



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS APLICADAS A
ANIMAIS DE INTERESSE REGIONAL

CLARISSE MARIA BARBOSA FONSECA

INFECÇÃO POR *Leishmania infantum* ALTERA A HISTOARQUITETURA E
A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS NAS GLÂNDULAS SALIVARES

Teresina

2024

CLARISSE MARIA BARBOSA FONSECA

INFECÇÃO POR *Leishmania infantum* ALTERA A HISTOARQUITETURA E A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS NAS GLÂNDULAS SALIVARES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional da Universidade Federal do Piauí, na área de concentração Diagnósticos Avançados em Medicina Veterinária e linha de pesquisa Biotecnologia celular e aplicabilidades, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Aírton Mendes Conde Júnior

Teresina

2024

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial CCA
Serviço de Representação da Informação

F676i Fonseca, Clarisse Maria Barbosa.
 Infecção por leishmania infantum altera a histoarquitetura e a
 expressão de proteínas nas glândulas salivares / Clarisse Maria
 Barbosa Fonseca. -- 2024.
 83 f.

 Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de
 Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias
 Aplicadas a Animais de Interesse Regional, 2024.
 “Orientador: Prof. Dr. Airton Mendes Conde Júnior.”

 1. Alterações microestruturais. 2. Glândulas salivares. 3.
 Leishmania infantum. I. Conde Júnior, Airton Mendes. II. Título.

CDD 616.9364

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

CLARISSE MARIA BARBOSA FONSECA

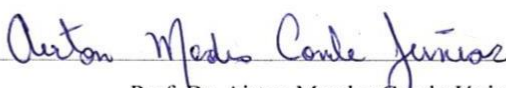
INFECÇÃO POR *Leishmania infantum* ALTERA A HISTOARQUITETURA E A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS NAS GLÂNDULAS SALIVARES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional da Universidade Federal do Piauí, na área de concentração Diagnósticos Avançados em Medicina Veterinária e linha de pesquisa Biotecnologia celular e aplicabilidades, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Airton Mendes Conde Júnior

Aprovada em 16/02/2024

Banca examinadora:



Prof. Dr. Airton Mendes Conde Júnior
(Presidente / Orientador) / DMOR/ CCS / UFPI



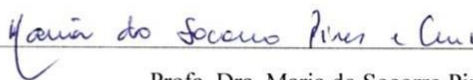
Profa. Dra. Karinn de Araújo Soares
(Examinadora interna) / DMOR/ CCS / UFPI



Profa. Dra. Zulmira Lucia Oliveira Monte
(Examinadora externa) / DMOR/ CCS / UFPI



Prof. Dr. Weber Leal de Moura
(Examinador externo) / DMOR/ CCS / UFPI



Profa. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz
(Examinadora interna) / DMV/ CCA / UFPI

AGRADECIMENTOS

Tudo que vivi até hoje não teria sentido se não fosse por Deus, por isso, meu primeiro agradecimento é a Ele, que guia os meus passos e me confere sabedoria e paciência para não desistir.

O meu segundo agradecimento é dirigido aos meus pais, Cosme Campelo da Fonseca e Lenisa Maria de Sousa Barbosa Fonseca, por serem meus maiores incentivadores e apoiadores. Em seguida, mas não menos importante, agradeço também a minha avó Hermelinda Maria de Jesus, a minha irmã, Lorena Maria Barbosa Fonseca, minha afilhada, Anthonela Maria Barbosa Soares, meu sobrinho, Murilo Barbosa Soares e meu cunhado Hiago Soares. Eles me deram força para superar as dificuldades, manter o equilíbrio e seguir em frente, mesmo quando parecia impossível. Eles fazem tudo valer a pena.

Ao professor Dr. Aírton Mendes Conde Júnior, minha gratidão. Foram 8 anos convivendo no mundo acadêmico onde tanto me ensinou sobre pesquisa e docência, como também sobre a vida. Obrigada pelas conversas, conselhos, puxões de orelhas e por sua amizade.

Aos amigos do Laboratório: Ingrid Farias, João Victor, Alexandra Cajado e Sérgio Paulo Guerra, obrigada pelas nossas conversas descontraídas, pela ajuda e pela amizade que fizeram e fazem a diferença.

Agradeço também à Amanda Moraes, ao Jonatas Paulino, ao João Gabriel, ao Lucas, ao Guilherme Thierre e à Rita de Cássia pela ajuda no delineamento experimental, no cuidado e no manejo dos animais e nas técnicas realizadas posteriormente.

Aos professores Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho e Dr. Michel Muálem de Moraes Alves pela parceria e ajuda com a infecção dos animais.

Em nome da Maria Júlia agradeço ao laboratório Citolab pelo serviço prestado na realização de técnica para conclusão desta pesquisa.

À professora Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz por permitir a realização de técnicas necessárias para a conclusão desta pesquisa.

Ao Felipe de Alcântara, técnico da UFPI, pela ajuda e paciência com a realização dos procedimentos no laboratório de biologia molecular.

Ao Gabriel Martins pela ajuda na finalização desta pesquisa.

À tia Sandra Lemos pela ajuda na finalização da tese.

Aos professores, técnicos e terceirizados do Departamento de Morfologia da UFPI pela convivência diária e leve.

Aos meus amigos pela torcida e pelos momentos de descontração que foram essenciais durante toda a caminhada.

À Capes pela bolsa de doutorado que ajudou na realização deste projeto e ao CNPQ.

À Universidade Federal do Piauí pela infraestrutura física e pessoal que possibilitou a execução dos experimentos.

Agradeço também à banca por se disponibilizar a participar e repassar todas as contribuições e sugestões para o engrandecimento desta pesquisa.

Peço desculpas se esqueci de citar alguém, nesta fase são muitas emoções! Assim, meus sinceros agradecimentos a todos que me ajudaram de alguma forma

“Pessoas importantes marcam a nossa vida... pelos gestos, pelos sentimentos, pelos ideais, pelos momentos, pelo que fazem, pelo que sentem, pelo que nos ensinam, pelo que nos deixam de si...” (Desconhecido). E cada uma delas deixou algo na minha formação pessoal e profissional.

Muito obrigada!

**“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo.
Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós
ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos
sempre.”**

Paulo Freire

RESUMO

A leishmaniose visceral é um grave problema de saúde pública que, anualmente, faz milhares de vítimas no mundo inteiro. Provoca uma infecção sistêmica capaz de atingir qualquer órgão devido à intensa propagação das células contaminadas por meio da corrente sanguínea. A confirmação do DNA de *Leishmania sp.* na saliva favorece o interesse de pesquisas sobre os efeitos da infecção provocada pelo parasito nas glândulas salivares. Mesmo com os intensos avanços, o conhecimento das alterações estruturais causada pela infecção por *Leishmania infantum* nas glândulas salivares ainda é escasso. Por isso, o objetivo dessa pesquisa foi identificar alterações estruturais nas glândulas salivares de camundongos BALB/c infectados experimentalmente com *L. infantum*. A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo nº 719/2022). Foram usados 24 camundongos BALB/c machos, divididos randomicamente em dois grupos, com 12 animais cada. No grupo experimental em cada camundongo foi inoculado 76µL, via intraperitoneal, com 1×10^6 promastigotas metacíclicas de *L. infantum* em Solução Salina Tamponada Fosfato (PBS). Em cada animal do grupo controle, para simular a mesma situação de estresse, foi administrado 50µL de PBS. Aos 7 e 50 dias de infecção, 6 animais de cada grupo foram eutanasiados para a coleta das amostras. Coletaram-se as glândulas salivares que foram, em seguida, submersas em solução de formaldeído 10% tamponado para fixação. Essas amostras foram processadas histologicamente e coradas com hematoxilina e eosina. O fígado e o baço também foram removidos, fixados, processados e corados histologicamente para confirmar a infecção. As lâminas contendo tecido salivar foram analisadas qualitativamente e quantitativamente, por meio da histomorfometria. Os dados foram tabulados e analisados estatisticamente. As amostras glandulares também foram analisadas através da técnica de imuno-histoquímica, usando anticorpos anti-Ki-67 e anti-Bcl-2. Além disso, as glândulas salivares foram submetidas à extração de DNA e à técnica de Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (RT-PCR). O modelo proposto no desenvolvimento da infecção foi eficaz, observando a presença de formas amastigotas da *L. infantum* e alterações histopatológicas no fígado e no baço. As glândulas salivares apresentaram alterações microestruturais após a infecção experimental. Aos 7 dias de infecção, foram identificados hiperemia, vacuolização citoplasmática, hipercelularidade de células acinares e ductais e alterações no tamanho dos ácinos. Aos 50 dias de infecção, o tecido salivar apresentou perda da homogeneidade tecidual, regiões com intensa desordem celular e vacuolização citoplasmática. A glândula sublingual, após a infecção, apresentou um crescimento expressivo do volume acinar confirmado pela histomorfometria. Além disso, houve alteração na expressão de Ki-67 e BCL-2 nas glândulas analisadas, com a intensa expressão de Ki-67 aos 7 dias de infecção e de Bcl-2 50 dias após a infecção. Não foi identificada a presença do DNA do parasito no tecido das glândulas analisadas. Portanto, a histoarquitetura das glândulas salivares é alterada após a infecção experimental por *L. infantum* e as mudanças ocorridas devem-se ao processo inflamatório sistêmico provocado pela infecção.

Palavras-chave: Alterações microestruturais. Glândulas salivares. *Leishmania infantum*.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a serious public health problem that claims thousands of victims worldwide every year. It causes a systemic infection capable of reaching any organ due to the intense spread of contaminated cells through the bloodstream. Confirmation of *Leishmania sp.* in saliva favors research interest into the effects of the infection caused by the parasite in the salivary glands. Even with intense advances, knowledge of the structural changes caused by *Leishmania infantum* infection in the salivary glands is still scarce. Therefore, the objective of this research was to identify structural changes in the salivary glands of BALB/c mice experimentally infected with *L. infantum*. The research was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (protocol nº 719/2022). 24 male BALB/c mice were used, randomly divided into two groups, with 12 animals each. In the experimental group, each mouse was inoculated 76µL, intraperitoneally, with 1×10^6 metacyclic promastigotes of *L. infantum* in Phosphate Buffered Saline Solution (PBS). To simulate the same stress situation, each animal in the control group was administered 50µL of PBS. At 7 and 50 days of infection, 6 animals from each group were euthanized for sample collection. The salivary glands were collected and then submerged in a 10% buffered formaldehyde solution for fixation. These samples were histologically processed and stained with hematoxylin and eosin. The liver and spleen were also removed, fixed, processed, and histologically stained to confirm infection. The slides containing salivary tissue were analyzed qualitatively and quantitatively, using histomorphometry. The data were tabulated and statistically analyzed. The glandular samples were also analyzed using the immunohistochemistry technique, using anti-Ki-67 and anti-Bcl-2 antibodies. Furthermore, the salivary glands were subjected to DNA extraction and the Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) technique. The proposed model in the development of the infection was effective, observing the presence of amastigote forms of *L. infantum* and histopathological changes in the liver and spleen. The salivary glands showed microstructural changes after experimental infection. At 7 days of infection, hyperemia, cytoplasmic vacuolization, hypercellularity of acinar and ductal cells and changes in the size of the acini were identified. At 50 days of infection, the salivary tissue showed loss of tissue homogeneity, regions with intense cellular disorder and cytoplasmic vacuolation. The sublingual gland, after infection, showed a significant growth in acinar volume confirmed by histomorphometry. Furthermore, there was a change in the expression of Ki-67 and BCL-2 in the glands analyzed, with intense expression of Ki-67 at 7 days of infection and of Bcl-2 50 days after infection. The presence of the parasite's DNA was not identified in the tissue of the glands analyzed. Therefore, the histoarchitecture of the salivary glands is altered after experimental infection by *L. infantum* and the changes that occur are due to the systemic inflammatory process caused by the infection.

Keywords: Microstructural changes. Salivary glands. *Leishmania infantum*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema representativo do ciclo biológico da <i>Leishmania sp.</i>	17
Figura 2- Esquema representativo do conceito lobular da histoarquitetura do fígado	21
Figura 3- Desenho esquemático da anatomia das glândulas salivares maiores em humano e camundongo.....	25
Figura 4- Desenho esquemático da organogênese das glândulas salivares maiores em camundongos.....	26
Figura 5- Desenho esquemático dos componentes celulares formadores da arquitetura microscópica da glândula salivar maior em humanos	28
Figura 6-Representação diagramática dos compartimentos celulares das glândulas salivares maiores em humanos	29
Figura 7- Representação esquemática do Delineamento experimental	37
Figura 8- Fotomicrografia do imprint de baço de camundongo BALB/c infectado 50 dias após a infecção experimental por <i>L. infantum</i>	42
Figura 9- Fotomicrografia dos fragmentos de fígado (A e B) e baço (C e D) de camundongos BALB/c infectados com 1×10^6 amastigotas de <i>Leishmania infantum</i> 7 dias (A e C) e 50 dias (B e D) após a infecção. HE. 200x.	44
Figura 10- Fotomicrografia de fragmentos de glândulas parótida, submandibular e sublingual de camundongos não infectados (A, B, C, G, H e I) e experimentalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> (D, E, F, J, K e L) 7 dias e 50 dias após a infecção. HE. 400x.....	46
Figura 11- Comparação dos parâmetros histomorfométricos dos ductos intralobulares das glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais dos grupos controle e experimental 7 e 50 dias após a infecção por <i>Leishmania infantum</i>	47
Figura 12- Comparação dos parâmetros histomorfométricos dos ácinos das glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais dos grupos controle e experiemntal 7 e 50 dias após a infecção por <i>Leishmania infantum</i>	48
Figura 13- Fotomicrografia da expressão de ki-67 e Bcl-2 em fragmentos de glândulas parótida, submandibular e sublingual de camundongos não infectados (A, A', B, B', C, C', G, G', H, H', I e I') e experimentalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> (D, D', E, E', F, F', J, J', K, K', L e L').....	50
Figura 14- Reprodução gráfica do status de amplificação por RT-PCR em amostras glandulares salivares de camundongos infectados experimentalmente por <i>Leishmania infantum</i>	51

LISTA DE SIGLAS

CB	Ligação de Coluna (do inglês column binding)
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
DAB	3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloreto
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DPP	Plataforma de caminho duplo (do inglês Dual-Path Platform)
ED11	Dia embrionário 11
ED12	Dia embrionário 12
ED12.5	Dia embrionário 12.5
ED13	Dia Embrionário 13
ED14-15	Dia embrionário 14-15
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
GC	Grupo controle
GC7	Grupo controle 7 dias
GC50	Grupo controle 50 dias
GE	Grupo experimental
GE7	Grupo experimental 7 dias
GE50	Grupo experimental 50 dias
HE	Hematoxilina e Eosina
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
IR	Remoção de inibidor (do inglês inhibitor removal)
LABCIM	Laboratório de Pesquisa em Ciências Morfológicas
LAMP	Amplificação Isotérmica mediada por Loop (do inglês Loop-mediated Isothermal Amplification)
LC	Leishmaniose Cutânea
LV	Leishmaniose Visceral
NK	Natural Killer
NPPM	Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais
NUPcelt	Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-tronco
OPAS/OMS	Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial de Saúde

OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Para Análise
PB	Polpa Branca
PBS	Salina Tamponada Fosfato (do inglês Phosphate Buffered Saline)
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase (do inglês Polymerase Chain Reaction)
PCVLV	Programa de Controle e Vigilância da Leishmaniose Visceral
PV	Polpa Vermelha
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RT	Temperatura ambiente (do inglês room temperature)
RT-PCR	Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (do inglês Real time Polymerase Chain Reaction)
SMF	Sistema Mononuclear Fagocitário
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Th1	Linfócitos T auxiliar tipo 1 (do inglês T helper-1)
Th2	Linfócitos T auxiliar tipo 2 (do inglês T helper-2)
TL	Lise Tecidual (do inglês Tissue Lysis)
UFPI	Universidade Federal do Piauí

LISTA DE SÍMBOLOS

® marca registrada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Leishmaniose visceral	15
2.2 Modelo murino na leishmaniose visceral experimental	19
2.3 Morfologia hepática	20
2.4 Histoarquitetura hepática e a infecção por <i>L. infantum</i>	22
2.5 Morfologia esplênica.....	23
2.6 Histoarquitetura esplênica e Leishmaniose visceral	23
2.7 Morfologia das glândulas salivares	24
2.8 A Leishmaniose visceral e as glândulas salivares.....	31
2.9 Ki-67: marcador de proliferação celular	32
2.10 Bcl-2: marcador de apoptose	33
3. JUSTIFICATIVA.....	34
4. OBJETIVOS	35
4.1 Objetivo geral.....	35
4.2 Objetivos específicos	35
5. METODOLOGIA	36
5.1 Aspectos éticos.....	36
5.2 Animais	36
5.3 Delineamento experimental.....	36
5.4 Coleta das amostras	37
5.5 Imprint do baço	37
5.6 Processamento histológico.....	38
5.7 Análise Histopatológica	39
5.8 Análise Histomorfométrica	39
5.9 Imuno-histoquímica.....	39
5.10 Extração de DNA e RT-PCR	40
5.11 Análise estatística	41
6. RESULTADOS.....	42
7. DISCUSSÃO	52
8. CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXO	72

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses correspondem a um grupo de doenças com ampla manifestação clínica causada pela *Leishmania sp.* (Conde *et al.*, 2022; OMS, 2023; Torres-Guerrero *et al.*, 2017). A forma visceral da doença, a Leishmaniose Visceral (LV), ganha destaque por ser a mais grave, além de ser considerada um preocupante problema de saúde pública, sendo incluída no grupo de Doenças Negligenciadas (Alvar *et al.*, 2012; Conde *et al.*, 2022; Debroy *et al.*, 2017; OMS, 2023; Taghipour *et al.*, 2021). Na América do Sul e Europa a espécie causadora dessa enfermidade é a *Leishmania infantum* (Baneth, Solano-Gallego, 2022; Marcili *et al.*, 2014; Marcondes; Rossi, 2013; Safavi, Eshagui, Hajihassani, 2021).

A transmissão natural acontece através do repasto de saliva realizado pelos flebotomíneos. No hospedeiro, as formas amastigotas migram para fígado, baço e medula óssea por meio das células fagocitárias mononucleares, provocando alterações histofisiológicas (Nieto *et al.*, 2011; OMS, 2023; Pérez-Cabezas *et al.*, 2019a). Embora esses órgãos sejam os órgãos mais afetados pela *L. infantum*, pesquisa aponta para identificação do parasito em qualquer órgão, tecido ou líquido do hospedeiro (Cantos-Barreda *et al.*, 2018a).

Roedores são comumente utilizados como modelos de pesquisa em LV e têm fornecido uma ampla base de conhecimento em relação à sua fisiologia e sua patogênese (Saini, Rai, 2020). O modelo murino tornou-se padrão em pesquisas de leishmaniose experimental e a busca por esses modelos tem contribuído com o conhecimento sobre o ciclo de vida do parasito, o processo de infecção e com inúmeras descobertas para entender a relação hospedeiro-parasito (Correa *et al.*, 2017; Figueiredo *et al.*, 2017; Saini, Rai 2020). Por isso, algumas características são importantes na escolha de um modelo que mimetize os sinais clínicos da doença em humanos, mas também que admitem o desenvolvimento da infecção experimental como: o local de inoculação, o tamanho do inóculo, as características genéticas do animal (Pereira, Alves, 2008; Zulfiqar, Avery, 2022).

