International immunopharmacology. 2001; 1(8): 1457-1467.
60. Iantorno G, Bassotti G, Kogan Z, Lumi CM, Cabanne AM, Fisogni S, Varrica LM, et al. The Enteric Nervous System in Chagasic and Idiopathic Megacolon. Am J Surg Pathol. 2007; 31(3): 460-8.

61. Silva LS, Sartori AL, Zaniolo LM, Silva AV, Sant'Ana DMG, Araújo EJA. *Toxoplasma gondii*: Myenteric neurons of intraperitoneally inoculated rats show quantitative and morphometric alterations. *Exp Parasitol*. 2011; 129(1): 5-10.
62. Halliez MCM, Buret AG. Gastrointestinal Parasites and the Neural Control of Gut Functions. *Front Cell Neurosci*. 2015; 9: 452.
63. Schneider LCL, Do Nascimento JCP, Trevizan AR, et al. *Toxoplasma gondii* promotes changes in VIP ergic submucosal neurons, mucosal intraepithelial lymphocytes, and goblet cells during acute infection in the ileum of rats. *Neurogastroenterol Motil*. 2018; 30(5): e13264.
64. Schafer KH, Van Ginneken C, Copray S. Plasticity and neural stem cells in the enteric nervous system. *Anat Rec (HOBOKEN)*. 2009; 292(12): 1940-1952
65. Bauer AJ. Mentation on the immunological modulation of gastrointestinal motility. *Neurogastroenterol Motil*. 2008; 20: 81-90.
66. Weiss LM, KIM K. *Toxoplasma gondii*: o modelo apicomplexa. *Perspectivas e métodos*. Elsevier, 2011.
67. Silva JM. Efeitos da infecção crônica por *Toxoplasma gondii* sobre a parede intestinal de gatos domésticos. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2010; 19(1): 55-61.
68. Elia CCS, Souza HSP. *Imunologia da mucosa intestinal: da bancada ao leito*. Rio de Janeiro: Atheneu. 2001; :187.
69. Citi S. Intestinal barriers protect against disease. *Science*. 2018; 359(6380): 1097-1098, 2018.
70. Groschwitz K, Hogan S. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clinical Immun*. 2009; 124(1): 3-20.
71. Sant'Ana DMG, Góis MB, Zanoni JN, Da Silva AV, Da Silva CJT, Araújo EJA. Intraepithelial lymphocytes, goblet cells and VIP-IR submucosal neurons of

jejunum rats infected with *Toxoplasma gondii*. Int J Exp Pathol. 2012; 93: 279–86.

72. Junqueira LC, Carneiro JA, Abrahamsohn P. Histologia Básica. 13ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 2017.
73. Trevizan AR, Vicentino-Vieira SL, Watanabe PS, Gois MB, Melo GAN, Garcia JL, Araújo EJA, et al. Kinetics of acute infection with *Toxoplasma gondii* and histopathological changes in the duodenum of rats. Exp parasitol. 2016; 165: 22-29.

## ANEXOS

**Tabela 1** – Densidade de amastigotas pela análise LDU (*Leishaman-Donovan units*)

expressa em média  $\pm$  desvio padrão dos períodos de 30, 60 e 90 dias pós-infecção (DPI).

| Órgão          | Período                  |                              |                            |
|----------------|--------------------------|------------------------------|----------------------------|
|                | 30 PI                    | 60 PI                        | 90 PI                      |
| Baço           | 711,07<br>$\pm 354,5^a$  | 27551,28<br>$\pm 11210,74^b$ | 81806,09<br>$\pm 62966,36$ |
| Fígado         | 1053,6<br>$\pm 749,71^a$ | 21918,63<br>$\pm 14434,86^b$ | 41780,78<br>$\pm 32256,97$ |
| C. Ascendente  | 89,79<br>$\pm 95,23$     | 239,63<br>$\pm 290,72^a$     | 560,58<br>$\pm 292,82^b$   |
| C. Descendente | 101,49<br>$\pm 135,43$   | 255,33<br>$\pm 413,41$       | 280,62<br>$\pm 224,62$     |

\*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os períodos.