As glândulas salivares, por sua vez, compreendem um conjunto de estruturas glandulares maiores e menores com características histológicas e fisiológicas específicas que convergem para a síntese de um produto final, a saliva (Chibly *et al.*, 2022; Paula *et al.*, 2017; Roblegg, Coughran, Sirjani, 2019). Esta tem função antimicrobiana, lubrificante, digestiva, além de promover a manutenção do pH neutro da cavidade oral (Gomi *et al.*, 2017; Holmberg, Hoffman, 2014; Roblegg, Coughran, Sirjani, 2019). A saliva tem ganhado destaque no diagnóstico da LV em cães como uma alternativa não invasiva, visto que foi possível encontrar traços do parasito nessa secreção (Cantos-Barreda *et al.*, 2018a, Cantos-Barreda *et al.*, 2018b, Cantos-Barreda *et al.*, 2017, Cantos-Barreda *et al.*, 2020; Pandey *et al.*, 2018). Apesar dos

avanços, pouco se sabe sobre as alterações estruturais provocadas pelo parasito sobre as glândulas salivares e de que forma pode afetar na sua funcionalidade. Portanto, esta pesquisa tem o objetivo de identificar as alterações microestruturais das glândulas salivares de camundongos BALB/c infectados experimentalmente com *Leishmania infantum*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença de curso crônico que está em 9º lugar entre as doenças infecciosas mais negligenciadas (OMS, 2023). Esse grave problema de saúde atinge 98 países, com a ocorrência de 90% dos casos no Brasil, Índia, Sudão, Sudão do Sul, Bangladesh e Etiópia (Alvar *et al.*, 2012; OMS, 2023). Estima-se que ocorram a cada ano 50 a 90 mil novos casos, embora apenas 25 a 45% dos casos sejam notificados (Forrester *et al.* 2022; Rocha, Pereira, Maia, 2022, OMS, 2023).

Os dados do último relatório realizado pela Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial de Saúde (OPAS/OMS) revelam redução na incidência da doença no Brasil quando comparado a 2020 (OPAS/OMS, 2022). O país ainda é responsável por 93,5% dos casos de LV nas Américas (OPAS/OMS, 2022). A doença acomete todas as faixas etárias, mas em áreas endêmicas, crianças e idosos são comumente os mais afetados devido à imaturidade ou insuficiência relativa da imunidade celular que apresentam (OPAS/OMS, 2022). O aumento do número de casos também é expressivo em países não endêmicos, o que pode ser explicado pelo aumento no número de viagens e pela migração (Rocha, Pereira, Maia, 2022) A desnutrição e as doenças oportunistas, como a Aids, promovem uma disfunção imunológica nos indivíduos que, em consonância com essa situação de imaturidade, apresentam uma predisposição maior para o desenvolvimento do quadro clínico da infecção (Kushwaha, Kair, 2021; Lima *et al.*, 2017; Malafaia, 2008; Rocha, Pereira, Maia, 2022; Scarpani *et al.*, 2022; Wilhelm, 2019).

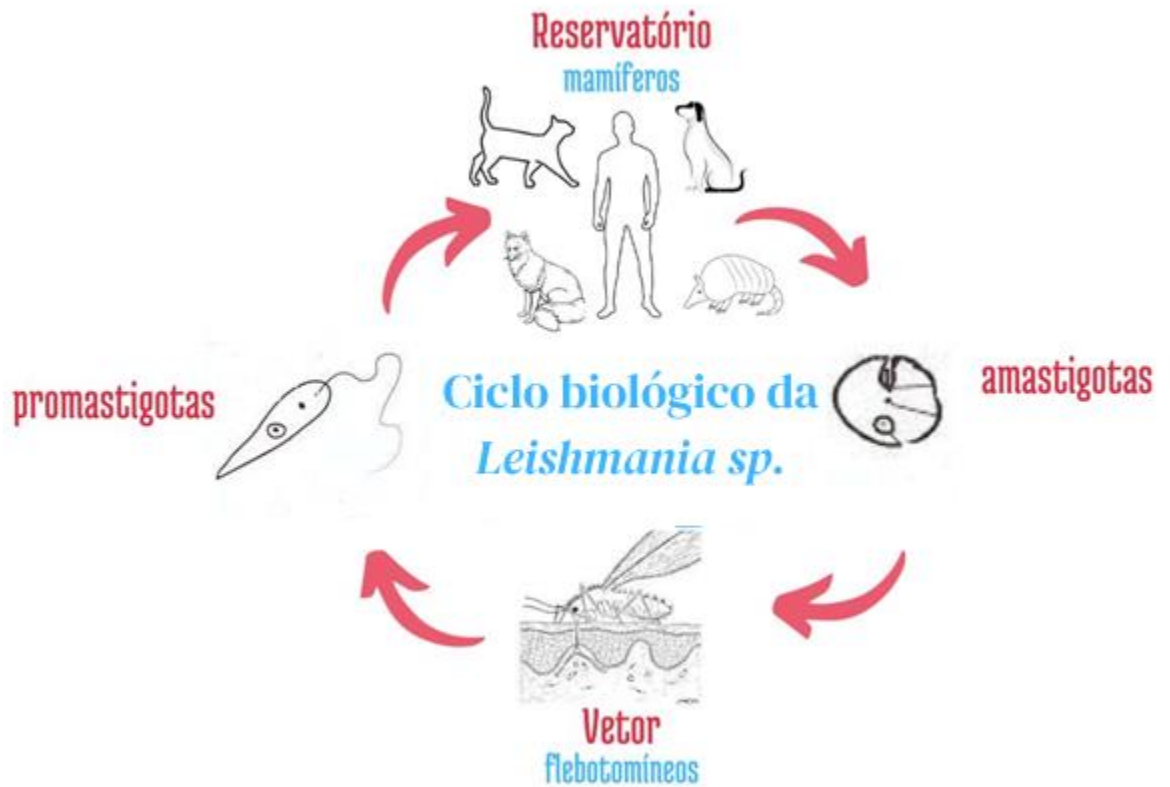
No Brasil, esta parasitose apresentava características tipicamente rurais, mas as transformações ambientais, associadas aos movimentos migratórios e à urbanização têm contribuído para o surgimento da doença na zona urbana (Abrantes *et al.*, 2018; Scarpani *et al.*, 2022; Werneck, 2010). Tais mudanças levaram à expansão e à adaptação dos flebotomíneos, vetor da leishmaniose, a outros ambientes e infectando outros animais como os cães, que se tornaram um dos principais reservatórios do parasito (Andre, 2013; Scarpani *et al.*, 2022; Safavi, Eshaghi, Hajihassani, 2021). Logo, medidas de controle foram estabelecidas para conter a infecção no meio urbano como a eutanásia dos animais soropositivos (Dantas-Torres *et al.*, 2019a; Dantas-Torres *et al.*, 2019b). Entretanto, Ribas *et al.* (2013) demonstraram através de um modelo matemático que tal procedimento não é a forma mais eficaz de controle da LV nesses animais e a combinação de coleiras impregnadas de inseticidas e o controle vetorial têm

um impacto mais significativo na redução da disseminação do parasito (Dantas-Torres *et al.*, 2019b; Galvéz *et al.*, 2018).

A infecção apresenta uma distribuição geográfica peculiar envolvendo mais de 10 espécies, apresentando pelo menos uma por região (Akhoundi *et al.*, 2016; Segatto *et al.*, 2012). Nas Américas, a espécie prevalente é a *Leishmania infantum*, transmitida pela picada de flebotomíneos, principalmente, da espécie *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), que se adapta facilmente ao peridomicílio e às variadas temperaturas, podendo ser encontrada no interior das residências e nos abrigos de animais domésticos (Andrade *et al.*, 2007; Brasil, 2014; Marcili *et al.*, 2014; Marcondes; Rossi, 2013; Scarpani *et al.*, 2022; Serafim, Iniguez, Oliveira, 2020).

Os parasitos causadores dessa infecção são considerados digenéticos, pois apresentam dois estágios em diferentes ambientes celulares durante seu ciclo de vida (Anversa *et al.*, 2018; Volpedo *et al.*, 2021). O estágio extracelular compreende a forma promastigota metacíclica e flagelada, encontrada na saliva dos insetos flebotomíneos fêmeas os quais durante o repasto da saliva injetam as formas contaminadoras (Mccarrthy *et al.*, 2013; Scarpani *et al.*, 2022;). Na epiderme do hospedeiro, as promastigotas são fagocitadas por células do Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF), que sofrem alterações bioquímicas e morfológicas, diferenciando-se em amastigotas, forma replicativa e não flagelada (Anversa *et al.*, 2018; Scarpani *et al.*, 2022; Sasidharan, Saudagar, 2021; Serafim, Iniguez, Oliveira, 2020; Volpedo *et al.*, 2021). Essas multiplicam-se por divisão binária até o rompimento das células mononucleares, ocorrendo a liberação das amastigotas que serão fagocitadas por novas células do SMF em um processo contínuo, ocorrendo então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do SMF, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (Figura 1) (Rani *et al.*, 2021; Scarpani *et al.*, 2022; Serafim, Iniguez, Oliveira, 2020).

Figura 1- Esquema representativo do ciclo biológico da *Leishmania sp.*



Fonte: Dados da pesquisa, 2024

Dependendo da forma de transmissão, há dois tipos de LV: a zoonótica e a antroponótica. A forma zoonótica é considerada a forma de transmissão natural, a qual possui como reservatórios para a transferência dos parasitos (Sasidharan, Saudagar, 2021), cães (Esch, Peterson, 2013), gatos (Berenguer *et al.*, 2021) e animais silvestres (Da Costa *et al.*, 2015). Na forma antroponótica, a transmissão pelos flebotomíneos ainda é a forma mais comum de transmissão entre os humanos (Van-Grienvén, Diro, 2012).

A sintomatologia da LV apresenta-se diferenciada em cada indivíduo e é letal se não for tratada em mais 95% dos casos (Cota *et al.*, 2021, OMS, 2023; Scarpani *et al.*, 2022; Sasidharan, Saudagar, 2021; Van-Grienvén, Diro, 2012). A fase inicial ou fase aguda pode apresentar febre irregular e persistente, palidez muco-cutânea e hepatoesplenomegalia (Rocha, Pereira, Maia, 2022; Sasidharan, Saudagar, 2021). Alguns organismos, durante a fase inicial, podem manifestar um quadro clínico discreto que evolui para a cura espontânea, forma

oligossintomática e, em outras situações, podem não apresentar os sintomas característicos, forma assintomática (Brasil, 2014; Nieto *et al.*, 2011). A doença, em alguns casos, pode evoluir para fase crônica com sintomas persistentes, como febre irregular, icterícia, desnutrição e edemas no fígado e no baço. Nos canídeos, as manifestações clínicas mais frequentes incluem lesões dermatológicas, emaciação, dificuldade locomotora e aumento do volume do baço (Rocha, Pereira, Maia, 2022; Scarpani *et al.*, 2022).

As infecções causadas por protozoários geralmente têm o seu desfecho em uma parcela dos indivíduos infectados, indicando que o sistema imune não permite, na maioria das vezes, a multiplicação em grande escala dos parasitos e a disseminação da infecção (Volpedo *et al.*, 2021; Wilhelm, 2019). Isto também se deve à grande variedade estrutural entre as espécies que conseguem ativar diferentes respostas imunes específicas do hospedeiro (Nieto *et al.*, 2011; Volpedo *et al.*, 2021).

A LV promove um meio rico de atividade imunológica com a presença de citocinas pró e anti-inflamatórias que modulam as respostas das células imunes (Gurung, Kanneganti, 2015; Rossi, Fasel, 2018; Volpedo *et al.*, 2021). Essas respostas orquestram o desenvolvimento da imunidade inata e adaptativa contra o *Leishmania sp.* (Volpedo *et al.*, 2021). Durante os estágios iniciais, a liberação de Interleucina (IL) - 1 induz a resposta das células T auxiliar (Th) 1. Durante os últimos estágios da infecção, a resposta mediada pela IL-1 induz a expansão das células T auxiliar (Th) 2. Estas produzem IL-4 e IL-10 que estão associadas à progressão da doença. A regulação da produção dessas citocinas contribui com a intensidade e a qualidade da resposta imune e o desfecho da doença (Rossi, Fasel, 2018).

Por ser uma doença de notificação compulsória e com características clínicas de evolução grave, o diagnóstico da LV deve ser feito de forma precisa e precoce (Erber *et al.*, 2022). A avaliação diagnóstica da LV envolve uma abordagem integrada de dados clínicos e patológicos, pois a presença dos sinais clínicos é um importante requisito que facilita na identificação do infectado, além da utilização de testes específicos (Erber *et al.*, 2022; Scarpani *et al.*, 2022; Wilhelm, 2019).

Testes parasitológicos, moleculares e sorológicos formam numerosas ferramentas que se complementam na obtenção dos resultados acurados para confirmação da LV (Erber *et al.*, 2022; Scarpani *et al.*, 2022). As técnicas mais úteis de investigação incluem a detecção de anticorpos por métodos sorológicos e a demonstração do DNA nos tecidos através de técnicas moleculares (Brasil, 2014; Erber *et al.*, 2022). O Programa de Controle e Vigilância da

Leishmaniose Visceral (PCVLV) recomendada a utilização de um teste rápido imunocromatográfico, compreendendo os antígenos recombinantes rK26 e rK39, o teste DPP (Plataforma de caminho duplo/Dual-Path Plataform; Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), para a triagem de cães infectados, e Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) para confirmar os resultados positivos (Brasil, 2011). Altos níveis de anticorpos podem ser indicativo para a confirmação da infecção. Entretanto, quando os valores de anticorpos estão baixos é necessário a utilização de outros métodos, como Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) (Brasil, 2014). A Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (RT-PCR) também tem se destacado devido a sua alta sensibilidade e especificidade (Scarpani *et al.*, 2022; Wilhelm, 2019). Outro método molecular promissor para o diagnóstico de LV é a Amplificação Isotérmica mediada por Loop (LAMP) que usa uma polimerase e normalmente quatro primers para amplificar seis regiões-alvo em condições isotérmicas com alta especificidade. Possui como vantagens o uso de amostras menos invasivas, além da robustez e amplificação isotérmica (Erber *et al.*, 2022).

2.2 Modelo murino na leishmaniose visceral experimental

Os modelos experimentais usando animais são importantes ferramentas para o conhecimento da patogenia da LV, pois é possível realizar procedimentos invasivos para a obtenção e análise de tecidos infectados (Pérez-Cabezas *et al.*, 2019a; Porrozzi, Cavalcanti, Cupoillo, 2014; Soto *et al.*, 2020). O principal pré-requisito para a escolha de um modelo animal aplicado ao estudo da LV é a correspondência com a fisiologia humana (Jimenez-Anton *et al.* 2019). Os modelos murinos têm sido largamente utilizados com a finalidade de conhecer o ciclo de vida do protozoário, a duração da infecção e a relação hospedeiro-parasito (Pérez-Cabezas *et al.*, 2019a; Tavares, Santarém, Cordeiro-da-Silva, 2019). Essas medidas também tem se tornado de fundamental importância para entender e esclarecer pontos que levem a estratégias de controle da parasitose, como a imunoterapia e a vacinação (Loría-Cervera, Andrade-Narváez, 2014; Martins *et al.*, 2022, Soto *et al.*, 2020).

O ponto de partida para a escolha do modelo adequado ocorreu com a adoção do modelo murino para Leishmaniose Visceral provocada pela espécie *Leishmania major* e com estabelecimento dos modelos de resistência e suscetibilidade (Natale, Seixas, De Almeida, 2016; Sacks, Noben-Trauth, 2002). Porém, os exemplares biológicos para a LV tornavam-se difíceis, pois não reproduziam com precisão o observado em hospedeiros mamíferos e

necessitavam de otimizações para se tornarem um modelo que mimetizasse os sinais clínicos da doença em humanos (Melby *et al.*, 2001; Nieto *et al.* 2011; Saini, Rai, 2020).

Atualmente, utilizam-se dois principais modelos murinos experimentais para indução da LV (Nieto *et al.*, 2011; Pérez-Cabezas *et al.*, 2019a). O Hamster sírio (*Mesocricetus auratus*) é tido como ótimo modelo para a descrição da doença, pois consegue mimetizar os sinais clínicos da doença humana e canina, muitas vezes levando até a morte (Jimenez-Anton *et al.*, 2019). Nesse modelo, a inoculação das promastigotas ocorre, principalmente, pelas vias intracardiaca e intraperitoneal (Nieto *et al.*, 2011).

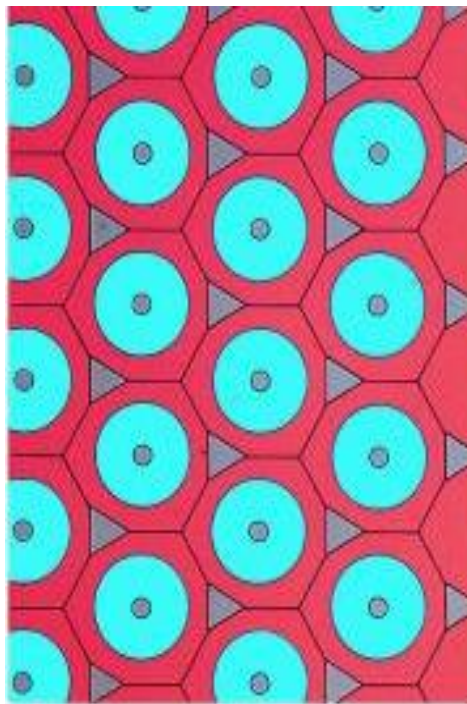
O outro modelo é o camundongo BALB/c, sendo a espécie mais manuseada em pesquisa e considerado o melhor modelo animal para o desenvolvimento da LV devido à facilidade em ser manipulada, à suscetibilidade ao parasito e à sua uniformidade genética, permitindo o uso de menos animais (Cárrion *et al.*, 2006; Porrozzi, Cavalcanti, Cupoillo, 2014). Para induzir a infecção, o tamanho do inóculo e a via de inoculação são fatores importantes que influenciam no desenvolvimento desse processo infeccioso (Nieto *et al.*, 2011). Geralmente nesse modelo são utilizadas altas doses do parasito e a inoculação ocorre pela via intravenosa ou pela via intraperitoneal (Leclercq *et al.*, 1996; Pérez-Cabezas *et al.*, 2019a; Porrozzi, Cavalcanti, Cupoillo, 2014; Rolão, Melo, Campino, 2004). A maior dispersão de parasitos nos tecidos acontece pela via intravenosa, mas a via intraperitoneal resulta em uma maior homogeneidade da infecção (Rolão, Melo, Campino, 2004). A via subcutânea e a via intradérmica mimetizam as vias naturais de infecção, porém requerem altíssimas doses de parasitos para causar uma infecção eficaz e persistente (Loeuillet, Bañuls, Hide, 2016).

2.3 Morfologia hepática

O fígado é a maior órgão interno dos mamíferos e está incluído, assim como as glândulas salivares, no grupo de órgãos associados ao sistema digestório. Ele atua como glândula exócrina, liberando secreções, e endócrina, excretando substâncias no sangue e no sistema linfático (Guyton, Hall, 2017). Além disso, o fígado é essencial no metabolismo de macronutrientes, é responsável pela transformação e excreção de drogas, hormônios e outras substâncias, funciona como reservatório de sangue, opera como órgão regulador da hemostasia, armazena vitaminas e ferro como ferritina e auxilia o sistema imune (Guyton, Hall, 2017; Racanelli, Rehmann, 2006; Trefts, Gannon, Wasserman, 2017).

O fígado é um órgão parenquimatoso que está revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo. Esse órgão pode apresentar algumas variações anatômicas entre as espécies de mamíferos, mas essas diferenças podem estar relacionadas às características de cada animal (Kruepunga *et al.*, 2019). A histoarquitetura hepática, atualmente, é melhor representada pelo conceito lobular clássico (Figura 2) (Kruepunga *et al.*, 2019; Wagenaar *et al.* 1994). Neste modelo o lóbulo hepático é construído em torno da veia central que é circundado por várias placas de hepatócitos, vasos sanguíneos, sistema coletor da bile, sistema de fluxo linfático, espaço de Disse e os ramos da veia porta delimitam a periferia do lóbulo (figura 2) (Kruepunga *et al.*, 2019; Trefts, Gannon, Wasserman, 2017).

Figura 2- Esquema representativo do conceito lobular da histoarquitetura do fígado



Fonte: Kruepunga *et al.*, 2019 (adaptado)

O parênquima hepático é formado por vários tipos celulares que incluem: hepatócitos, colangiócitos, células de Kupffer e células endoteliais sinusoidais. Cada uma delas apresenta funções únicas que cooperam para a homeostasia da função hepática. Os hepatócitos compreendem a maior população de células do fígado, seguida pelos colangiócitos, cuja função é revestir o lúmen dos ductos biliares. As células de Kupffer são macrófagos residentes do fígado e atuam no reconhecimento de estímulos patogênicos, enquanto as células endoteliais sinusoidais contribuem para a troca de constituintes entre o sangue e as células hepáticas (Trefts, Gannon, Wasserman, 2017).

2.4 Histoarquitetura hepática e a infecção por *L. infantum*

O fígado exerce papel imunológico e por isso contribui com o desenvolvimento de respostas imunes (Nakagaki *et al.*, 2018). Na infecção por *L. infantum*, esse é um dos órgãos mais estudados na dinâmica do processo infeccioso (Lima *et al.*, 2019; Modabberi *et al.*, 2021; Nieto *et al.*, 2011; Pérez-Cabezas *et al.*, 2019a). Após a infecção, o tecido hepático apresenta alterações que podem provocar mudanças histofisiológicas importantes e que impactam na homeostasia do organismo. As alterações microestruturais hepáticas são caracterizadas por inflamações granulomatosas, hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer e infiltrado inflamatório, as quais podem apresentar-se mais expressivas em indivíduos com infecção sintomática ativa (Lima *et al.*, 2019; Nieto *et al.*, 2011; Silva, 2007).

Um importante sinal clínico observado nos hospedeiros é o aumento volumétrico do fígado. Nieto *et al.* (2011) observaram que a hepatomegalia em BALB/c é identificada após duas semanas de infecção e persiste até 8 semanas. De acordo com esses autores, também há uma correlação importante entre o aumento do peso do fígado e os infiltrados granulomatosos, característicos da infecção.

Esses infiltrados granulomatosos são importantes alterações histopatológicas, cuja função é o controle da infecção (Kaye; Beattie, 2016). O desenvolvimento dos granulomas é resultado de uma sequência de eventos imunológicos provocados pela entrada do parasito. Os granulomas variam desde estruturas compostas por células de Kupffer, e às vezes parasitadas, além de linfócitos e plasmócitos, com baixo grau de organização, até estruturas compostas por células de Kupffer organizadas de maneira concêntrica, rodeadas por linfócitos e raros plasmócitos (Lima *et al.*, 2019).

No tecido hepático as células de Kupffer atuam na formação dos granulomas através da liberação de quimiocinas, cujo objetivo é o recrutamento de células imunes para iniciar a defesa do hospedeiro (Kaye; Beattie, 2016; Poulaki, Piperaki, Voulgarelis, 2021). O parasito pode usar essa resposta para favorecer a sua sobrevivência, como observado em camundongos e cães (Lima *et al.*, 2019; Murray, 2001; Nieto *et al.*, 2011). Quando um granuloma é bem formado, a erradicação do parasito no fígado é eficaz (Kaye, Beattie, 2016; Salgueiro *et al.*, 2018). Após cerca de 8 semanas da infecção, em modelos experimentais, os granulomas envolvem e a resposta no fígado é controlada sem alterar a histoarquitetura hepática (Murray, 2001; Nieto *et al.*, 2011). Essa resolução pode indicar que a disseminação para o baço ocorreu antes da formação do granuloma.

2.5 Morfologia esplênica

O baço é o maior órgão imunológico secundário, e por não possuir vasos linfáticos aferente, inicia respostas imunológicas a antígenos transmitidos pelo sangue (Cesta, 2006; Lewis, Williams, Eisenbarth, 2019). A morfologia esplênica é variável quanto à espécie e à idade (Cesta, 2006). Ele é um órgão parenquimatoso revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso que emite trabéculas que adentram ao parênquima esplênico levando consigo vasos sanguíneos e linfáticos (Cesta, 2006). As funções esplênicas são definidas pela constituição histológica. A histoarquitetura esplênica é apresentada em dois compartimentos: a polpa branca e a polpa vermelha. Elas são separadas pela zona marginal, no camundongo, e pela zona perifolicular, nos seres humanos (Lewis, Williams, Eisenbarth, 2019).

A polpa vermelha tem a função de filtrar o sangue e remover materiais estranhos e eritrócitos danificados. Ela é formada por cordões esplênicos e seios venosos. Os cordões esplênicos são constituídos por fibras elásticas que ajudam na contração esplênica, células reticulares que oferecem sustentação e macrófagos associados que são fagocíticos e atuam na remoção de partículas indesejadas. Além disso, é possível encontrar células sanguíneas circulantes. Os seios venosos são encontrados ao longo de toda polpa vermelha e são revestidos por uma rede frouxa de células endoteliais (Lewis, Williams, Eisenbarth, 2019; Mebius, Kraal, 2005; Saito *et al.* 1988).

A polpa branca é formada pela zona perifolicular, folículos e a zona marginal. É o compartimento esplênico responsável pelo desenvolvimento de respostas imunes adaptativas. Logo, os seus principais constituintes celulares incluem: macrófagos, linfócitos, células dendríticas, plasmócitos e uma rede vascular semelhante ao da polpa vermelha. A zona perifolicular está dividida em externa e interna, as quais diferem quanto aos constituintes celulares, sendo difícil a diferenciação através da microscopia de luz. Os folículos são contínuos à zona perifolicular formado principalmente por células B. A zona marginal é uma região única do baço e tem papel importante no processamento dos antígenos (Cesta, 2006; Lewis, Williams, Eisenbarth, 2019; Mebius, Kraal, 2005; Saito *et al.* 1988).

2.6 Histoarquitetura esplênica e Leishmaniose visceral

O baço, de acordo com Modabberi *et al.* (2021), é considerado um dos órgãos que abrigam a *Leishmania sp.* na LV. O aumento desse órgão acompanha o crescimento do fígado. Como alterações esplênicas descritas no curso da LV tem-se: aumento do órgão, ruptura da

polpa branca, substituição da celularidade normal da polpa vermelha, desorganização celular e atrofia da polpa branca (Hermida *et al.*, 2018; Poulaki, Piperaki, Voulgarelis, 2021). Logo, estas mudanças impactam na função desempenhada pelo órgão e prejudicam a capacidade do hospedeiro de responder à infecção (Poulaki, Piperaki, Voulgarelis, 2021).

Hermida *et al.* (2018) propuseram uma classificação histológica do baço em mamíferos infectados por *Leishmania sp.* Os autores descreveram três estágios de desorganização do baço com base na ruptura da polpa branca. No estágio 1, definido como baço organizado, o órgão apresenta folículos linfóides e zona perifolicular bem definidos e folículos secundários contendo centros germinativos. No estágio subsequente, o baço apresenta histoarquitetura ligeiramente desorganizada caracterizada por alterações hiperplásicas que confundem os limites da polpa branca. E no último estágio, a microestrutura esplênica está moderada ou extensivamente desorganizada, não sendo possível a individualização dos limites da polpa branca e da polpa vermelha, além da ausência de distinção dos folículos linfóides.

Alterações semelhantes foram descritas na infecção experimental por *Leishmania martiniquensis* (Sukhumavasi *et al.*, 2021). Todas essas mudanças na histoarquitetura esplênica foram influenciadas pela ativação de uma cascata de citocinas que favorecem o estado inflamatório e o estabelecimento da infecção (Poulaki, Piperaki, Voulgarelis, 2021).

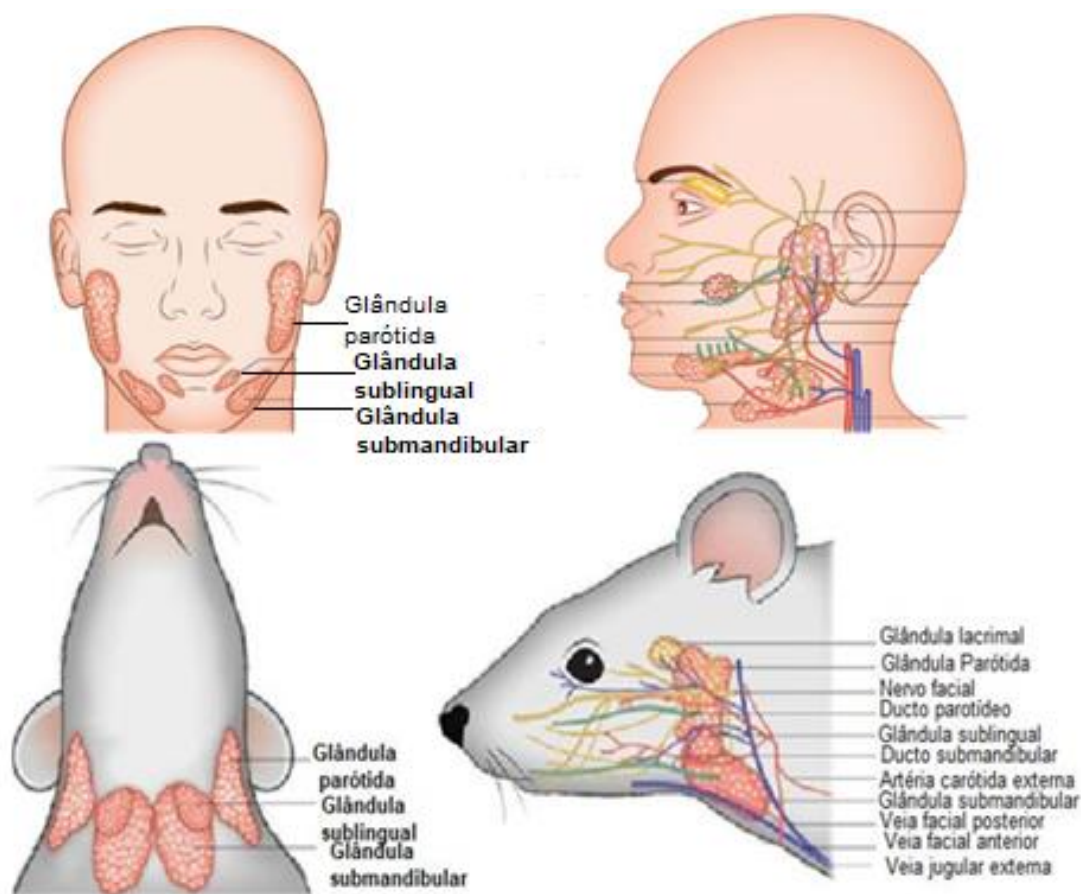
2.7 Morfologia das glândulas salivares

Glândulas salivares são órgãos bilaterais anexos ao sistema digestório. Elas possuem como principal função a secreção de saliva na cavidade oral (Chibly *et al.* 2022). A saliva é um fluido de natureza mista com funções de umidificação da boca e dos alimentos, lubrificação, facilitação da mastigação, da deglutição e da fonação, ajuste de pH, início da digestão dos carboidratos e propriedades antimicrobianas (Adnyane *et al.*, 2010; Chibly *et al.* 2022; Gomi *et al.*, 2017; Holmberg, Hoffman, 2014; Proctor; Shallan, 2021).

São classificadas anatomicamente em glândulas salivares maiores e menores (Suzuki, Ogata, Iwata, 2021). As glândulas salivares maiores, representadas pelas glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais, diferem em composição e quantidade secretada por cada tipo glandular e produzem cerca de 90% da saliva (Porcheri, Mitsiadis, 2019). A topografia dessas glândulas é estratégica e pode apresentar variações de acordo com a espécie, por exemplo, as glândulas submandibulares e sublinguais estão separadas no humano, enquanto no camundongo encontram-se juntas (Maruyama *et al.*, 2019) (Figura 3). Esses órgãos estão envolvidos por uma

cápsula de tecido conjuntivo que os individualizam das demais estruturas (Maruyama *et al.*, 2019) (Figura 3). Há, também, as glândulas salivares menores que não são encapsuladas e estão distribuídas por toda a cavidade oral e são denominadas de acordo com sua localização. Elas são responsáveis pela secreção mucosa da saliva que corresponde a cerca de 20% da produção (Jaeger, Freitas, 2016; Patel; Rebustini; Hoffman, 2006; Verstappen *et al.*, 2021).

Figura 3- Desenho esquemático da anatomia das glândulas salivares maiores em humano e camundongo

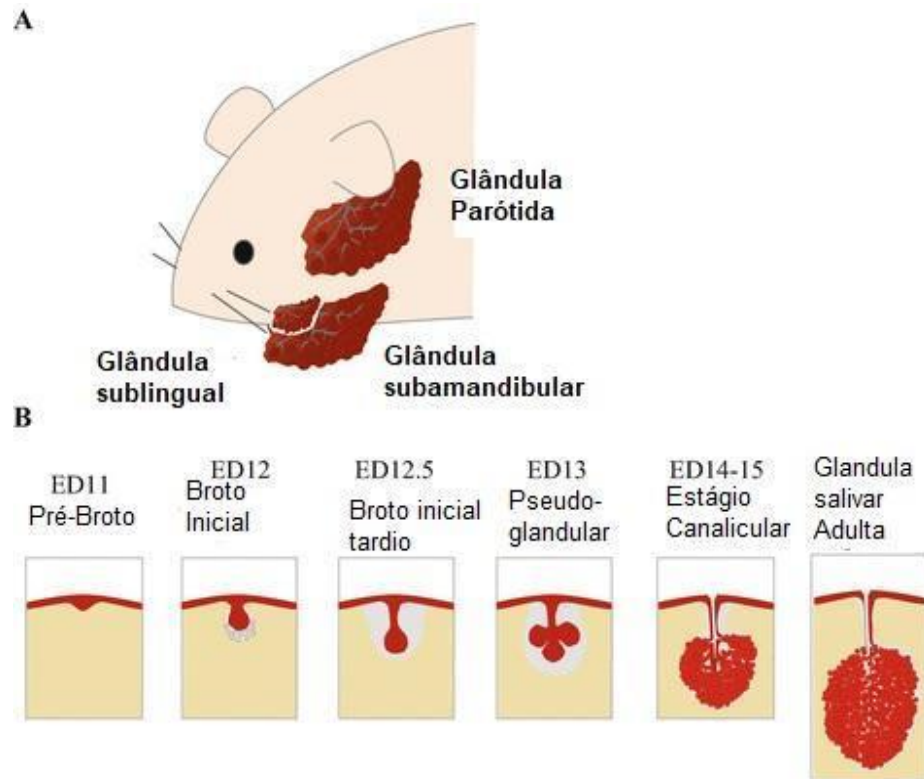


Fonte: Maruyama *et al.*, 2019 (adaptado)

A gênese desses órgãos inicia-se a partir da 6ª semana do desenvolvimento embrionário pela formação de brotos epiteliais através da morfogênese ramificada (Gaete *et al.*, 2022; Patel, Hoffman, 2014; Suzuki, Ogata, Iwata, 2021). Este é um processo organogênico complexo, coordenado pela expressão de vários genes e comum à formação de outros órgãos (Patel, Hoffman, 2014; Sakai, 2016). Tal procedimento compreende a interação epitélio-mesenquimal, divisão celular, formação de fissuras e produção da matriz extracelular (Patel, Hoffman, 2014; Pocheri, Mitsidiadis, 2019; Sakai, 2016, Suzuki, Ogata, Iwata, 2021). Estas etapas contribuem para o crescimento das estruturas epiteliais esféricas que futuramente irão formar as

terminações secretoras e o sistema de ductos (Hauser, Hoffman, 2015; Holmberg, Hoffman, 2014; Som, Miletich, 2015) (Figura 4).

Figura 4- Desenho esquemático da organogênese das glândulas salivares maiores em camundongos



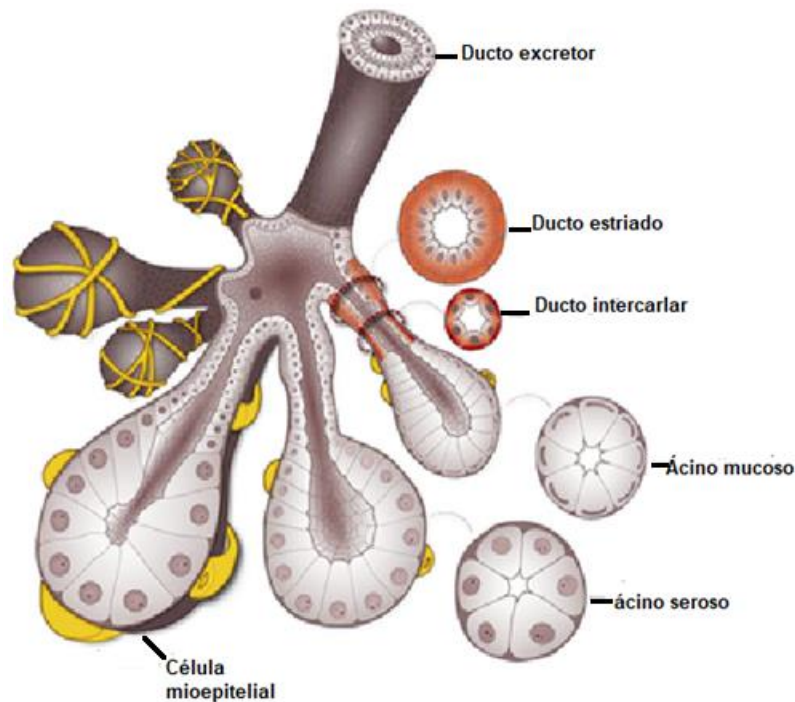
Fonte: Ogawa e Tsuji, 2017 (adaptado). (A) Desenho esquemático da topografia das glândulas salivares em camundongos. (B) Fases de desenvolvimento embrionário das glândulas salivares. Dia embrionário 11 (ED11), Dia embrionário 12 (ED12), Dia embrionário 12.5 (ED12.5), Dia Embrionário 13 (ED13), Dia embrionário 14-15 (ED14-15).

Os tecidos de suporte, estroma e cápsula de tecido conjuntivo, derivam de células da crista neural, enquanto que os tecidos secretores são originários da proliferação do epitélio oral e interação com o mesênquima (Som, Miletich, 2015). A assinatura morfológica e o tipo de secreção produzida por cada uma das glândulas salivares serão definidos pelas células mesenquimais e epiteliais e por genes que delineiam o tipo de ramificação (Som, Miletich, 2015).

O parênquima das glândulas salivares consiste em terminações secretoras, sistema de ductos ramificados e vasos e nervos que se arranjam em lóbulos e lobos separados por septos de tecido conjuntivo que se originam da cápsula rica em fibras colágenas (Chibly *et al.* 2022).

Os ácinos serosos e mucosos são células que formam as terminações secretoras e são diferenciadas pelo tipo de secreção produzida, arquitetura celular e os componentes intracelulares (Chibly *et al.* 2022; Paula *et al.*, 2017; Sisto, Ribatti, Lisi, 2019; Verstappen *et al.*, 2021) (Figura 5). A porção secretora acinosa serosa consiste em 8 a 12 células com formato piramidal, polarizadas, com núcleo esférico, normalmente centralizado (Chibly *et al.* 2022). O seu citoplasma é preenchido por grânulos de zimogênio basofílicos (Junqueira, Carneiro, 2017; Nanci, 2013). Os ácinos mucosos são terminações volumosas formadas por estruturas secretoras em forma de túbulo. Essas células apresentam núcleos planos deslocados em direção à superfície basal devido ao grande número de grânulos de mucina (Verstappen *et al.*, 2021). A presença desse componente confere à saliva as funções de lubrificação e formação de barreira protetora, além de fornecer caráter viscoso (Nanci, 2013; Paula *et al.*, 2017; Verstappen *et al.*, 2021).