**Tabela 2** – Densidade dos neurônios metabolicamente ativos (NADH-dp) e dos

neurônios nitrérgicos (NADPH-dp) expressos em média  $\pm$  desvio padrão dos períodos de 30, 60 e 90 dias pós-infecção (DPI) nos animais dos grupos controle (GC) e experimental (GE).

|                   |          | Densidade Neuronal   |                       |                       |                       |                       |                        |
|-------------------|----------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
|                   |          | 30 DPI               |                       | 60 DPI                |                       | 90 DPI                |                        |
|                   |          | GC                   | GE                    | GC                    | GE                    | GC                    | GE                     |
| Cólon ascendente  | NADH-dp  | 22,7<br>$\pm 1,55^a$ | 13,25<br>$\pm 0,63^b$ | 19,72<br>$\pm 1,99^a$ | 16,83<br>$\pm 2,05^b$ | 19,67<br>$\pm 3,71^a$ | 16,025<br>$\pm 1,76^b$ |
|                   | NADPH-dp | 10,3<br>$\pm 2,02$   | 12,44<br>$\pm 1,73$   | 11,93<br>$\pm 0,5^a$  | 14,67<br>$\pm 0,69^b$ | 13,65<br>$\pm 0,53$   | 14,52<br>$\pm 1,75$    |
| Cólon descendente | NADH-dp  | 23,75<br>$\pm 0,78$  | 18,9<br>$\pm 4,69$    | 13,1<br>$\pm 4,015^a$ | 22,17<br>$\pm 0,89^b$ | 16,4<br>$\pm 1,13$    | 17,325<br>$\pm 4,09$   |
|                   | NADPH-dp | 11,18<br>$\pm 1,19$  | 11,76<br>$\pm 1,95$   | 10,66<br>$\pm 1,71$   | 9,8<br>$\pm 1,12$     | 13,38<br>$\pm 3,48^a$ | 9,87<br>$\pm 0,42^b$   |

\*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) com seus respectivos grupos controles.

**Tabela 3 –** Morfometria neuronal ( $\mu\text{m}^2$ ) dos neurônios metabolicamente ativos (NADH-dp) e dos neurônios nitrérgicos (NADPH-dp) expressa em média  $\pm$  desvio padrão nos períodos de 30, 60 e 90 dias pós-infecção (DPI) dos animais dos grupos controle (GC) e experimental (GE).

|                              |          | <b>Morfometria do perfil celular (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b> |                        |                         |                         |                         |                         |
|------------------------------|----------|-------------------------------------------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                              |          | <b>30 DPI</b>                                                     |                        | <b>60 DPI</b>           |                         | <b>90 DPI</b>           |                         |
|                              |          | <i>GC</i>                                                         | <i>GE</i>              | <i>GC</i>               | <i>GE</i>               | <i>GC</i>               | <i>GE</i>               |
| <b>Cólon<br/>ascendente</b>  | NADH-dp  | 150,91<br>$\pm 7,25^a$                                            | 136,73<br>$\pm 0,02^b$ | 183,88<br>$\pm 59,01$   | 137,30<br>$\pm 11,81$   | 117,61<br>$\pm 16,52^a$ | 141,61<br>$\pm 13,71^b$ |
|                              | NADPH-dp | 104,66<br>$\pm 13,9^a$                                            | 83,29<br>$\pm 3,68^b$  | 102,78<br>$\pm 19,59$   | 90,41<br>$\pm 3,88$     | 107,15<br>$\pm 2,94^a$  | 85,19<br>$\pm 9,09^b$   |
| <b>Cólon<br/>descendente</b> | NADH-dp  | 130,87<br>$\pm 4,89$                                              | 165,16<br>$\pm 33,87$  | 267,42<br>$\pm 66,21^a$ | 128,87<br>$\pm 37,13^b$ | 188,41<br>$\pm 80,89$   | 181,56<br>$\pm 85,49$   |
|                              | NADPH-dp | 76,01<br>$\pm 4,5$                                                | 80,55<br>$\pm 10,1$    | 98,35<br>$\pm 11,6$     | 97,27<br>$\pm 10,67$    | 90,04<br>$\pm 24,53^a$  | 113,9<br>$\pm 2,48^b$   |

\*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) com seus respectivos grupos controles.