Figura 5- Desenho esquemático dos componentes celulares formadores da arquitetura microscópica da glândula salivar maior em humanos



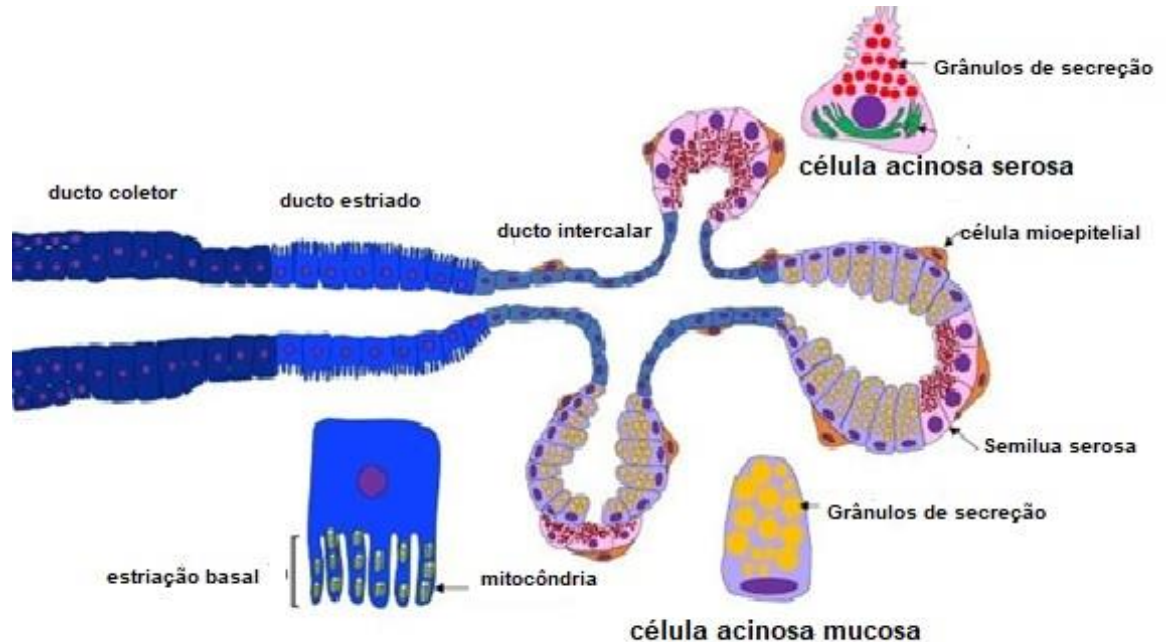
Fonte: Paula *et al.*, 2017 (adaptado)

O sistema de ductos é formado pelos ductos: intercalares, intralobular, lobular, intralobar, lobar e excretor (Igbokwe, 2018; Jaeger, Freitas, 2016, Suzuki, Ogata, Iwata, 2021). À medida que os ductos se afastam da unidade secretora final aumentam de diâmetro, estendendo-se até a cavidade oral e adicionam componentes necessários para a formação da saliva e o desenvolvimento de suas funções (Chibly *et al.*, 2022; Nanci, 2013). Os ductos também se diferenciam quanto às células que os revestem, variando de epitélio cuboide simples a epitélio colunar estratificado (Figura 5) (Jaerger; Freitas, 2016). Além da canalização da saliva para a boca, as células ductais também são responsáveis pela extração de sódio e pela adição de potássio à saliva, oligoelementos necessários para as funções antimicrobianas da saliva e para a prevenção da perda mineral dos tecidos duros dentais (Verstappen et al 2021; Vila *et al.*, 2019).

Além das células com função secretoras, há a presença de células mioepiteliais que estão localizadas justapostas aos ácinos e aos ductos (Figura 6). São células epiteliais que possuem característica contrátil. A contração destas células promove a propulsão da secreção, além de oferecer suporte aos ácinos, e ajudar na expulsão da saliva dos ductos, impedindo a sua hiperextensão (Chibly *et al.*, 2022; Jaerger; Freitas, 2016; Nanci, 2013). Foi demonstrado que

essas células podem exibir plasticidade induzida por lesão para regenerar as células acinares (Ninche, Kwan, Ghazizader, 2020).

Figura 6-Representação diagramática dos compartimentos celulares das glândulas salivares maiores em humanos.



Fonte: Suzuki, Ogata, Iwata, 2021 (adaptado)

As glândulas salivares também apresentam células imunes residentes, como macrófagos, células Natural Killer (NK), células T e células dendríticas (Huang, *et al.*, 2021). Essas são observadas mais atentamente quando há um aumento na sua população geralmente associado a algum estado patológico, como doenças ou infecções (Chibly *et al.*, 2022). Sabe-se que essas células imunes representam importante papel na manutenção da homeostasia e na função normal da glândula, mas ainda é pouco compreendida.

A composição e a secreção da saliva produzida pelas glândulas salivares dependem de um sistema neural eficiente. Esses órgãos são supridos por nervos autonossômicos simpáticos e parassimpáticos responsáveis por regular a excreção do fluido (Ferreira, Hoffman, 2013; Nanci, 2013; Proctor, Shalam, 2021). A via parassimpática, quando excitada por estímulos gustativos e táteis, é responsável pela dilatação dos vasos, produzindo uma saliva fluida e abundante (Ferreira, Hoffman, 2013). Em efeito antagonista, a via simpática tem efeito vasoconstritor gerando saliva viscosa e pouco abundante (Jaerger; Freitas, 2016; Junqueira,

Carneiro, 2017). Os nervos penetram nos lóbulos e emitem ramos que acompanham as unidades secretoras e o sistema de ductos (Jaerger, Freitas, 2016). A secreção da glândula parótida é fortemente influenciada pela mastigação, enquanto diferentes odores associados aos alimentos podem evocar a secreção das glândulas submandibulares e sublinguais (Proctor, Shalam, 2021).

Para a secreção rápida e continuada de saliva, as glândulas salivares necessitam de suprimento sanguíneo eficiente (Kwon *et al.*, 2017). A vascularização é capaz de aumentar em até 15 vezes a secreção salivar (Nanci, 2013; Paula *et al.*, 2017). As artérias ramificam-se e acompanham o sistema de ductos, enquanto o retorno venoso geralmente acompanha o trajeto arterial (Jaerger; Freitas, 2016).

A glândula parótida apresenta forma irregularmente triangular e está localizada próximo ao pavilhão auricular (Figura 3 e 4). Anatomicamente, na região dorsal encontra-se dividida em duas porções. Na região inferior da porção rostral parte o ducto parotídeo que cruza com o músculo masseter e abre-se na cavidade oral na posição oposta ao terceiro ou quinto molar, dependendo da espécie (Konig, Liebich, 2004; Maruyama *et al.*, 2019). Ela surge na 6ª semana, originária do revestimento ectodérmico oral (Sisto, Ribatti, Lisi, 2019). É uma glândula acinosa composta formada exclusivamente por células serosas. Estas células apresentam formato piramidal, com núcleo esférico e são facilmente identificadas pela basofilia citoplasmática (Suzuki, Ogata, Iwata, 2021) O seu citoplasma é preenchido por grânulos de secreção ricos em prolina, imunoglobulina A secretora, imunoglobulina G, imunoglobulina M e amilase, enzima responsável pela digestão de carboidratos (Junqueira, Carneiro, 2017; Maruyama *et al.*, 2019).

A glândula submandibular localiza-se próxima ao ângulo da mandíbula, possuindo como referências anatômicas topográficas o músculo digástrico e o linfonodo retrofaríngeo medial (Figura 3 e 4) (Gil *et al.*, 2018). Apresenta formato oval e é ligeiramente maior que a parótida (Konig, Libiech, 2004). A glândula submandibular surge a partir dos brotos do ectoderma no final da 6ª semana (Ogawa; Tsuji, 2017). É considerada uma glândula tubuloacinosa composta, pois apresenta os dois tipos de terminações secretoras, mas com a predominância de células serosas em seu parênquima (Maruyama *et al.*, 2019). Em camundongos, as glândulas submandibulares apresentam dimorfismo sexual. Em machos, entre os ductos intercalares e os ductos estriados, há um segmento de células exócrinas semelhantes a serosas que são maiores e mais numerosas no sexo masculino do que em fêmeas, as quais formam os ductos convolutos. Em fêmeas, há as células granulares de ductos intercalares encontradas somente neste grupo (Chibly *et al.* 2022; Maruyama *et al.*, 2019).

A glândula sublingual é a menor das três glândulas salivares maiores. (Park *et al.*, 2021). Nos camundongos, encontra-se na região subcutânea cervical frontal fundida anatomicamente à glândula submandibular (Maruyama *et al.*, 2019) (Figura 3). Essa glândula secreta mucina, responsável por cerca 5% do volume total da saliva (Ogle, 2021) e sua composição histológica é predominantemente formada por ácinos mucosos.

2.8 A Leishmaniose visceral e as glândulas salivares

A *L. infantum* tenha preferência por órgãos do SMF, qualquer outro órgão, tecido ou líquido pode ser afetado (Cantos-Barreda *et al.*, 2018a; Scarpani *et al.*, 2022). A ação imediata dos componentes celulares do SMF após a infecção e os mecanismos de escape imunoparasitários possibilitam a expansão e a presença do patógeno em outros órgãos (Pérez-Cabezas *et al.*, 2019b; Volpedo *et al.*, 2021). Estes mantêm formas parasitárias viáveis no interior das células de defesa que são utilizadas como veículos para infectar novas células espalhando-se por todo organismo (Bogdan, 2020; Silva *et al.*, 2014).

A busca pelo entendimento dos comportamentos de órgãos não considerados de tropismo é crescente. As glândulas exócrinas tem instigado este interesse, visto que, quando ocorre um desequilíbrio na microbiota ou uma situação de deficiência imunológica, o sistema de ductos glandulares pode servir como via de entrada para microrganismos que causam infecções (Boechat *et al.*, 2016; Conde-Júnior *et al.*, 2016; Fonseca *et al.*, 2021; Marsh; Martins, 2005). Por isso, a compreensão das alterações ocorridas nas glândulas salivares infectadas merece aprofundamento.

Várias pesquisas recentes têm utilizado a saliva de hospedeiros para o estabelecimento de uma alternativa não invasiva para o diagnóstico de LV (Cantos-Barreda *et al.*, 2017; Cantos-Barreda *et al.*, 2018a; Cantos-Barreda *et al.*, 2018b; Pandey *et al.*, 2018). A saliva produzida pelas glândulas salivares tem apresentado traços moleculares do parasito, indicando a possível presença deste na estrutura tecidual de seus órgãos produtores. Apesar dos avanços, as alterações microestruturais provocadas pelo parasito sobre as glândulas salivares e de que forma pode afetar na sua funcionalidade ainda permanecem pouco compreendidas.

Conde-Júnior *et al.* (2016) iniciaram a abordagem descrevendo as alterações na histoarquitetura e na proteômica das glândulas salivares de camundongos BALB/c infectados experimentalmente por *L. infantum*. Os resultados apresentados instigaram o conhecimento da patogenia da LV na glândula parótida de cães infectados naturalmente (Fonseca *et al.*, 2021).

Em ambos estudos foi possível a identificação de alterações teciduais, histomorfométricas e proteômicas das estruturas celulares nos órgãos analisados, favorecem os dados de suscetibilidade à infecção pelo parasito.

Nesses artigos não foi identificado a presença de amastigotas de *L. infantum*, mas alterações histopatológicas e histomorfométricas, como hipertrofia celular confirmada pela mensuração de ácinos e a degeneração de células epiteliais, são achados compartilhados por ambas as pesquisas, demonstrando as mudanças mais frequentes nesse quadro infeccioso, ainda que observados em diferentes espécies (Conde-Júnior *et al.*, 2016; Fonseca *et al.*, 2021).

2.9 Ki-67: marcador de proliferação celular

O anticorpo Ki-67 é um marcador imuno-histoquímico usado para avaliar a atividade proliferativa de células em tecidos (Mennon *et al.*, 2019). O antígeno nuclear é expresso durante todas as fases ativas do ciclo celular, exceto na fase G0 (repouso) (Sun; Kaufman, 2018; Uxa *et al.*, 2021). Uma variedade de células em diferentes tipos de tecidos pode expressá-lo, incluindo as células tumorais, sendo utilizado como marcador de referência para o diagnóstico de vários tipos de câncer (Dowsett *et al.* 2011; Pezzilli *et al.*, 2016).

O Ki-67 também pode ser usado para avaliar a proliferação celular em tecidos normais, como em estudos de desenvolvimento e regeneração tecidual ou em resposta inflamatória (Graefe *et al.*, 2019; Karlovits *et al.*, 2020; Vieira *et al.*, 2008). É importante ressaltar que a marcação do referido anticorpo não indica especificamente o tipo celular. Portanto, o resultado positivo para Ki-67 sugere que as células estão em uma fase ativa de divisão celular, independentemente do tipo celular em questão.

Esse marcador é amplamente utilizado em estudos de patologia para determinar o índice de proliferação celular em diferentes tecidos, incluindo as glândulas salivares (Ghanim; Younis, Metwaly, 2021; Minagi *et al.*, 2020). A marcação deste anticorpo em amostras de tecidos glandulares favorece a identificação e a quantificação de células que estão ativamente se dividindo (Bagulkar *et al.*, 2015; Mello-Gomes *et al.*, 2019; Minagi *et al.*, 2020).

Além disso, a marcação do Ki-67 também pode ser usada para avaliar a atividade proliferativa em casos de inflamação das glândulas salivares, como na síndrome de Sjögren, uma doença autoimune que afeta as glândulas salivares e lacrimais (Busamia *et al.*, 2011; Herrera-Esparza *et al.*, 2008). Ao realizar as análises em amostras de tecido inflamado, é possível identificar as células que estão em fase ativa de divisão celular, fornecendo

informações sobre a atividade proliferativa e a magnitude da resposta inflamatória, contribuindo para o entendimento da sua gravidade e auxílio no seu monitoramento (Minagi *et al.* 2020; Vieira *et al.*, 2008).

2.10 Bcl-2: marcador de apoptose

A apoptose ou morte celular programada é processo rigidamente controlado e que é responsável por manter a homeostasia da célula (Ashkenazi *et al.*, 2017; Cianciulli *et al.*, 2018). Esse acontecimento celular pode ser iniciado tanto de forma intrínseca quanto extrínseca, mas ambas as vias convergem para o resultado final, a morte da célula (Jin, El-Deiry, 2005). A família Bcl-2 codifica mais de 20 proteínas que regulam a via intrínseca da apoptose e são fundamentais para o equilíbrio entre sobrevivência e morte celular (Czabotar *et al.*, 2014). Em condições normais essa proteína ajuda a regular a sobrevivência das células, evitando a apoptose. No entanto, em certas situações, como no câncer, o aumento dos níveis de Bcl-2 pode levar à sobrevivência prolongada das células tumorais.

A proteína Bcl-2 pode ser encontrada em diferentes tipos de células em diversos tecidos do corpo. Sua expressão varia dependendo do contexto fisiológico ou patológico específico (Abdulhussain, 2022; Bechanbane *et al.*, 2022; Mello-Gomes *et al.*, 2019). Nas glândulas salivares a expressão dessa proteína está associada à regulação da sobrevivência celular e da apoptose (Mello-Gomes *et al.* 2019). A expressão alterada da proteína Bcl-2 pode influenciar o equilíbrio entre estes dois parâmetros. Em certas condições, como na síndrome de Sjögren, foi observado um aumento da expressão de Bcl-2 nas glândulas salivares, favorecendo a persistência da inflamação crônica e os danos aos tecidos das glândulas salivares (Bechanbane *et al.*, 2022).

3. JUSTIFICATIVA

Quando ocorre um desequilíbrio na microbiota ou uma situação de deficiência imunológica, o sistema de ductos glandulares pode servir como via de entrada para diferentes microrganismos causarem infecções tanto nas glândulas anexas ao sistema digestório como em outros órgãos (Marsh; Martins, 2005).

O interesse em descobrir e estudar os efeitos da LV nas glândulas de mamíferos é crescente. Estudos realizados anteriormente com glândulas salivares de animais infectados com *L. infantum* sugerem alterações histopatológicas no parênquima dos órgãos (Conde-Júnior *et al.*, 2016; Fonseca *et al.*, 2021). Observar as possíveis alterações histológicas nos diferentes órgãos no modelo *in vivo* frente à infecção por *Leishmania sp.* permite entender um pouco mais sobre a patogenia da infecção. Sabe-se que estudos relativos a essa patologia fornecem informações importantes sobre achados microscópicos quando a doença se apresenta assintomática.

O perfil de resposta à infecção pelo órgão ainda merece estudos aprofundados. Neste sentido, faz-se necessário o estímulo às pesquisas sobre a aquisição de dados biológicos, histológicos e histomorfométricos a fim de entender a fisiopatologia da leishmaniose visceral. O camundongo BALB/c é considerado um dos melhores modelos animais para o desenvolvimento da LV devido à sua uniformidade genética, permitindo a utilização de menos animais e obtenção de resultados mais precisos.

A partir da análise histopatológica e imuno-histoquímica das glândulas salivares retiradas de camundongos BALB/c infectados com a *L. infantum*, espera-se avaliar o perfil da integridade da estrutura tecidual e do parênquima glandular, com ênfase na observação da proliferação celular e da apoptose. Além disso, busca-se verificar se alterações ocorridas nesses órgãos aconteceram devido à presença do parasito na microestrutura glandular ou ao processo inflamatório sistêmico característico da infecção por *L. infantum*. Sendo a LV uma zoonose de importância, o conhecimento de achados microscópicos tanto no desenrolar assintomático quanto sintomático da doença pode favorecer a compreensão do comportamento do parasito e do hospedeiro frente à infecção.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Identificar as alterações na histoarquitetura das glândulas salivares de camundongos BALB/c experimentalmente infectados por *Leishmania infantum*.

4.2 Objetivos específicos

- Analisar o parênquima das glândulas salivares de camundongos infectados e não infectados com *L. infantum* em 7 e 50 dias após a infecção.
- Comparar os dados histopatológicos e histomorfométricos das glândulas salivares em 7 e 50 dias após a infecção.
- Analisar a expressão de Ki-67 e Bcl-2, respectivamente, marcadores de proliferação celular e apoptose na microestrutura das glândulas salivares de animais infectados e não infectados.
- Detectar e quantificar a possível presença do DNA de *L. infantum* na estrutura tecidual das glândulas salivares

5. METODOLOGIA

5.1 Aspectos éticos

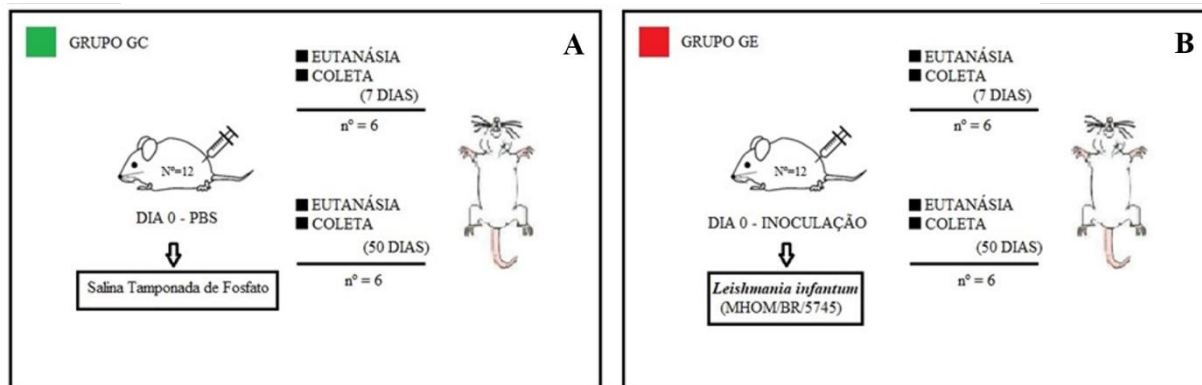
A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Piauí (CEUA/UFPI) com o protocolo nº 719/22.

5.2 Animais

Foram utilizados 24 camundongos (*Mus musculus*) isogênicos da linhagem BALB/c, machos, com quatro a seis semanas de idade, pesando entre 20 e 30 gramas, obtidos do Biotério Central e mantidos durante o delineamento experimental no Biotério Setorial I em temperatura variando de 22-25°C e umidade a 50%, localizado no Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí (NPPM/UFPI). Os animais foram alimentados e hidratados *ad libitum* e mantidos em gaiolas com cama maravalha cobertas com caixa protetora para evitar infecção cruzada por moscas ou outros insetos e proporcionar conforto aos animais.

5.3 Delineamento experimental

Os camundongos BALB/c foram divididos aleatoriamente em dois (2) grupos denominados: grupo controle (GC) e grupo experimental (GE), cada um contendo 12 animais. No GE cada camundongo foi inoculado 76µL, por via intraperitoneal, com 1×10^6 promastigotas metacíclicas de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/5745- SISGEN: AA7BFCC) na fase estacionária, em solução Salina Tamponada Fosfato (PBS) (Conde-Júnior *et al.*, 2016; Reis *et al.*, 2021). No GC, para simular a mesma situação de estresse, foram administrados 50 µL de PBS em cada animal. Após 7 dias e 50 dias de infecção, seis animais de cada grupo foram eutanasiados, formando grupos de diferentes fases da infecção, e, posteriormente coletadas as amostras biológicas de interesse. A inoculação foi realizada em parceria com o Laboratório de atividade anti*Leishmania* localizado no NPPM-UFPI (Figura 7).