**Tabela 4 –** Morfometria intestinal ( $\mu\text{m}$ ) expressa em média  $\pm$  desvio padrão nos períodos de 30, 60 e 90 dias pós-infecção (DPI) dos animais dos grupos controle (GC) e experimental (GE).

|                              |                 | <b>Estratigrafia intestinal (<math>\mu\text{m}</math>)</b> |                       |                       |                        |                      |                        |
|------------------------------|-----------------|------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| <b>Grupos</b>                |                 | <b>30 DPI</b>                                              |                       | <b>60 DPI</b>         |                        | <b>90 DPI</b>        |                        |
|                              |                 | <i>GC</i>                                                  | <i>GE</i>             | <i>GC</i>             | <i>GE</i>              | <i>GC</i>            | <i>GE</i>              |
| <b>Cólon<br/>Ascendente</b>  | Prega da Mucosa | 176,6<br>$\pm 70,7^a$                                      | 253,8<br>$\pm 50,7^b$ | 179,4<br>$\pm 80,4^a$ | 232,5<br>$\pm 55,5^b$  | 251,2<br>$\pm 25,7$  | 232,1<br>$\pm 59,7$    |
|                              | Túnica Muscular | 59,3<br>$\pm 23,9^a$                                       | 83,8<br>$\pm 16,7^b$  | 62,1<br>$\pm 23,2^a$  | 73,4<br>$\pm 15,6^b$   | 82,3<br>$\pm 10,7^a$ | 78,4<br>$\pm 36,2^b$   |
|                              | Parede Total    | 270,4<br>$\pm 111,5^a$                                     | 380,3<br>$\pm 64,9^b$ | 280<br>$\pm 115,4^a$  | 342,8<br>$\pm 70,4^b$  | 361,2<br>$\pm 44^a$  | 345,6<br>$\pm 102,9^b$ |
| <b>Cólon<br/>descendente</b> | Prega da Mucosa | 323<br>$\pm 149$                                           | 267,3<br>$\pm 79,2$   | 344,8<br>$\pm 162^a$  | 268,6<br>$\pm 88,9^b$  | 339<br>$\pm 65,2$    | 317,5<br>$\pm 89,9$    |
|                              | Túnica Muscular | 94,2<br>$\pm 47,8$                                         | 93,7<br>$\pm 23,7$    | 97,1<br>$\pm 48,9$    | 92,3<br>$\pm 29,8$     | 76,1<br>$\pm 10,1$   | 82,5<br>$\pm 17,5$     |
|                              | Parede Total    | 457,2<br>$\pm 187,6$                                       | 397,5<br>$\pm 105,6$  | 483<br>$\pm 203,4^a$  | 398,6<br>$\pm 113,5^b$ | 459,2<br>$\pm 84,8$  | 450,5<br>$\pm 116,8$   |

*\*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) com seus respectivos grupos controles.*

**Tabela 5** – Razão entre linfócitos intraepiteliais (IELs), alcian blue (AB+) e ácido periódico reativo de Schiff (PAS+) e enterócitos expressa em porcentagem (%)  $\pm$  desvio padrão nos períodos de 30, 60 e 90 dias pós-infecção (DPI) dos animais dos grupos controle (GC) e experimental (GE).