Figura 7- Representação esquemática do Delineamento experimental

Fonte: Dados da pesquisa, 2024. Representação esquemática do protocolo experimental dos grupos controle (A) e experimental (B). GC - Grupo Controle. GE - Grupo Experimental.

5.4 Coleta das amostras

Após realização do delineamento experimental, os animais foram levados ao Laboratório de Pesquisa em Ciências Morfológicas (LABCIM-UFPI) para a remoção dos órgãos de interesse. Os animais foram anestesiados com Lidocaína (Cloridrato de Lidocaína® Cotia, São Paulo, Brasil) 10mg/kg e colocados em um período de latência de 10 minutos. Em seguida, foram eutanasiados com overdose de Tiopental Sódico (Thiopentax®, Cristália, São Paulo, Brasil) por via intraperitoneal. Confirmada a ausência dos parâmetros vitais, deu-se início a coleta das amostras biológicas. Uma incisão retilínea na região abdominal foi feita para a coleta de fígado e baço para confirmar a infecção. Em seguida, na região cervical, outra incisão retilínea medialmente centralizada foi realizada para facilitar a divulsão do tecido subcutâneo até o encontro do músculo masseter para a dissecação e coleta das glândulas submandibular e a sublingual e na região abaixo do pavilhão auricular para a retirada da glândula parótida. Em seguida os materiais biológicos foram imediatamente imersos em solução de formaldeído 10% tamponado para fixação, pH 7,6, em volume vinte vezes maior que o volume das amostras, por 48 horas.

5.5 Imprint do baço

O baço dos camundongos pertencentes ao GE foi seccionado e a superfície de corte foi pressionada em lâmina histológica. Imprints foram obtidos em lâminas de microscopia por duplicata e posteriormente coradas pelo método Panótico Rápido (Instant prov®, Newprov,

Paraná, Brasil). Por fim, foram levadas ao microscópio de luz para a identificação das formas amastigotas.

5.6 Processamento histológico

Após a adequada fixação, as amostras foram submetidas ao processamento histológico de rotina e coloração com Hematoxilina e Eosina (HE). O processamento iniciou-se com desidratação dos tecidos, por difusão, em bateria de álcool etílico em concentrações crescentes, partindo do 70% ao 100%, submersos por 45 minutos cada, em temperatura ambiente. Em seguida, foram clarificados em Xilol para análise (PA) I e II, em temperatura ambiente, por 45 minutos cada. Após a diafanização, o material biológico foi impregnado em parafina histológica líquida I e II, armazenada em estufa a 56-60°C, durante 45 minutos em cada solução e depois os materiais de interesse foram colocados em parafina histológica para a produção de blocos.

Esses blocos, contendo as amostras de interesse, foram submetidos à microtomia com realização de cortes seriados com espessura de 5 µm. Os fragmentos, após o corte, formaram fitas que foram transferidas para um banho histológico contendo água destilada a uma temperatura de no máximo 50 °C e mantidos até seu alongamento. Após a completa distensão, foram colocados em lâminas histológicas, previamente limpas e albuminizadas. As lâminas com secções dos tecidos biológicos foram levadas à estufa a 60°C por 15 minutos para desparafinização e, em seguida, submersas em banhos de Xilol PA I, II e III por cinco minutos em cada. Posteriormente, foram reidratados em uma bateria de concentrações decrescentes de álcool etílico, do 100% ao 70%, por três minutos em cada e seguido por banho em água corrente por 10 minutos. Em seguida as lâminas foram imersas em Hematoxilina por 45 segundos e depois levadas à água corrente por cinco minutos para a retirada do excesso de corante. Na sequência, foram coradas com Eosina por 25 segundos e posteriormente mergulhadas em água parada para a retirada do corante em excesso. As mesmas foram mergulhadas em álcool etílico 70% e, em seguida, submersas por cinco minutos em álcool etílico 100% para desidratação rápida. As lâminas foram clarificadas em banhos de Xilol PA I e II, por cinco minutos em cada solução, e depois montadas em lâmina-lamínula com auxílio do Bálsamo do Canadá. Por fim, as lâminas histológicas foram levadas para o microscópio de luz para observação e análise, e depois fotodocumentadas (Fonseca *et al.*, 2017).

5.7 Análise Histopatológica

Após a produção das lâminas, essas seguiram para a análise microscópica. O laminário contendo cortes de fígado e baço foi analisado com objetivo de confirmar a infecção. As lâminas contendo seções de glândulas salivares foram analisadas descritivamente quanto às possíveis alterações após a infecção experimental.

5.8 Análise Histomorfométrica

A histomorfometria, que corresponde à análise quantitativa da dimensão acinar e ductal, foi realizada por meio de uma câmera de vídeo digital de alta resolução acoplada ao microscópio de luz (Leica Microsystems DM 400, Alemanha) com transmissão de imagens a um computador (Pentium Dual Core Duo). Usando a plataforma de software Leica X (LAS X), foram selecionados randomicamente 10 campos de imagem em aumento de 400x e a cada campo, 10 ácinos e um ducto intralobular foram selecionados aleatoriamente e obtidos valores de perímetro (μm) e área (μm^2) adquiridos por análise de imagens fotomicroscópicas (Fonseca *et al.*, 2021). Os dados posteriormente foram organizados em planilhas para análise estatística.

5.9 Imuno-histoquímica

A reação de imuno-histoquímica (IHQ) aconteceu no laboratório privado Citolab, localizado na cidade de Teresina-Piauí. A imunomarcação foi realizada com anticorpos anti-Ki-67 (CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) - Rabbit Monoclonal Primary Antibody, Ventana, Roche®, Estados Unidos) e anti-Bcl-2 (CONFIRM anti-bcl-2 (124) -Mouse Monoclonal Primary Antibody, Ventana, Roche®, Estados Unidos) e expressos no núcleo e no citoplasma, respectivamente. As glândulas salivares foram fixadas, emblocadas em parafina e cortadas em micrótomo rotativo LUPETEC Modelo MRP2015 na espessura de 4 μm . Sequencialmente, os fragmentos, após o corte, formaram fitas que foram transferidas para um banho histológico contendo água destilada a uma temperatura de no máximo 50 °C e mantidas até seu alongamento. Em seguida, foram colocados em lâminas TOMMO (Fortune®, Portugal), específicas para a técnica, carregadas positivamente para análise de IHQ.

As lâminas contendo as amostras de interesse foram desparafinizadas em um banho de Xilol PA, hidratadas em três banhos de álcool etílico 99%, em seguida, submetidas à reação automatizada no equipamento BENCHMARK IHC/ISH (Ventana, Roche®, Estados Unidos).

Na máquina, durante a realização da IHQ, além dos anticorpos de interesse, foram utilizados: o kit de detecção ultraView 3,3'-diaminobenzidina tetrahydroclorato (DAB) e corantes Hematoxylin II e Bluing Reagent. Em seguida as lâminas foram preparadas para montagem com lamínula (24x50mm) e resina acrílica e, por fim, analisadas descritivamente.

5.10 Extração de DNA e RT-PCR

Esse método foi realizado em parceria com o Laboratório de Biologia Molecular localizado no Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-tronco (NUPcelt) no Centro de Ciências Agrárias (CCA)/UFPI. A extração de DNA foi realizada conforme as orientações do fabricante Blood & Tissue DNA mini kit (Ludwig Biotecnologia®, LTDA, Brasil). As amostras de glândulas salivares, que estavam previamente congeladas, foram digeridas em 180 µL de tampão de lise tecidual (Lissue Lysis-TL) temperatura ambiente (room temperature- RT). Em seguida foram adicionados 20 µL Proteinase K na qual foram mantidas aquecidas a uma temperatura de 56°C, em banho maria, por duas horas e a cada 20 minutos essas eram homogeneizadas em agitador de tubos. Após esta etapa as amostras foram mantidas *overnight* no freezer. Sequencialmente, as amostras foram aquecidas a 56°C e, em seguida, adicionados 200 µL do tampão de ligação de coluna (column binding- CB) RT, homogeneizadas e incubadas à temperatura de 70°C. Posteriormente, foram adicionados 100µL de isopropanol e agitados. As amostras foram colocadas em um outro eppendorf, com coluna de sílica, para serem centrifugadas a 13000 rpm por 1 minuto. Em sequência, foram adicionados 500µL do tampão de remoção de inibidor (inhibitor removal- IR) RT e levados à centrifugação por 30 segundos a 12000 rpm. O sobrenadante, resultado da centrifugação, foi coletado e colocado em outro microtubo, o qual foram adicionados 600 µL do tampão de lavagem RT e etanol e centrifugados por 30 segundos a 12000 rpm. A etapa anterior foi repetida após o descarte do conteúdo. Em seguida, o eppendorf foi levado à centrífuga para remover completamente o etanol da coluna de sílica por 2 minutos a 13000 rpm. A coluna de sílica foi colocada em um eppendorf de 1,5 mL e, logo após, adicionados 30 µL do tampão de eluição RT. Após 10 minutos, à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 12000 rpm. O conteúdo foi levado ao espectrofotômetro Nanodrop™ 2000/2000c (Thermo Scientific), cujo objetivo foi mensurar a pureza e a quantidade do DNA.

O DNA de *L. infantum* foi amplificado usando os primers: sense- 5'-GGTTAGCCGATGGTGGTCTT-3' e anti-sense-5'-GCTATATCATATGTCCAAGCACTTACCT-3' e sonda TaqMan (*Thermus aquaticus*

(TaqMan) (5'-ACCACCTAAGGTCAACCC-. Foram adicionados a cada amostra: 3 µL de amostra de DNA, 6,5 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix (TaqMan Polimerase recombinante, MgCl₂, Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (dNTP's)), 1,25 µL de cada primer, 1,0 µL de sonda TaqMan MGB (marcada com corante FAMTM, Applied Biosystems). Em seguida, as amostras foram levadas ao equipamento 7500 Fast Real-time PCR System por 90 minutos para analisar a presença do DNA e a quantificação. Para as amostras de controle positivo usou-se DNA de *L. infantum*.

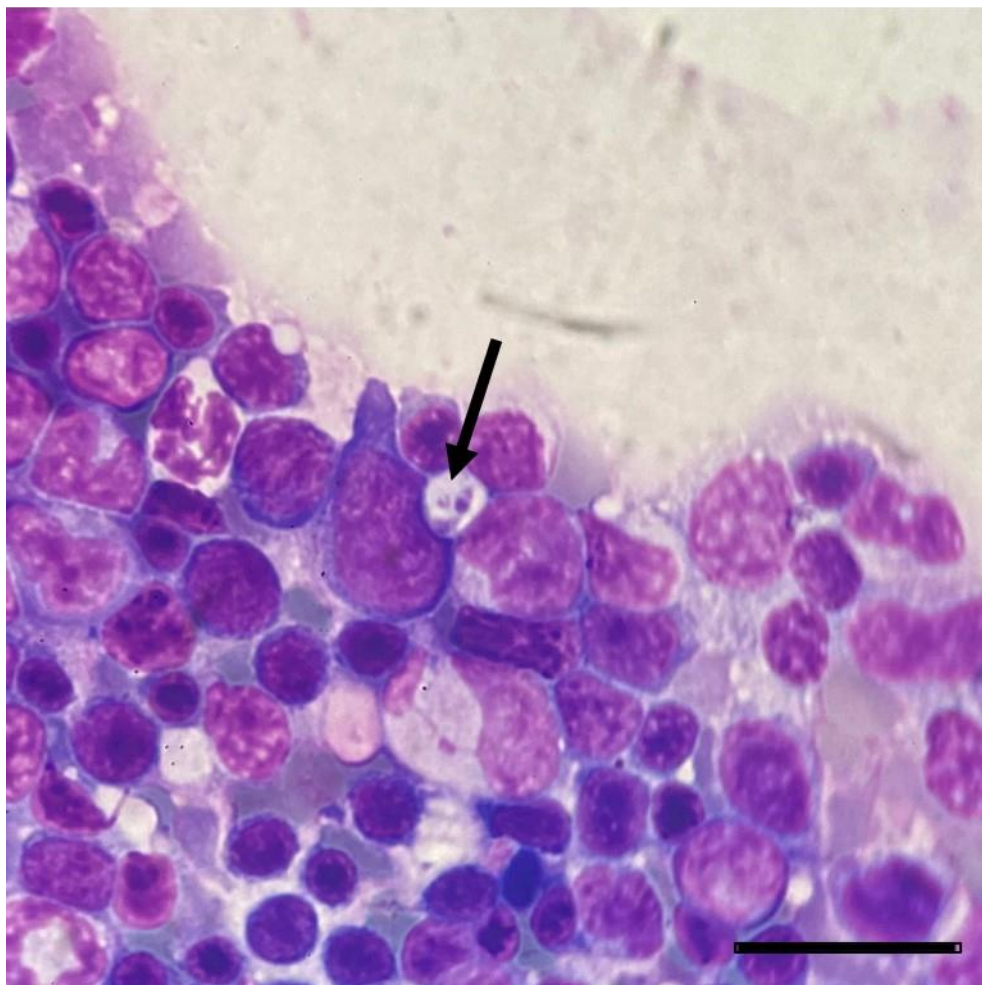
5.11 Análise estatística

Devido à quantidade de dados obtidos de ácinos e ductos, dois testes de normalidade foram aplicados. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para testar a normalidade dos dados dos ductos intralobulares das glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais, enquanto o teste de Kolmogorov–Smirnov foi aplicado às mensurações dos ácinos dessas glândulas. Em todos os grupos houve desvio significativo da normalidade e isso não foi melhorado com uma transformação logarítmica, portanto, testes não paramétricos foram usados para analisar os dados. Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas post-hoc de Dunn, utilizando o programa GraphPad Prism 10.0.0 (GraphPad Software, Inc). Os dados são apresentados como mediana ± intervalo em gráficos e as diferenças foram consideradas significativas em $P \leq 0,05$.

6. RESULTADOS

O modelo proposto na pesquisa foi eficaz no desenvolvimento da infecção. Aos 7 e 50 dias de infecção, os camundongos que receberam as formas promastigotas apresentaram-se apáticos, com perda de peso, além da constatação visual do aumento volumétrico do fígado e do baço. Por meio do imprint do baço nos animais do GE foram observadas formas amastigotas da *Leishmania infantum* (Figura 8).

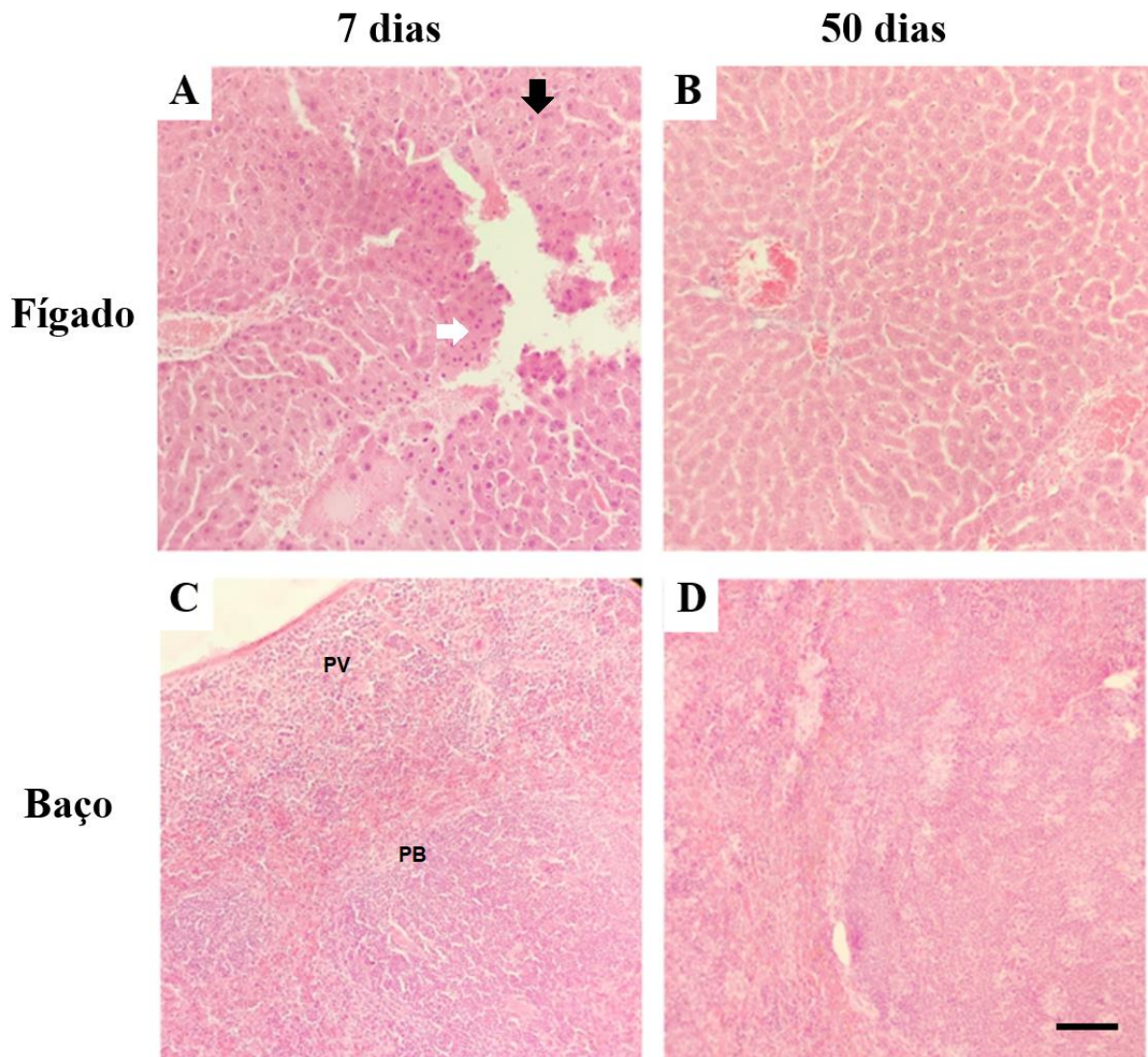
Figura 8- Fotomicrografia do imprint de baço de camundongo BALB/c infectado 50 dias após a infecção experimental por *L. infantum*.



Fonte: Dados da pesquisa, 2024. Forma amastigota livre (seta preta) com cinetoplasto, núcleo e citoplasma. Panótipo rápido. 1000x.

Histologicamente, o fígado apresentou, com 7 dias após a infecção, áreas com hiperemia, hemorragia, hepatócitos hipertrofiados com vacuolização citoplasmática, regiões de foco de alteração celular eosinofílico, além de regiões com necrose periportal (Figura 9A). Aos 50 dias de infecção, o fígado apresentou histoarquitetura homogênea, apresentando apenas focos de hiperemia (Figura 9B). Foi constatada a presença de poucos granulomas. No baço, aos 7 dias de infecção, foi observada hipertrofia de linfócitos e áreas de congestão e a identificação dos centros germinativos nos folículos linfóides secundários (Figura 9C). 50 dias após a infecção a arquitetura esplênica apresentou-se intensamente desorganizada, apresentando aumento folicular e intensa hiperplasia de linfócitos (Figura 9D). Foi identificada a presença de formas amastigotas.

Figura 9- Fotomicrografia dos fragmentos de fígado (A e B) e baço (C e D) de camundongos BALB/c infectados com 1×10^6 amastigotas de *Leishmania infantum* 7 dias (A e C) e 50 dias (B e D) após a infecção. HE. 200x.



Fonte: Dados da pesquisa, 2024. Fotomicrografia do fígado após 7 dias de infecção (A) apresentaram hipertrofia dos hepatócitos (seta preta) e necrose periportal (seta branca) e após 50 dias de infecção (B), a microestrutura hepática apresentou-se reconstituída. O baço, após 7 dias de infecção (C), eram identificáveis a polpa branca (PB) e a polpa vermelha (PV) e após 50 dias de infecção (D), a histoarquitetura esplênica encontrou-se intensamente desorganizada. PB: polpa branca. PV: polpa vermelha.