|                          |                     | <b>Densidade de células da mucosa (%)</b> |                     |                     |                     |                     |                     |
|--------------------------|---------------------|-------------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                          |                     | <b>30 DPI</b>                             |                     | <b>60 DPI</b>       |                     | <b>90 DPI</b>       |                     |
|                          |                     | <i>GC</i>                                 | <i>GE</i>           | <i>GC</i>           | <i>GE</i>           | <i>GC</i>           | <i>GE</i>           |
| <b>Cólon ascendente</b>  | IELs/<br>Enterócito | 1,94<br>$\pm 0,4$                         | 1,6<br>$\pm 0,5$    | 1,37<br>$\pm 0,6$   | 0,9<br>$\pm 0,2$    | 1,8<br>$\pm 0,5$    | 1,2<br>$\pm 0,7$    |
|                          | AB+/<br>Enterócito  | 31,0<br>$\pm 3,0$                         | 33,0<br>$\pm 7,0$   | 35,0<br>$\pm 5,0^a$ | 20,0<br>$\pm 6,0^b$ | 10,0<br>$\pm 4,0^a$ | 18,0<br>$\pm 6,0^b$ |
|                          | PAS+/<br>Enterócito | 18,0<br>$\pm 6,0^a$                       | 12,0<br>$\pm 3,0^b$ | 10,1<br>$\pm 4,3$   | 12,0<br>$\pm 3,0$   | 13,0<br>$\pm 3,0^a$ | 9,0<br>$\pm 1,0^b$  |
| <b>Cólon descendente</b> | IELs/<br>Enterócito | 1,4<br>$\pm 0,6$                          | 1,59<br>$\pm 0,6$   | 2,0<br>$\pm 0,6$    | 1,5<br>$\pm 0,6$    | 1,0<br>$\pm 0,3$    | 0,4<br>$\pm 0,3$    |
|                          | AB+/<br>Enterócito  | 18,0<br>$\pm 6,3^a$                       | 6,8<br>$\pm 3,0^b$  | 11,2<br>$\pm 3,0$   | 7,2<br>$\pm 1,3$    | 9,8<br>$\pm 2,0^a$  | 25,9<br>$\pm 9,0^b$ |
|                          | PAS+/<br>Enterócito | 16,0<br>$\pm 4,3^a$                       | 9,8<br>$\pm 0,2^b$  | 13,4<br>$\pm 2,0^a$ | 7,7<br>$\pm 1,2^b$  | 10,6<br>$\pm 2,0^a$ | 21,0<br>$\pm 9,0^b$ |

*\*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) com seus respectivos grupos controles.*

Normas da revista **Gastroenterology Research**.

Link com informações para os autores (normas e formatação)

<https://gastrores.org/index.php/gastrores/about/submissions#authorGuidelines>

## Submissions

### Author Guidelines

Our requirements for submitted manuscripts are in accordance with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. For general information about the structure and content of a biomedical manuscript, authors should get familiar with the ICMJE Uniform Requirements for Manuscripts before reading the specific instructions for Gastroenterology Research below.

### General Requirements

Important notes: If you submit manuscripts via the online submission system, the first step is to register as a user of this site, make sure to check to register as Author, then you may add yourself as a Reader or a Reviewer as you like. When you upload your files, the manuscript main text is uploaded as the SUBMISSION FILE, and all other files are uploaded as SUPPLEMENTAL FILES, such as figures, cover letter, etc.

All manuscripts should be submitted electronically via our website, submissions via regular postal mail are not acceptable at the moment. Manuscripts should be double-spaced (including references, tables, and figure legends). ***Gastroenterology Research* does not enforce a word limit for the manuscript**, neither has a limit for figures, tables, legends and references.

Before submitting online, authors are asked to have their manuscript saved in word file and each figure saved as a separate electronic file, preferably named as "figure 1.tif," "figure 2.jpg," etc.

Manuscripts are accepted for consideration with the understanding that they have been submitted solely to *Gastroenterology Research* and that they have not been previously published, either in whole or in part. *Gastroenterology Research* is a fully peer-reviewed journal. The editors reserve the right to make editorial changes in all matter published in the *Journal*.

A cover letter should accompany the manuscript. It should include the name, mailing address, telephone and FAX numbers, and e-mail address of the corresponding author.

### Clinical Trials Registration

Authors are encouraged to register their clinical trials with an international recognized clinical trials register, such as: [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov); the EU Clinical Trials Register; WHO Clinical Trials Registry Platform.

Though not strictly required, the following clinical reporting guidelines are recommended to follow when preparing the relevant manuscripts.

- Randomized trials (CONSORT)
- Observational studies (STROBE)
- Systematic reviews (PRISMA)
- Case reports (CARE)
- Qualitative research (SRQR)
- Diagnostic / prognostic studies (STARD)
- Quality improvement studies (SQUIRE)
- Economic evaluations (CHEERS)
- Animal pre-clinical studies (ARRIVE)
- Study protocols (SPIRIT)
- Clinical practice guidelines (AGREE)

### **Authorship**

The ICMJE recommends that authorship be based on the following 4 criteria ([www.icjme.org](http://www.icjme.org)):

- 1) Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; AND
- 2) Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; AND
- 3) Final approval of the version to be published; AND
- 4) Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

### **Corresponding Author**

There must be a corresponding author (not more than 2 in a manuscript) clearly indicated in the title page, with his/her full academic affiliation, contact information (email, tel., fax).

The corresponding author is the person who is taking the responsibilities of the manuscript being prepared following research and publishing integrity and ethics.

The galley proof will be sent to the corresponding author for proofreading. Meanwhile, the galley proof might be also "carbon copy, CC" to the submitting individual, but that is not for all articles.

*"The corresponding author is the one individual who takes primary responsibility for communication with the journal during the manuscript submission, peer review, and publication process, and typically ensures that all the journal's administrative requirements, such as providing details of authorship, ethics committee approval, clinical trial registration documentation, and gathering conflict of interest forms and statements, are properly completed, although these duties may be delegated to one or more coauthors. The corresponding author should be available throughout the submission and peer review process to respond to editorial queries in a timely way, and should be available after publication to respond to critiques of the work and cooperate with any requests from the journal for data or additional information should questions about the paper arise after publication"([www.icjme.org](http://www.icjme.org)).*

### **Submitting Author**

The submitting author is the person who carries out the submission work and submits the manuscript (usually via online submission portal) to the journal. The submitting author is not necessarily the corresponding author, however, upon receiving the manuscript submitted by the individual (submitting author) other than the corresponding author, we assume that the submitting author has obtained explicit permission from the corresponding author to do so, and we assume that the corresponding author is fully aware of and approves the submission and oversees the editorial procedures of the manuscript.

In this circumstance, a submission approval letter from the corresponding author might be requested by the editor, and the corresponding author should provide such letter before we do any processing of the manuscript.

### **Valid Email Address**

The submitting author and corresponding author are responsible for providing valid and attended email address, and should check the email regularly, in order not to delay the editorial procedure.

The galley proof will be sent to the corresponding author for proofreading. Meanwhile, the galley proof might be also sent “carbon copy, CC” to the submitting individual, but that is not for all articles.

### **Preparation of Original Articles**

Original Articles are full-length reports of original research and will be considered for either the Clinical Research or the Basic Research. All articles should cover topics relevant to clinical and basic studies in gastroenterology.

#### *Title Page*

Title: Include animal species. Use no abbreviations. Limit: 150 characters with spaces.

Short Title: limit 45 characters (with spaces).

#### **Authors**

Include first and last names of all authors, and name and full location of department and institution where work was performed.

#### **Grant Support**

List grant support and other assistance if applicable.

#### **Correspondence**

Provide name, complete address, e-mail address, telephone number, and fax number of the corresponding author.

#### **Financial Disclosures**

All authors must disclose any financial arrangement(s) they may have with a company whose product figures prominently in the submitted manuscript or with a company making a competing product.

#### *Structured abstract*

Limit: 350 words. Organize according to the following headings: Background & Aims, Methods, Results, and Conclusions. Do not use footnotes, or references.

Key words

Provide up to 8 keywords.

### *Introduction*

Should be brief and set out the purposes for which the study has been performed along with relevant previous studies only wherever essential and necessary.