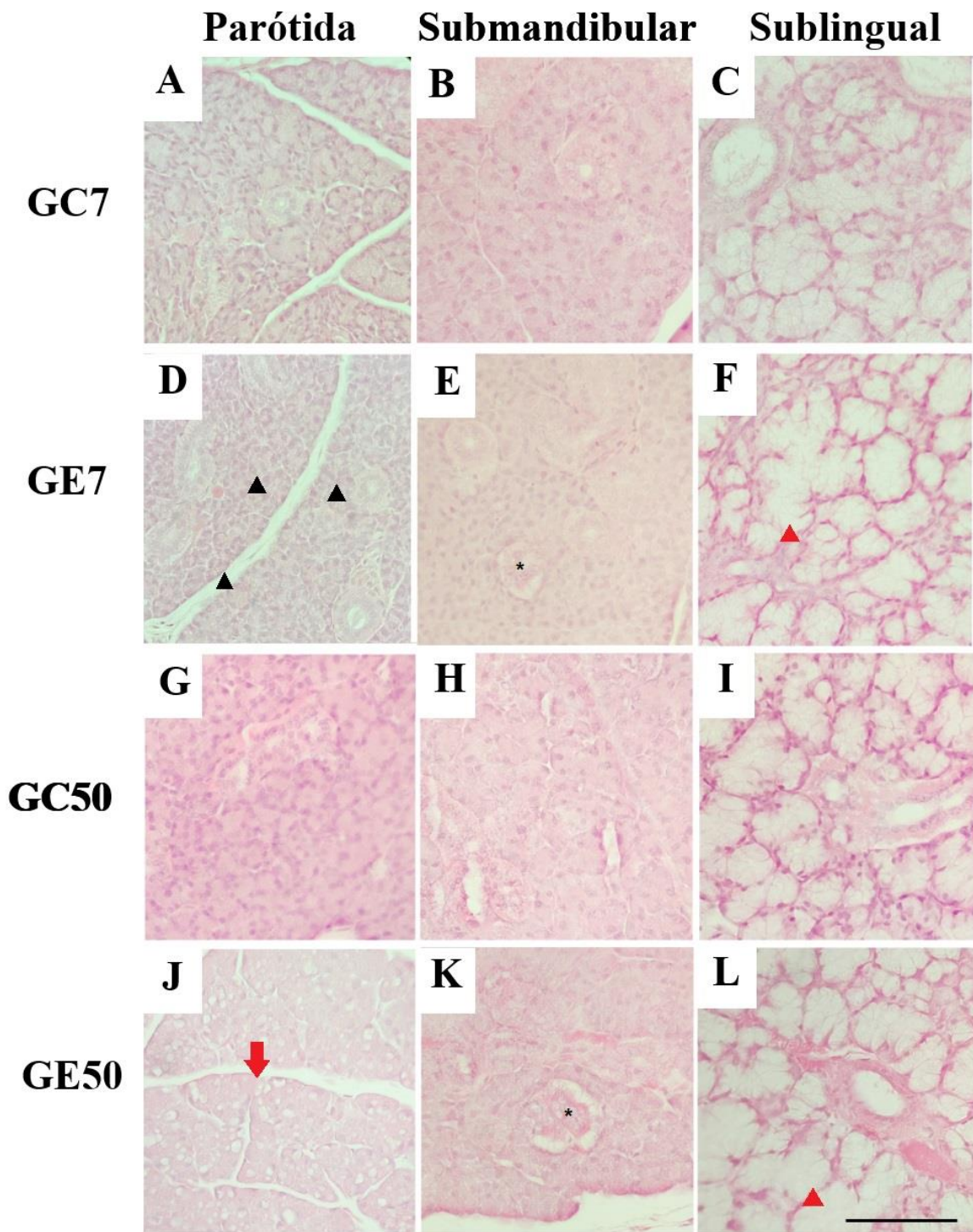
As glândulas salivares de camundongos BALB/c dos grupos pesquisados apresentaram arranjo celular e constituintes teciduais típicos do parênquima glandular (Figura 10). No grupo controle, os constituintes acinares e os ductos das glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais apresentaram-se homogêneos (Figura 10 A, B, C, G, H e I). Os ácinos estavam arranjados em aglomerados de células piramidais, polarizadas e justapostas. A glândula parótida apresentou-se constituída essencialmente por células serosas com núcleo centralizado. A glândula sublingual, anatomicamente próxima à submandibular, possuiu principalmente

células mucosas com núcleo basal. A glândula submandibular apresentou os dois tipos acinares, mas com a predominância de células serosas.

Os achados histopatológicos no GE, aos 7 dias de infecção, incluem hiper celularidade de ácinos e ductos, hiperemia, desprendimento das células ductais nas glândulas parótidas e submandibulares (Figura 10D e 10E). A histoarquiteura da glândula submandibular apresentou-se intensamente desorganizada. Na glândula sublingual, assim como na parótida, os ácinos apresentavam vacuolização citoplasmática e na sublingual constatou-se o aumento volumétrico dos ácinos mucosos (Figura 10F). Em nenhuma das glândulas, no tempo estabelecido, foi identificada a presença das formas amastigotas.

As glândulas parótidas do GE, aos 50 dias de infecção, apresentaram regiões com vacuolização citoplasmática intensa, congestão, hiperemia, hemorragia e a perda da homogeneidade tecidual (Figura 10J). Nestas glândulas, observaram-se também o afastamento dos ductos. Nas glândulas submandibulares, o parênquima glandular apresentou regiões com desorganização celular, aumento da celularidade, distanciamento de ductos do parênquima e hiperemia (Figura 10K). Aos 50 dias de infecção, a hipertrofia das células mucosas sublinguais persistiu, além da identificação de núcleos picnóticos, hiperemia, congestão dos ductos e áreas com vacuolização citoplasmática (Figura 10L).

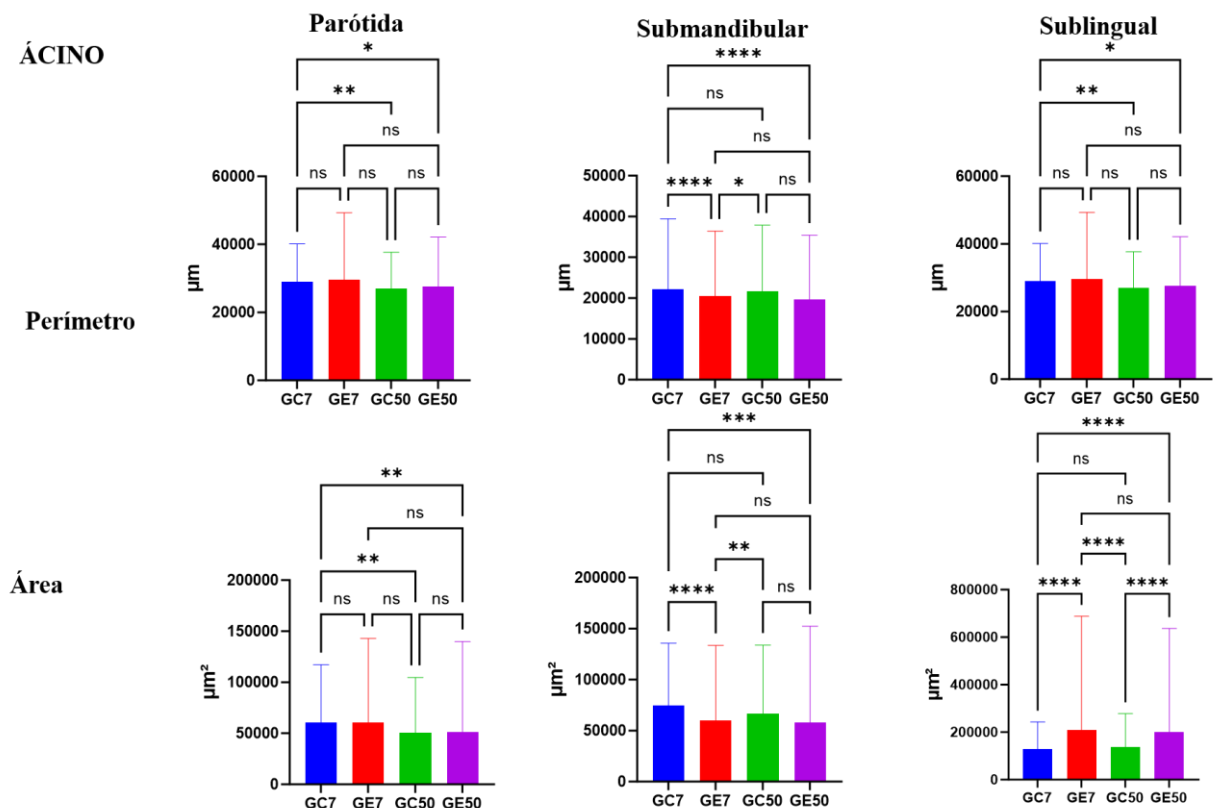
Figura 10- Fotomicrografia de fragmentos de glândulas parótida, submandibular e sublingual de camundongos não infectados (A, B, C, G, H e I) e experimentalmente infectados com *Leishmania infantum* (D, E, F, J, K e L) 7 dias e 50 dias após a infecção. HE. 400x



Fonte: Dados da pesquisa, 2024. (D) Aumento da celularidade acinar (ponta de seta preta) na glândula parótida após 7 dias de infecção. (E e K) Desprendimento das células ductais (asterisco) na glândula submandibular após 7 e 50 dias de infecção. (F e L) Aumento volumétrico dos ácinos mucosos (ponta de seta vermelha) na glândula sublingual após 7 e 50 dias de infecção. (J) Vacuolização citoplasmática nas glândulas parótidas de GE50. GC7: Grupo controle 7 dias, GC50: Grupo controle 50 dias, GE7: Grupo experimental 7 dias. GE50: Grupo experimental 50 dias

A mensuração dos ácinos das glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais apresentou diferenças significativas entre os grupos analisados. Os ácinos serosos da glândula parótida do GE50 apresentaram diminuição no perímetro e na área quando comparados ao GC7. Nas glândulas submandibulares, houve diminuição significativa no perímetro e área dos ácinos dos grupos GE7 e GE50 quando comparados ao grupo controle GC7. Nas glândulas sublinguais, nos períodos analisados, houve aumento significativo da área dos ácinos após a infecção, em ambos os grupos experimentais, quando comparados aos grupos controles GC7 e GC50. O perímetro acinar também aumentou significativamente no grupo GE50 quando comparados ao grupo controle GC7. Não houve aumento estatisticamente significativo no perímetro acinar de GE7 quando comparado ao controle (Figura 12).

Figura 12- Comparação dos parâmetros histomorfométricos dos ácinos das glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais dos grupos controle e experimental 7 e 50 dias após a infecção por *Leishmania infantum*



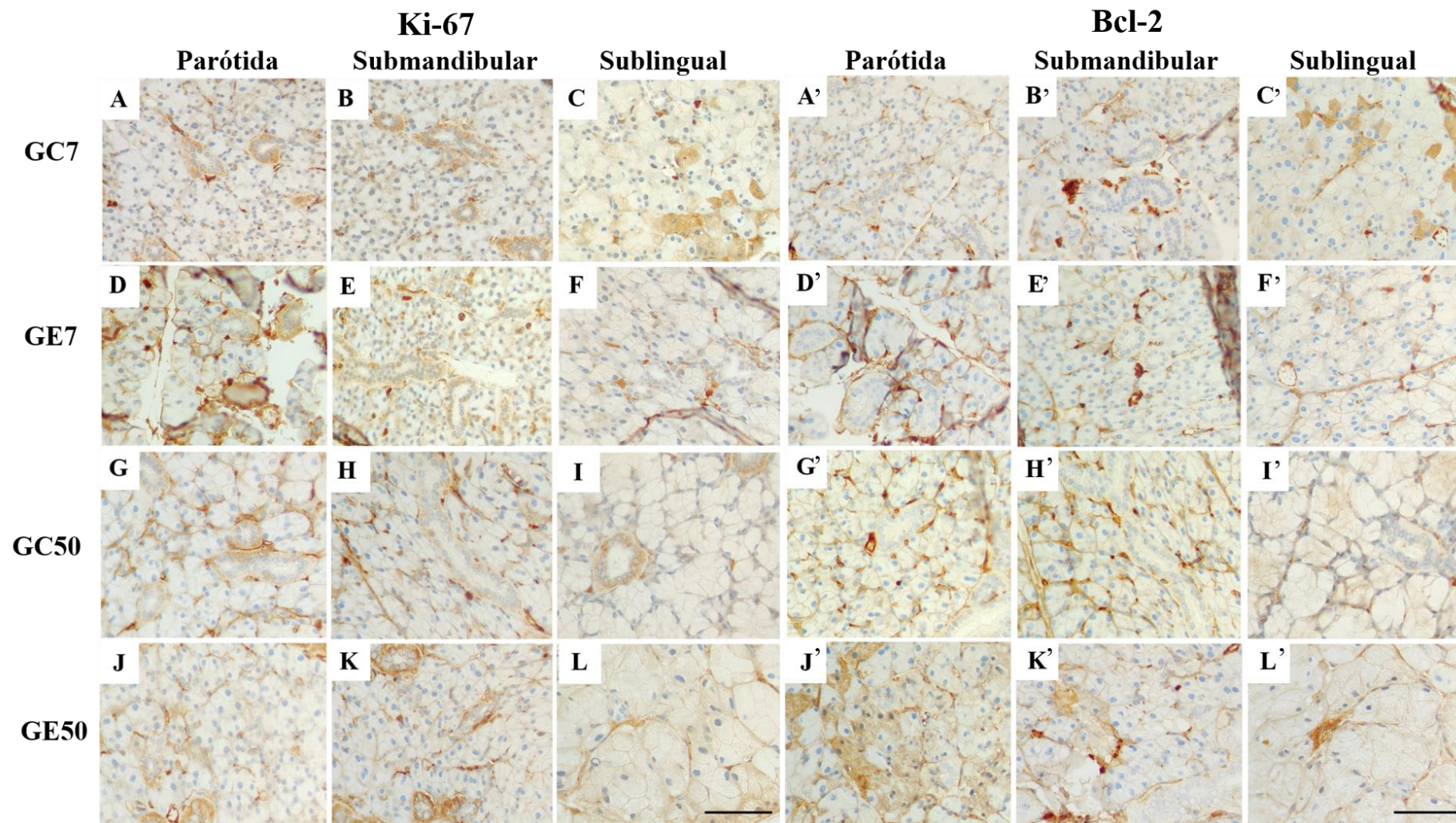
Fonte: Dados da pesquisa, 2024, p-valor 0,05 Teste de Kruskal-Wallis. GC7:Grupo controle 7 dias, GE7: Grupo experimental 7 dias, GC50:Grupo controle 50 dias, GE50: Grupo experimental 50 dias, ns: não significativo, *: significativo.

Na análise imuno-histoquímica, o grupo controle mostrou expressão citoplasmática positiva para a proteína Ki-67, que apareceu mais distintamente no sistema de ductos em GC7 e GC50. Reatividades nucleares dispersas também foram identificadas para o antígeno proteico. Algumas áreas focais localizadas nos ácinos secretores, bem como nas células endoteliais dos vasos sanguíneos, expressam o antígeno de proliferação em maior intensidade (Figura 13A, B, C, G, H e I).

Aos 7 dias de infecção houve aumento na imunoexpressão da proteína Ki-67 nas glândulas em porções secretoras terminais e no sistema de ductos, quando comparado ao grupo controle (Figura 13D, E e F). Áreas mais amplas dos ácinos expressaram o antígeno, com exceção dos ácinos mucosos na sublingual 7 dias após a infecção. Em GE50, a imunorreatividade do Ki-67 diminuiu nas porções secretoras, mas aumentou no sistema de ductos das glândulas parótida e submandibular (Figura 13J e 13K). Nas glândulas sublinguais, a expressão desse marcador de proliferação celular foi menos intensa (Figura 13L). A expressão do antígeno de proliferação celular apareceu espumosa nas três glândulas avaliadas, provavelmente devido à degeneração vacuolar que afeta o tecido glandular.

Na análise imuno-histoquímica, os grupos controles mostraram imunorreatividade citoplasmática positiva para a proteína Bcl-2 no tecido parenquimatoso das glândulas avaliadas (Figura 13A', B', C', G', H' e I'). Após 7 dias da infecção, GE7 expressou Bcl-2 menos intenso nas glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais (Figura 13D', E' e F'). Com a constatação de pequenas áreas imunomarcadas pelo referido anticorpo, sugerindo que a glândula induz uma resposta de proliferação compensatória ao dano sofrido. Aos 50 dias de infecção, a imunorreatividade do Bcl-2 apresentou maior intensidade do que a proteína Ki-67 nos ácinos das glândulas salivares (Figura 13J', K', L'). A expressão do antígeno da apoptose apareceu espumosa nas três glândulas avaliadas, provavelmente devido à degeneração vacuolar que afeta o tecido glandular.

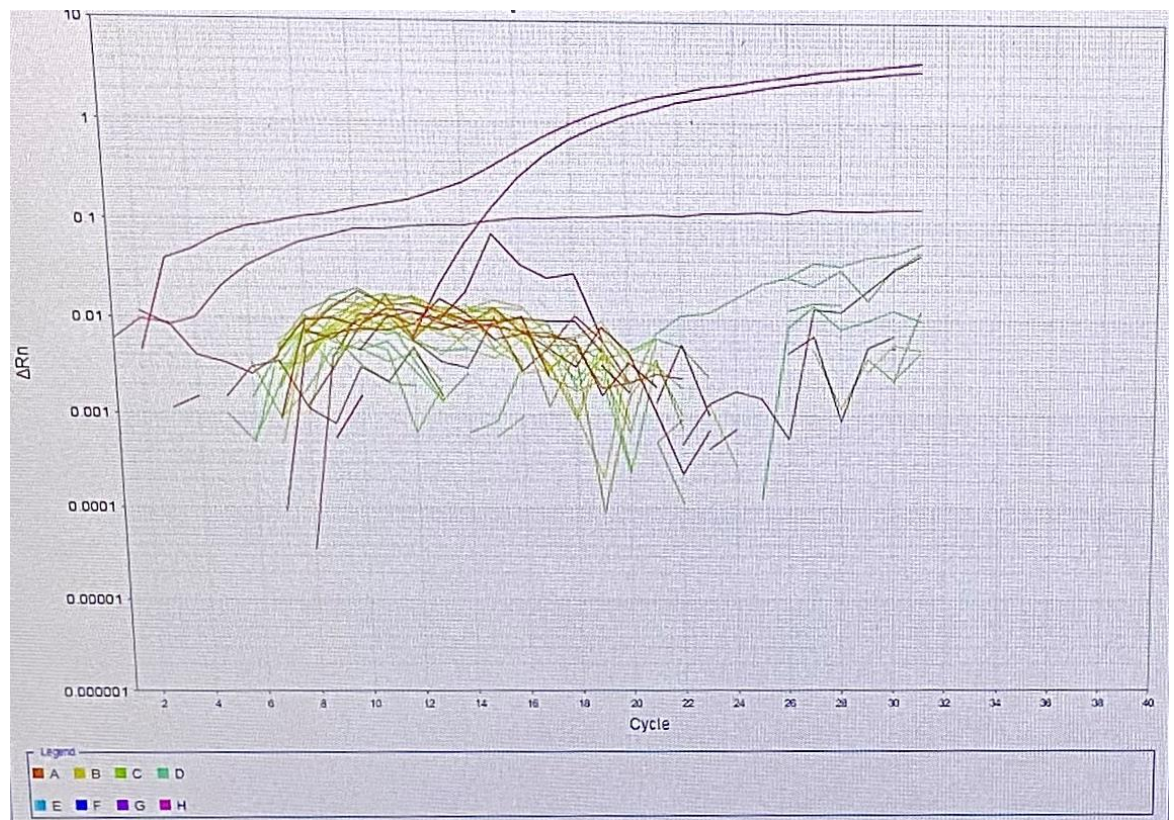
Figura 13- Fotomicrografia da expressão de ki-67 e Bcl-2 em fragmentos de glândulas parótida, submandibular e sublingual de camundongos não infectados (A, A', B, B', C, C', G, G', H, H', I e I') e experimentalmente infectados com *Leishmania infantum* (D, D', E, E', F, F', J, J', K, K', L e L').



Fonte: Dados da pesquisa, 2024. GC7:Grupo controle 7 dias, GE7: Grupo experimental 7 dias, GC50:Grupo controle 50 dias, GE50: Grupo experimental 50 dias.

Através da técnica de PCR em tempo real não foi identificado a presença do DNA da *L. infantum* no tecido glandular de camundongos BALB/c aos 7 e 50 dias de infecção (Figura 14).