### *Materials and methods*

Should be sufficiently detailed so that readers and reviewers can understand precisely what has been done without studying the references directly. The description may be abbreviated when well accepted techniques are used. Describe ethical guidelines followed, for human or animal studies. Cite approval of institutional human research review committee or animal welfare committee. Outline statistical methods used. When describing the results of hypothesis testing, report *P* values and/or confidence intervals. Using phrases such as "not significant" is not sufficient. Identify drugs and chemicals used by generic name, if trademarks are mentioned, manufacturer name and city are given.

### *Results*

Should be presented precisely and directly. Do not include discussion of their importance in this section of the manuscript.

### Tables

Tables should be prepared without use of tabs; most table editor programs can be uploaded successfully.

### Figures

Images: Images can be clinical, pathologic (gross or microscopic), endoscopic, or radiographic. They should be of high quality (300 dpi or greater, clear, and in good focus), and illustrate well the diagnosis.

Color files should be submitted in the CMYK color space. Authors are encouraged to present color figures in a manner that will allow the data to be interpreted by colorblind readers.

You must **add arrows** if necessary on the figure to call out the relevant or important element of the figure, the legend should state what the arrows indicate.

### Font

If your figures include text, an 8 to 10 point font should be used. Acceptable fonts are "sans serif" fonts such as Arial, Helvetica, and Myriad. Examples of unacceptable fonts ("serif" fonts) are Times.

### Photographs

Photographs of identifiable patients must come with written permission to publish from the patient.

Line art and graphs: any graphs or line art you submit are at a resolution of at least 300 dpi so that they are readable to reviewers.

Accepted figure file formats: We support the following file formats: .bmp, .gif, .jpg, .png, .tif, .eps. When sending image files, please do not embed them in Word or PowerPoint. You may submit mixed file formats such as image1.jpg, image2.tif, image3.eps. Preferred figure file formats: .tiff, .psd .eps and .jpg.

Image file formats not supported at this time: ChemDraw, CorelDraw, Canvas, FreeHand, Excel, SigmaPlot, and Equation Editor. You may export image files from these programs as PDF, Jpeg, or other acceptable file formats.

File naming convention: Figures should be named consecutively such as "figure 1.tif," "figure 2.jpg," etc., with the file extension appended (.tif, .jpg, .eps, etc). Each figure should be saved as a separate electronic file. Authors must be aware of that color figure printing fee will be incurred. If the manuscript is reviewed with color figures, and the author does not wish to pay for printing color figures, the authors may choose to have their color figures printed in grayscale or black-and-white. Color figures are always free online.

### *Discussion*

Discussion should be directly related to the study being reported. Do not include a general review of the topic only. An in-depth and insightful discussion in regarding to the new findings is encouraged.

### *References*

Number references in the order cited as Arabic numerals in square brackets on the line. Only literature that is published or in press (with the name of the publication known) may be numbered and listed; abstracts and letters to the editor may be cited. Other materials, such as manuscripts submitted, unpublished data, personal communications, and the like, should not be cited.

List all authors up to seven, using "et al." when the number is greater than seven.

#### *Journal Articles*

Joffe SW, Dewolf M, Shih J, McManus DD, Spencer FA, Lessard D, Gore JM, et al. Trends in the medical management of patients with heart failure. J Clin Med Res. 2013;5(3):194-204.

#### *Books*

Watson JD. The Double Helix. New York: Atheneum, 1968:1-6. Book Chapters

Hofmann AF. The enterohepatic circulation of bile acids in health and disease. In: Sleisinger MH, Fordtran JS, eds. Gastrointestinal Disease. Volume 1. 5th ed. Philadelphia: Saunders, 1993:127-150.

### *Figure and table legends*

Please do not embed or flatten the text into the image files. Legends should be in Word file and start from a new page, and numbered corresponding to the appearing order in the text.