Figura 14- Reprodução gráfica do status de amplificação por RT-PCR em amostras glandulares salivares de camundongos infectados experimentalmente por *Leishmania infantum*.



Fonte: Dados da pesquisa, 2024. Linhas vermelhas (A): amplificação reprodutível. Linhas amarela (B), verde (C), verde claro (D), azul claro (E), azul (F), roxo (G) e rosa (H): baixa reprodutibilidade/não detectada

7. DISCUSSÃO

Nesta pesquisa, a infecção experimental por *Leishmania infantum* induziu alterações microestruturais nas glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais. As glândulas salivares são importantes órgãos produtores da saliva e quando há qualquer desequilíbrio em sua microestrutura a repercussão funcional é considerável (Chibly *et al.*, 2022). A relação entre o referido órgão e o parasito ainda não foi totalmente explicada, mas pesquisas realizadas asseguram os dados deste estudo, demonstrando que estes órgãos podem ser afetados microscopicamente pela infecção (Conde-Júnior *et al.*, 2016; Fonseca *et al.*, 2021).

A *Leishmania infantum* é um importante patógeno que provoca uma inflamação sistêmica (Pérez-Cabezas *et al.*, 2019a). O modelo murino é referência na pesquisa experimental com *L. infantum*, pois consegue simular as características imunopatogênicas da infecção natural que acontece em humanos (Louliette, Bañuls, Hide 2016; Nieto *et al.*, 2011; Pérez-Cabezas *et al.*, 2019a). Assim como nestas pesquisas, estudos que buscam a identificação de alterações na histoarquitetura de órgãos também têm se mostrado eficazes, principalmente, em órgãos não alvos da infecção (Boechat *et al.*, 2016; Conde-Júnior *et al.*, 2016; Fonseca *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2021).

Para nortear os estudos que têm como objetivo estes órgãos, como as glândulas salivares, as análises do fígado e do baço são essenciais para demonstrar o sucesso da infecção. De acordo com os estudos de Nieto *et al.* (2011) e Pérez-Cabezas *et al.* (2019a), em modelos murinos, a fase aguda é marcada por alterações vasculares no fígado e no baço, cujo o objetivo é o recrutamento de células para conter a infecção, corroborando os resultados expostos nesta pesquisa. O baço apresentou alterações microestruturais que sugerem a persistência do parasito na arquitetura esplênica, rotulando-o como órgão mais suscetível à infecção por *L. infantum* (Nieto *et al.*, 2011; Pérez-Cabezas *et al.*, 2019a).

Sabe-se que qualquer órgão do hospedeiro pode estar suscetível à infecção por este parasito (Cantos-Barreda *et al.*, 2018a). A análise histopatológica é uma importante técnica que tem auxiliado na investigação de alterações nas glândulas salivares frente à infecção, como apresentado em pesquisas anteriores por Conde-Júnior *et al.* (2016) e Fonseca *et al.* (2021). Cada alteração na histoarquitetura é um acontecimento que pode gerar mudanças moleculares que impactam na homeostasia do órgão. O defeito no núcleo pode estar relacionado a alterações que afetam a atividade biológica total da célula (Mohammed *et al.*, 2021). Em contrapartida, alterações no citoplasma ocorrem quando há um defeito na atividade funcional da célula (Prasad, Ramesh, Balamurali, 2010).

A vacuolização citoplasmática, os ácinos hipertrofiados e a alteração nuclear são modificações que esta pesquisa compartilha com Fonseca *et al.* (2021). Estes achados mimetizam os observados por estresse oxidativo (Ekuni *et al.*, 2010), uso de fármacos (Mansy *et al.*, 2020; Mohammed *et al.*, 2021), radiação (Krishnan *et al.*, 2017) e alterações relacionadas à idade (Azevedo-Alanis *et al.*, 2015). A degeneração mitocondrial, os distúrbios no metabolismo celular e na regulação osmótica são importantes causadores da vacuolização citoplasmática (Mansy *et al.*, 2020). Funcionalmente, em seres humanos, estas alterações podem acarretar a hipossalivação, além de alterações na composição da saliva, que tem efeitos prejudiciais na saúde, como dificuldade em comer e deglutir, crescimento de lesões e infecções orais, impactando diretamente no bem-estar geral (Chibly *et al.*, 2022; De La Cal *et al.*, 2006; Rocchi, Emmerson, 2020).

A histomorfometria é uma técnica que mensura, com alto grau de precisão, as estruturas celulares e atesta a identificação de alterações morfofuncionais nas glândulas salivares (Jesus *et al.*, 2015; Krishnan *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2016; Mohammed *et al.*, 2022). Com o auxílio deste método, os achados apresentados possibilitam estimativas precisas da disfunção das células acinares glandulares frente à infecção por *L. infantum*. Destaque deve ser dado para o aumento da área acinar da glândula sublingual após a infecção. O aumento volumétrico e as alterações na histoarquitetura desta glândula podem impactar diretamente na produção de mucinas e, conseqüentemente, prejudicar a homeostasia da microbiota oral (Li *et al.*, 2023). A diminuição acinar da glândula submandibular após a infecção por *L. infantum* mimetiza os efeitos do uso da radiação nesses órgãos no qual pode provocar má produção de saliva em repouso e ocasionar a hipossalivação (Krishnan *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2023). Na glândula parótida os ácinos serosos diminuíram após 50 dias de infecção, contrapondo os dados apresentados por Fonseca *et al.* (2021) em cães.

O equilíbrio entre a apoptose e a proliferação celular é essencial para a manutenção da homeostasia da célula tanto durante a organogênese quanto frente a alguma inflamação (Conde-Júnior *et al.*, 2016; Herrera-Esparza *et al.*, 2008; Mello-Gomes *et al.*, 2019). Em pesquisa anterior, a expressão de Ki-67 nas glândulas salivares de camundongos infectados por *L. infantum* não foi observada (Conde-Júnior *et al.*, 2016), contrapondo os dados da presente pesquisa que expressou positivamente Ki-67 dentro dos ácinos e ductos das glândulas dos grupos avaliados. Estes achados corroboram os resultados apresentados por Dayan *et al.* (2002), pois o Ki-67 é expresso durante as fases do ciclo celular e é encontrado em todas as células em multiplicação, sejam células normais e não normais, por isso é considerado um

importante marcador de proliferação para detectar a taxa de crescimento de certas populações de células (Faur *et al.*, 2015; Mansy *et al.*, 2020).

A proliferação compensatória é um mecanismo ativado frente à exigência funcional do parênquima e tem sido relatada durante respostas regenerativas após um dano tecidual como mecanismo agudo (Chibly *et al.*, 2022; Diwanji, Bergmann, 2018; Fan, Bergmann, 2008). Os achados desta pesquisa apoiam os dados na literatura, pois o processo inflamatório instalado pela infecção por *L. infantum* induz um aumento da divisão celular, bem como a apoptose de células lesionadas (Chibly *et al.*, 2022; Diwanji, Bergmann, 2018; Fan, Bergmann, 2008). 50 dias após a infecção, os danos à histoarquitetura glandular foram mais intensos e ainda com expressão marcante de Ki-67 e Bcl-2, sugerindo um quadro mais grave, visto que células danificadas permanecem sobrecarregando as demais ainda saudáveis, comprometendo a funcionalidade desempenhada pelos órgãos.

A imuno-histoquímica é uma técnica referência no diagnóstico da infecção por *L. infantum* e busca complementar os resultados trazidos pela análise histopatológica. Após 7 dias de infecção sugere-se que a apoptose não é inibida nas células das glândulas salivares. Porém, aos 50 dias de infecção, houve aumento na expressão de Bcl-2, portanto, sugere-se que a apoptose pode ser dificultada nos órgãos avaliados após um período de infecção, contribuindo para a sobrevivência da célula danificada. A apoptose é uma parte importante da morte celular programada (Green; Fitzgerald, 2016). Esta é ativada por duas vias distintas, mas convergentes. A família Bcl-2 é responsável pela via intrínseca atuando principalmente na regulação da apoptose através da permeabilidade da membrana mitocondrial (Hu *et al.*, 2021). A expressão do anticorpo anti-Bcl-2 nos grupos controle e experimental sugere a prolongação celular nas glândulas salivares.

A ausência do DNA da *L. infantum* no tecido glandular salivar suscita que as alterações na microestrutura das glândulas salivares podem ter ocorrido devido a um processo infeccioso sistêmico provocado pelo referido parasito nos camundongos. O tempo de infecção e o modelo utilizado podem justificar a não identificação do material genético do patógeno em questão, visto que em cães com sintomatologia ativa, a saliva apresentou o parasito e tem sido defendida como amostra para método de diagnóstico alternativo não invasivo (Cantos-Barreda *et al.*, 2017; Cantos-Barreda *et al.*, 2018a; Cantos-Barreda *et al.*, 2018b; Cantos-Barreda *et al.*, 2020).

8. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados, observou-se que a indução da infecção por *L. infantum* resultou em alterações na histoarquitetura das glândulas salivares de camundongos, provocando um aumento expressivo do tamanho dos ácinos das glândulas sublinguais após a infecção. Os animais, 7 e 50 dias após a infecção, exibiram mudanças na microestrutura de ácinos e ductos, além de alterações histomorfométricas no perímetro e na área das células acinares nas glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais. Além disso, a infecção experimental por *L. infantum* provocou aumento da proliferação celular e alterou a regulação da apoptose nas células do tecido glandular salivar. A não identificação do DNA do parasito no tecido das glândulas estudadas, nesta pesquisa, sugere que as alterações na histoarquitetura desses órgãos aconteceram devido ao processo inflamatório sistêmico, característico da infecção. Os achados deste estudo contribuem para o entendimento sobre o curso da infecção provocada pela *L. infantum* nas glândulas salivares, mas também fornecem uma base sólida para pesquisas futuras. Acredita-se que este trabalho possa ampliar a compreensão sobre o comportamento dos órgãos não-alvos frente à infecção por *L. infantum*, além de aumentar a busca por tratamentos que minimizem os efeitos causados na cavidade oral e servir como ponto de partida para investigações adicionais.

REFERÊNCIAS

- ABDULHUSSAIN, M. M. Expression of Bcl-2 and clinicopathological variables in salivary glands mucoepidermoid carcinoma. **International journal of health sciences**, v. 16, n. 6, p. 26–31, 2022.
- ABRANTES, T. R. *et al.* Fatores ambientais associados à ocorrência de leishmaniose visceral canina em uma área de recente introdução da doença no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de saúde pública**, v. 34, n. 1, 2018.
- ADNYANE, I. K. M. *et al.* Histological study of the parotid and mandibular glands of barking deer (*Muntiacus muntjak*) with special reference to the distribution of carbohydrate content: Parotid and mandibular glands of barking deer. **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 39, n. 6, p. 516–520, 2010
- AKHOUNDI, M. *et al.* A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ANDRADE, B. B. *et al.* Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. **Scandinavian journal of immunology**, v. 66, n. 2–3, p. 122–127, 2007.
- ANDRE, W. P. P. Análise dos casos de leishmaniose humana e sua relação com a eutanásia de animais recolhidos pelo centro de controle de zoonoses de Mossoró-RN. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. v.7, n. 2, p. 212-224, 2013
- ANVERSA, L. *et al.* Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira (1992)**, v. 64, n. 3, p. 281–289, 2018.
- ASHKENAZI, A. *et al.* From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 16, n. 4, p. 273–284, 2017
- AZEVEDO-ALANIS, L. R. *et al.* Acinar autolysis and mucous extravasation in human sublingual glands: a microscopic postmortem study. **Journal of applied oral science**, v. 23, n. 5, p. 459–466, 2015.

BAGULKAR, B. B. XIAP and ki-67: A correlation between antiapoptotic and proliferative marker expression in benign and malignant tumours of salivary gland: An immunohistochemical study. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, 2015.

BANETH, G., SOLANO-GALLEGO, L. Leishmaniasis. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 52, n. 6, p. 1359–1375, 2022.

BENCHABANE, S. *et al.* Association between increased Bcl-2, Fas and FasL levels and inflammation extent in labial salivary glands during primary sjögren's syndrome. **Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets**, v. 22, n. 3, p. 328–338, 2022.

BERENGUER, L. K. A. R. *et al.* Leishmania infantum infection in a domestic cat: A real threat or an occasional finding? **Acta parasitologica**, v. 66, n. 2, p. 673–676, 2021.

BOECHAT, V. C. *et al.* Occurrence of Leishmania infantum and associated histological alterations in the genital tract and mammary glands of naturally infected dogs. **Parasitology research**, v. 115, n. 6, p. 2371–2379, 2016.

BOGDAN, C. Macrophages as host, effector and immunoregulatory cells in leishmaniasis: Impact of tissue micro-environment and metabolism. **Cytokine: X**, v. 2, n. 4, p. 100041, 2020.

Brasil. Ministério da Saúde. Nota técnica conjunta nº 01/2011 -CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS. Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2011 [citado 19 de fevereiro de 2024]. Disponível em: https://crmvmms.org.br/wp-content/uploads/2019/10/nota-tecnica-no.-1-2011_cglab_cgdt1_lvc_98999048.pdf

BUSAMIA, B. *et al.* Cell apoptosis and proliferation in salivary glands of Sjögren's syndrome: Apoptosis and proliferation in Sjögren. **Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 40, n. 9, p. 721–725, 2011.

CANTOS-BARREDA, A. *et al.* Changes in the concentration of anti-Leishmania antibodies in saliva of dogs with clinical leishmaniosis after short-term treatment. **Veterinary parasitology**, v. 254, p. 135–141, 2018a.

CANTOS-BARREDA, A. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in saliva of dogs. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 73, n. 101542, p. 101542, 2020.

CANTOS-BARREDA, A. *et al.* Quantification of anti-*Leishmania* antibodies in saliva of dogs. **Veterinary parasitology**, v. 242, p. 54–58, 2017.

CANTOS-BARREDA, A. *et al.* Relationship between serum anti-*Leishmania* antibody levels and acute phase proteins in dogs with canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 260, p. 63–68, 2018b.

CARRIÓN, J. *et al.* Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Parasite immunology**, v. 28, n. 5, p. 173–183, 2006.

CESTA, M. F. Normal structure, function, and histology of the spleen. **Toxicologic pathology**, v. 34, n. 5, p. 455–465, 2006.

CHIBLY, A. M. *et al.* Salivary gland function, development, and regeneration. **Physiological reviews**, v. 102, n. 3, p. 1495–1552, 2022.

CIANCIULLI, A. *et al.* Resistance to apoptosis in *Leishmania infantum*-infected human macrophages: a critical role for anti-apoptotic Bcl-2 protein and cellular IAP1/2. **Clinical and experimental medicine**, v. 18, n. 2, p. 251–261, 2018.

CONDE, L. *et al.* Humoral response in Leishmaniasis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 12, 2022.

CONDE-JÚNIOR, A. M. C. *et al.* Does Leishmaniasis disease alter the parenchyma and protein expression in salivary glands? **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 241, n. 4, p. 359–366, 2016

CORRÊA, A. *et al.* Histopathological assessment of the liver during experimental infection with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in immunosuppressed balb/c mice. **Veterinária e Zootecnia**, v. 24, n. 2, p. 384-397, 2017.

COTA, G. *et al.* Inequalities of visceral leishmaniasis case-fatality in Brazil: A multilevel modeling considering space, time, individual and contextual factors. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 7, p. e0009567, 2021.

CZABOTAR, P. E. *et al.* Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 15, n. 1, p. 49–63, 2014.

DA COSTA, A. P. *et al.* *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum chagasi* Infection in Wild Mammals from Maranhão State, Brazil. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 15, n. 11, p. 656–666, 2015.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* Canine leishmaniasis control in the context of one health. **Emerging infectious diseases**, v. 25, n. 12, p. 1–4, 2019b.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* Culling dogs for zoonotic visceral leishmaniasis control: The wind of change. **Trends in parasitology**, v. 35, n. 2, p. 97–101, 2019a.

DAYAN, D. *et al.* Age-related changes in proliferative markers in labial salivary glands: a study of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) and Ki-67. **Experimental gerontology**, v. 37, n. 6, p. 841–850, 2002.

DEBROY, S. *et al.* Challenges in modeling complexity of neglected tropical diseases : a review of dynamics of visceral leishmaniasis in resource limited settings. **Emerging themes in epidemiology**, v. 14, n. 1, p. 10, 2017.

DE LA CAL, C. *et al.* Decrease in salivary secretion by radiation mediated by nitric oxide and prostaglandins. **Neuroimmunomodulation**, v. 13, n. 1, p. 19–27, 2006.

DIWANJI, N. ; BERGMANN, A. An unexpected friend – ROS in apoptosis-induced compensatory proliferation : Implications for regeneration and cancer **Seminars in cell & developmental biology**, v. 80, p. 74–82, 2018.

DOWSETT, M. *et al.* Assessment of Ki67 in breast cancer: Recommendations from the international Ki67 in breast cancer working group. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 22, p. 1656–1664, 2011.

EKUNI, D. *et al.* Imbalance of oxidative/anti-oxidative status induced by periodontitis is involved in apoptosis of rat submandibular glands. **Archives of oral biology**, v. 55, n. 2, p. 170–176, 2010.

ERBER, A. C. *et al.* Diagnosis of visceral and cutaneous leishmaniasis using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) protocols: a systematic review and meta-analysis. **Parasites & vectors**, v. 15, n. 1, 2022.

ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 1, p. 58–85, 2013

FAN, Y.; BERGMANN, A. Apoptosis-induced compensatory proliferation. The Cell is dead. Long live the Cell! **Trends in cell biology**, v. 18, n. 10, p. 467–473, 2008.

FAUR, A. C. *et al.* Ki-67 and p53 immunostaining assessment of proliferative activity in salivary tumors. **Revue roumaine de morphologie et embryologie [Romanian journal of morphology and embryology]**, v. 56, n. 4, p. 1429–1439, 2015.

FERREIRA, J. N.; HOFFMAN, M. P. Interactions between developing nerves and salivary glands. **Organogenesis**, v. 9, n. 3, p. 199–205, 2013.

FIGUEIREDO, W. M. E. *et al.* Protection mediated by chemokine CXCL10 in BALB/c mice infected by *Leishmania infantum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 8, p. 561–568, 2017.

FONSECA, C. M. B. *et al.* Structure of the parotid gland in natural infection by *Leishmania infantum* in *Canis familiaris*. **Archives of oral biology**, v. 124, n. 105077, p. 105077, 2021

FONSECA, C.M. B. *et al.* Comparative histology aspects of the gingiva of children and adults in the University Dental Clinics. **Iosr Journal Of Pharmacy**. v. 7, n. 7, p. 47-52, 2017.

FORRESTER, S. *et al.* Tissue specific dual RNA-seq defines host–parasite interplay in Murine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum*. **Microbiology spectrum**, v. 10, n. 2, 2022.

GAETE, M. *et al.* Salivary Gland Development in Culture. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 2403, p. 277–294, 2022.

GÁLVEZ, R. *et al.* Controlling phlebotomine sand flies to prevent canine *Leishmania infantum* infection: A case of knowing your enemy. **Research in veterinary science**, v. 121, p. 94–103, 2018

GHANIM, A. M. H.; YOUNIS, N. S.; METWALY, H. A. Vanillin augments liver regeneration effectively in Thioacetamide induced liver fibrosis rat model. **Life sciences**, v. 286, n. 120036, p. 120036, 2021.

GIL, F. *et al.* Anatomic and magnetic resonance imaging features of the salivary glands in the dog. **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 47, n. 6, p. 551–559, 2018.

GOMI, H. *et al.* Canine salivary glands: Analysis of Rab and SNARE protein expression and SNARE complex formation with diverse tissue properties. **The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society**, v. 65, n. 11, p. 637–653, 2017.

GRAEFE, C. *et al.* Optimized Ki-67 staining in murine cells: a tool to determine cell proliferation. **Molecular biology reports**, v. 46, n. 4, p. 4631–4643, 2019.

GREEN, D. R.; FITZGERALD, P. Just so stories about the evolution of apoptosis. **Current biology: CB**, v. 26, n. 13, p. R620–R627, 2016.

GURUNG, P.; KANNEGANTI, T.-D. Innate immunity against *Leishmania* infections: Innate immunity against Leishmania. **Cellular microbiology**, v. 17, n. 9, p. 1286–1294, 2015.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado De Fisiologia Médica**. 13. ed. Rio De Janeiro: Elsevier, 2017.