## **Submission Declarations (Conflict of Interest, Human and Animal Rights, Informed Consent, ant others)**

The authors should declare any conflict of interests related to the manuscript. Published research must comply with the guidelines for human studies and animal welfare regulations. Authors should state that subjects have given their informed consent and that the study protocol has been approved by the institute's committee on human research. Further, they should also state that animal experiments conform to institutional standards.

Please include the following declarations, any submissions missing a single item of declaration will be returned for resubmission.

### Original Article, Short Communication

- Acknowledgement
- Financial Disclosure or Funding
- Conflict of Interest
- Informed Consent
- Author Contributions
- Institutional Review Board Approval (IRB Approval, add in the Methods section)
- Ethical Compliance with Human/Animal Study (add in the Methods section. *Examples: This study was conducted in compliance with the ethical standards of the responsible institution on human subjects as well as with the Helsinki Declaration; or, This study was conducted in compliance with all the applicable institutional ethical guidelines for the care, welfare and use of animals.*)
- Data Availability

## **Decisions**

The single most important criterion for acceptance is the originality of the work. However, a decision to accept a manuscript is not based solely on the scientific validity of its content. Other factors may affect decisions, such factors are, the extent and importance of new information in the paper compared with that in other papers being considered, the Journal's need to represent a wide range of topics, and the overall suitability for *Gastroenterology Research*.

Decisions on peer-reviewed papers are sent to the authors via email within an average of 3 weeks from the date of submission.

## **Open Access Publishing Charge**

This is an open access journal, an open access Article Publishing Charge is required for accepted articles, fees vary from article types, click [here](#) for rates details. Upon acceptance for publication, this fee is payable, an invoice will be sent to the submitting author or corresponding author.

## **Editing**

Accepted papers are subject to copyediting according to the style of *Gastroenterology Research*, authors will be sent galley proofs (HTML and PDF) for proofreading. The authors need to approve all the statements contained in the article including the changes the copyeditor has made before publication.

## **Disclaimer**

The statements and opinions contained in this journal are solely those of the individual authors and do not necessarily reflect those of the editors or the publisher. The appearance of advertisements in the Journal is not a warranty, endorsement or approval of the products or services advertised or of their safety. The Editor-in-Chief and the Publisher disclaim responsibility for any injury to persons or property resulting from any ideas or products referred to in the articles or advertisements.

### ***Open access***

This journal provides immediate open access to its content, by this way, we make research freely available to the public and support a greater global exchange of knowledge.

By default, Elmer Press publishes all articles under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (Attribution-NonCommercial 4.0 International CC-BY-NC 4.0), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### ***Copyright, license, and permission for authors***

The authors retain the copyright of their published articles, and the corresponding author has the right to grant on behalf of all authors the license (Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License) to the publisher. This license allows authors to use their own articles for their own non-commercial purposes without seeking permission from us, but should provide proper acknowledgement and citation of the first publication in our journal. If the use is for commercial purpose, the authors should obtain permission from us, and a fee may apply.

The non-commercial use may include the following:

- 1) Post a fulltext or abstract of their own article on their own personal or institutional websites.
- 2) Making a reasonable number of copies for personal or non-commercial professional use, e.g. for authors own teaching tasks.
- 3) Republishing part or the entire article in a book or other publication edited by the author.
- 4) Using the article in a course pack or compilation (whether paper or electronic) in the authors' institution. This does not apply if a commercial charge is made for the compilation or training program.

### ***Permission for the third parties***

Anyone (other than the authors) is free to reuse, change and build upon the work non-commercially, but the new work must be non-commercial and the original source must be acknowledged and cited. Any third party who wants to reproduce an article, in part or fulltext, for commercial proposes, should seek our permission, a fee may apply.

### ***Privacy Statement***

Reviewers provide comments for the editor and for the authors. The Journal expects reviewers to treat manuscripts as confidential communications and not to use the content for their own purposes or make copies of the manuscripts. Reviewers are also expected to declare to the editor any possible conflicts of interest.

The names and email addresses entered in this journal site will be used exclusively for the stated purposes of this journal and will not be made available for any other purpose or to any other party.