HAUSER, B. R.; HOFFMAN, M. P. Regulatory mechanisms driving salivary gland organogenesis. **Current topics in developmental biology**, v. 115, p. 111–130, 2015.

HERMIDA, M. D.-R. *et al.* Histological disorganization of spleen compartments and severe visceral leishmaniasis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, 2018.

HERRERA-ESPARZA, R. *et al.* Apoptosis and cell proliferation: the paradox of salivary glands in Sjögren's disease. **Acta reumatológica portuguesa**, v. 33, n. 3, p. 299–303, 2008.

HOLMBERG, K. V.; HOFFMAN, M. P. Anatomy, biogenesis and regeneration of salivary glands. **Monographs in oral science**, v. 24, p. 1–13, 2014

- HU, S. *et al.* Identification of the Bcl-2 and Bax homologs from *Rhipicephalus haemaphysaloides* and their function in the degeneration of tick salivary glands. **Parasites & vectors**, v. 14, n. 1, 2021.
- HUANG, N. *et al.* SARS-CoV-2 infection of the oral cavity and saliva. **Nature medicine**, v. 27, n. 5, p. 892–903, 2021.
- IGBOKWE, C. Ultrastructure of the parotid salivary gland in the greater cane rats (*Thryonomys Swinderianus*). **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 6, n. 1, p. 17, 2018.
- JAEGER, R. G.; FREITAS, V. M.. Histologia das Glândulas Salivares. In: **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**. São Paulo: Blucher, p. 227-246, 2016
- JESUS, V. C. *et al.* Influence of laser photobiomodulation (GaAlAs) on salivary flow rate and histomorphometry of the submandibular glands of hypothyroid rats. **Lasers in medical science**, v. 30, n. 4, p. 1275–1280, 2015.
- JIMÉNEZ-ANTÓN, M. D. *et al.* Syrian hamster as an advanced experimental model for visceral leishmaniasis. **Methods in Molecular Biology**, p. 303–314, 2019.
- JIN, Z.; EL-DEIRY, W. S. Overview of cell death signaling pathways. **Cancer biology & therapy**, v. 4, n. 2, p. 139–163, 2005.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica- texto e atlas**. 13ª ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2017, 556p.
- KARLOVITS, S. *et al.* Ki-67/CD3 ratio in the diagnosis of chronic inflammatory enteropathy in dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 34, n. 1, p. 92–97, 2020.
- KAYE, P. M.; BEATTIE, L. Lessons from other diseases: granulomatous inflammation in leishmaniasis. **Seminars in immunopathology**, v. 38, n. 2, p. 249–260, 2016.
- KONIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido**. 1.ed. Porto Alegre: ARTMED, 2004.
- KRISHNAN, M. *et al.* Acute radiation-induced changes in Sprague-dawley rat submandibular glands: A histomorphometric analysis. **World journal of oncology**, v. 8, n. 2, p. 45–52, 2017.

KRUEPUNGA, N. *et al.* Anatomy of rodent and human livers: What are the differences? **Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease**, v. 1865, n. 5, p. 869–878, 2019.

KUSHWAHA, V.; KAUR, S. Lymphatic filariasis and visceral leishmaniasis coinfection: A review on their epidemiology, therapeutic, and immune responses. **Acta tropica**, v. 224, n. 106117, p. 106117, 2021.

KWON, H. R. *et al.* Endothelial cell regulation of salivary gland epithelial patterning. **Development (Cambridge, England)**, v. 144, n. 2, p. 211–220, 2017.

LECLERCQ, V. *et al.* The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice: a tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. **The journal of immunology**, v. 157, n. 10, p. 4537–4545, 1996

LEWIS, S. M.; WILLIAMS, A.; EISENBARTH, S. C. Structure and function of the immune system in the spleen. **Science immunology**, v. 4, n. 33, 2019.

LI, Y. *et al.* The submandibular and sublingual glands maintain oral microbial homeostasis through multiple antimicrobial proteins. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 12, 2023.

LIMA, Á. L. M. *et al.* Changing epidemiology of visceral leishmaniasis in northeastern Brazil: a 25-year follow-up of an urban outbreak. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 111, n. 10, p. 440–447, 2017.

LIMA, I. S. *et al.* Assessment of histological liver alterations in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, 2019.

LIMA, K. S. *et al.* Efeitos do metilfenidato sobre as glândulas salivares maternas de camundongos. **Revista de odontologia da UNESP**, v. 45, n. 6, p. 316–321, 2016

LOEUILLET, C.; BAÑULS, A.-L.; HIDE, M. Study of *Leishmania* pathogenesis in mice: experimental considerations. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 144, 2016

LORÍA-CERVERA, E. N.; ANDRADE-NARVÁEZ, F. J. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 1–11, 2014.

LUTZ, A. & NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 4:84-95, 1912.

MALAFAIA, G. O sinergismo entre a desnutrição protéico-calórica e a leishmaniose visceral. **Revista Saúde.com**, v. 4, n. 2, p. 134-147, 2008

MANSY, M. *et al.* The role of exogenous epidermal growth factor on Ki-67 proliferation marker expression in the submandibular salivary gland of albino rats receiving doxorubicin. **F1000Research**, v. 9, p. 1393, 2020.

MARCILI, A. *et al.* Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania* (L.) *infantum* *chagasi* in South America. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 25, p. 44–51, 2014

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian journal of veterinary research and animal science**, v. 50, n. 5, p. 341, 2013.

MARSH P., MARTIN M. **Microbiologia Oral**. 4 ed. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2005.

MARTINS, V. T. *et al.* Preclinical assessment of the immunogenicity of experimental *Leishmania* vaccines. **Vaccine Design**. p. 481–502, 2022.

MARUYAMA, C. L. *et al.* Comparing human and mouse salivary glands: A practice guide for salivary researchers. **Oral diseases**, v. 25, n. 2, p. 403–415, 2019.

MCCARTHY, C. B. *et al.* First comparative transcriptomic analysis of wild adult male and female *Lutzomyia longipalpis*, vector of visceral leishmaniasis. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e58645, 2013.

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 8, p. 606–616, 2005.

MELBY, P. C. *et al.* *Leishmania donovani*36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 69, n. 8, p. 4719–4725, 2001.

MELLO GOMES, Á. N. *et al.* Apoptosis and proliferation during human salivary gland development. **Journal of anatomy**, v. 234, n. 6, p. 830–838, 2019.

MENON, S. S. *et al.* Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 491, p. 39–45, 2019.

MINAGI, O. H. *et al.* Morphological differences between regenerating salivary glands after salivary gland duct ligation and embryonic salivary glands. **Anatomischer Anzeiger [Annals of anatomy]**, v. 229, n. 151482, p. 151482, 2020.

MODABBERI, F. *et al.* Stereological analysis of liver, spleen and bone of *Leishmania infantum*-experimentally infected hamsters. **Experimental parasitology**, v. 228, n. 108137, p. 108137, 2021.

MOHAMMED, G. H. *et al.* Possible protective role of L-thyroxin on the parotid gland of adult male albino rat in carbimazole induced hypothyroidism: histological, histomorphometry, and ultrastructural study. **Ultrastructural pathology**, v. 46, n. 1, p. 80–95, 2022.

MOHAMMED, I. J. *et al.* Histological and biochemical evaluation of the effect of desloratadine drug in parotid gland tissues. **Al- Anbar Medical Journal**, v. 17, n. 2, p. 72–77, 2021.

MURRAY, H. W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 82, n. 5, p. 249–267, 2001.

NAKAGAKI, B. N. *et al.* Immune and metabolic shifts during neonatal development reprogram liver identity and function. **Journal of hepatology**, v. 69, n. 6, p. 1294–1307, 2018.

NANCI, A. **Ten Cate histologia oral**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 400p. 2013.

NATALE, C. C.; SEIXAS, P. M.; DE ALMEIDA, D. M. A importância dos modelos murinos na caracterização das respostas imunológicas às leishmanioses: uma revisão. **Atas de Ciências da Saúde**. v. 4, n. 3, p. 35-59, 2016.

NIETO, A. *et al.* Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus Syrian hamster model. **Veterinary research**, v. 42, n. 1, p. 39, 2011

NINCHE, N.; KWAK, M.; GHAZIZADEH, S. Diverse epithelial cell populations contribute to regeneration of secretory units in injured salivary glands. **Development (Cambridge, England)**, 2020.

OGAWA, M.; TSUJI, T. Functional salivary gland regeneration. **Organ Regeneration**. p. 135–151, 2017.

OGLE, O. E. Excision of sublingual gland. **Oral and maxillofacial surgery clinics of North America**, v. 33, n. 2, p. 161–168, 2021

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 25 sep. 2023.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas. Nº 11 (dezembro de 2022)**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/documentos/leishmanioses-informe-epidemiologico-das-americas-no-11-dezembro-2022>>. Acesso em: 25 sep. 2023.

PANDEY, N. *et al.* Detection of Leishmania DNA in saliva among patients with HIV/AIDS in Trang Province, southern Thailand. **Acta tropica**, v. 185, p. 294–300, 2018.

PARK, M. *et al.* Diagnosis and management of malignant sublingual gland tumors: a narrative review. **Gland Surgery**, v. 10, n. 12, p. 3415–3423, dez. 2021.

PATEL, V. N.; HOFFMAN, M. P. Salivary gland development: A template for regeneration. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 25–26, p. 52–60, 2014.

PATEL, V. N.; REBUSTINI, I. T.; HOFFMAN, M. P. Salivary gland branching morphogenesis. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 74, n. 7, p. 349–364, 2006.

PAULA, F. *et al.* Overview of human salivary glands: Highlights of morphology and developing processes: Overview of human salivary gland development. **Anatomical record (Hoboken, N.J.: 2007)**, v. 300, n. 7, p. 1180–1188, 2017.

PEREIRA, B. A. S.; ALVES, C. R. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Veterinary parasitology**, v. 158, n. 4, p. 239–255, 2008.

PÉREZ-CABEZAS, B. *et al.* More than just exosomes: distinct *Leishmania infantum* extracellular products potentiate the establishment of infection. **Journal of extracellular vesicles**, v. 8, n. 1, p. 1541708, 2019b.

PÉREZ-CABEZAS, B. *et al.* Understanding resistance vs. Susceptibility in visceral leishmaniasis using mouse models of *Leishmania infantum* infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, 2019a.

PEZZILLI, R. *et al.* Ki-67 prognostic and therapeutic decision driven marker for pancreatic neuroendocrine neoplasms (PNENs): A systematic review. **Advances in medical sciences**, v. 61, n. 1, p. 147–153, 2016.

PORCHERI, C.; MITSIADIS, T. Physiology, pathology and regeneration of salivary glands. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 9, p. 976, 2019.

PORROZZI, R., CAVALCANTI, A.S., CUPOLILLO, E. Modelos Experimentais na Leishmaniose Visceral. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F., and ALVES, C. R., comps. **Leishmanioses do continente americano [online]**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2014, pp. 276-292. ISBN 978-85-7541-568-9.

POULAKI, A.; PIPERAKI, E.-T.; VOULGARELIS, M. Effects of visceralising *Leishmania* on the spleen, liver, and bone marrow: A pathophysiological perspective. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 759, 2021.

PRASAD, H.; RAMESH, V.; BALAMURALI, P. Morphologic and cytomorphometric analysis of exfoliated buccal mucosal cells in diabetes patients. **Journal of cytology**, v. 27, n. 4, p. 113–117, 2010.

PROCTOR, G. B.; SHAALAN, A. M. Disease-induced changes in salivary gland function and the composition of saliva. **Journal of dental research**, v. 100, n. 11, p. 1201–1209, 2021

RACANELLI, V.; REHERMANN, B. The liver as an immunological organ. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 43, n. Supplement 1, p. S54–S62, 2006.

RANI, G. F. *et al.* Dissecting pathways to thrombocytopenia in a mouse model of visceral leishmaniasis. **Blood advances**, v. 5, n. 6, p. 1627–1637, 2021.

REIS, T. A. R. *et al.* Ivermectin presents effective and selective antileishmanial activity in vitro and in vivo against *Leishmania infantum* and is therapeutic against visceral leishmaniasis. **Experimental parasitology**, v. 221, n. 108059, p. 108059, 2021.

RIBAS, L. M. *et al.* Estimating the optimal control of zoonotic visceral leishmaniasis by the use of a mathematical model. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 810380, 2013.

ROBLEGG, E.; COUGHRAN, A.; SIRJANI, D. Saliva: An all-rounder of our body. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 142, p. 133–141, 2019.

ROCHA, R.; PEREIRA, A.; MAIA, C. Non-endemic leishmaniasis reported globally in humans between 2000 and 2021—A comprehensive review. **Pathogens**, v. 11, n. 8, p. 921, 2022.

ROCCHI, C.; EMMERSON, E. Mouth-watering results: Clinical need, current approaches, and future directions for salivary gland regeneration. **Trends in molecular medicine**, v. 26, n. 7, p. 649–669, 2020.

ROLÃO, N.; MELO, C.; CAMPINO, L. Influence of the inoculation route in BALB/c mice infected by *Leishmania infantum*. **Acta tropica**, v. 90, n. 1, p. 123–126, 2004.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! **International immunology**, v. 30, n. 3, p. 103–111, 2018.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845–858, 2002.

SAFAVI, M.; ESHAGHI, H.; HAJIHASSANI, Z. Visceral leishmaniasis: Kala-azar. **Diagnostic cytopathology**, v. 49, n. 3, p. 446–448, 2021.

SAINI, S.; RAI, A. K. Hamster, a close model for visceral leishmaniasis: Opportunities and challenges. **Parasite immunology**, v. 42, n. 10, 2020.

SAITO, H. *et al.* Reticular meshwork of the spleen in rats studied by electron microscopy. **The American journal of anatomy**, v. 181, n. 3, p. 235–252, 1988.

SAKAI, T. Development and regeneration of salivary gland toward for clinical application. **Oral science international**, v. 13, n. 1, p. 7–14, 2016.

SALGUERO, F. J. *et al.* Histopathological and immunohistochemical characterisation of hepatic granulomas in *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice: a time-course study. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, 2018.

SANTOS, A. G. A. DOS *et al.* A new target organ of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* chronic infection: The intestine. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, 2021.

SASIDHARAN, S.; SAUDAGAR, P. Leishmaniasis: where are we and where are we heading? **Parasitology research**, v. 120, n. 5, p. 1541–1554, 2021.

SCARPINI, S. *et al.* Visceral Leishmaniasis: Epidemiology, diagnosis, and treatment regimens in different geographical areas with a focus on pediatrics. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, p. 1887, 2022.

SEGATTO, M. *et al.* Genetic diversity of *Leishmania infantum* field populations from Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 1, p. 39–47, 2012.

SERAFIM, T. D.; INIGUEZ, E.; OLIVEIRA, F. *Leishmania infantum*. **Trends in parasitology**, v. 36, n. 1, p. 80–81, 2020.

SILVA, T. *et al.* Comparative evaluation of several methods for Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. **Revista brasileira de parasitologia veterinaria [Brazilian journal of veterinary parasitology]**, v. 23, n. 2, p. 179–186, 2014.

SILVA, Francinaldo S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **R Trop Ci Agr Biol**, v. 1, n. 1, p. 20–31, 2007.

SISTO, M.; RIBATTI, D.; LISI, S. Structure, morphology and signalling development mechanisms of human salivary glands. **Italian Journal of Anatomy and Embryology**, v. 124, n. 3, p. 305–318, 2019

SOM, P. M.; MILETICH, I. The embryology of the salivary glands: an update. **Neurographics**, v. 5, n. 4, p. 167-177, 2015.

SOTO, M. *et al.* Resistance to experimental visceral leishmaniasis in mice infected with *Leishmania infantum* requires Batf3. **Frontiers in immunology**, v. 11, 2020.

SUKHUMAVASI, W. *et al.* Liver- and spleen-specific immune responses in experimental *Leishmania martiniquensis* infection in BALB/c mice. **Frontiers in veterinary science**, v. 8, 2021.

SUN, X.; KAUFMAN, P. D. Ki-67: more than a proliferation marker. **Chromosoma**, v. 127, n. 2, p. 175–186, 2018.

SUZUKI, A.; OGATA, K.; IWATA, J. Cell signaling regulation in salivary gland development. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 78, n. 7, p. 3299–3315, 2021

TAGHIPOUR, A. *et al.* Leishmaniasis and trace element alterations: A systematic review. **Biological trace element research**, v. 199, n. 10, p. 3918–3938, 2021.

TAVARES, J.; SANTARÉM, N.; CORDEIRO-DA-SILVA, A. Quantification of *Leishmania* parasites in Murine models of visceral infection. **Methods in Molecular Biology**. p. 289–301, 2019.

TORRES-GUERRERO, E. *et al.* Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v.6, 2017

TREFTS, E; GANNON, M.; WASSERMAN, D. H. The liver. **Current biology: CB**, v. 27, n. 21, p. R1147–R1151, 2017.

UXA, S. *et al.* Ki-67 gene expression. **Cell death and differentiation**, v. 28, n. 12, p. 3357–3370, 2021.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 309–322, 2012

VERSTAPPEN, G. M. *et al.* Epithelial–immune cell interplay in primary Sjögren syndrome salivary gland pathogenesis. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 17, n. 6, p. 333–348, 2021.

VIEIRA, F. L. D. *et al.* Cellular profile of the peritumoral inflammatory infiltrate in squamous cells carcinoma of oral mucosa: Correlation with the expression of Ki67 and histologic grading. **BMC oral health**, v. 8, n. 1, p. 25, 2008.

VILA, T. *et al.* The power of saliva: Antimicrobial and beyond. **PLoS pathogens**, v. 15, n. 11, p. e1008058, 2019.

VOLPEDO, G. *et al.* Determinants of innate immunity in visceral leishmaniasis and their implication in vaccine development. **Frontiers in immunology**, v. 12, 2021.

WAGENAAR, G. T. *et al.* Vascular branching pattern and zonation of gene expression in the mammalian liver. A comparative study in rat, mouse, cynomolgus monkey, and pig. **The anatomical record**, v. 239, n. 4, p. 441–452, 1994.

WERNECK, G. L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Cadernos de saude publica**, v. 26, n. 4, p. 644–645, 2010

WILHELM, T. J. Viszerale Leishmaniose. **Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizen**, v. 90, n. 10, p. 833–837, 2019.

ZULFIQAR, B.; AVERY, V. M. Assay development in leishmaniasis drug discovery: a comprehensive review. **Expert opinion on drug discovery**, v. 17, n. 2, p. 151–166, 2022.

ANEXO

ANEXO: Carta de aprovação do CEUA/UFPI da referida pesquisa



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
 Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
 Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceap@ufpi.edu.br



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada *"Histopatologia e proteômica de proliferação e morte celular em camundongos BALB/c infectados com Leishmania (L.) infantum chagasi experimentalmente"*, registrada nº 719/2022, sob a responsabilidade do Prof. Dr. AIRTON MENDES CONDE JÚNIOR do Departamento de Morfologia/CCS/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 17/05/2022.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/07/2022 a 31/01/2024
Espécie/Linhagem/raça	Camundongo isogênico/ Balb/c
Nº de Animais	48
Peso/ Idade	20 a 30g/ 4s a 6s
Sexo	Machos
Origem	Biotério setorial I da UFPI - Campus Ministro Petrônio Portella
Local de alojamento dos animais durante o experimento	Biotério setorial I - Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais-NPPM/UFPI.
Grau de Invasividade	1

Teresina, 25 de Maio de 2022.

 Profa. Dra. Veruska Cavalcanti Barros
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais/UFPI.

Anexo: Comprovante de submissão do artigo na revista Archives of Oral Biology (Qualis A1)

AOB-D-24-00140 - Confirming your submission to Archives of Oral Biology

Caixa de entrada x

e

Archives of Oral Biology

para mim

14:29 (há 35 minutos)

☆

😊

↶

⋮

Traduza para o português

⚙

This is an automated message.

A infecção por Leishmania infantum altera a histoarquitetura e a expressão de proteínas nas glândulas salivares

Dear MSc Fonseca,

We have received the above referenced manuscript you submitted to Archives of Oral Biology. It has been assigned the following manuscript number: **AOB-D-24-00140**.

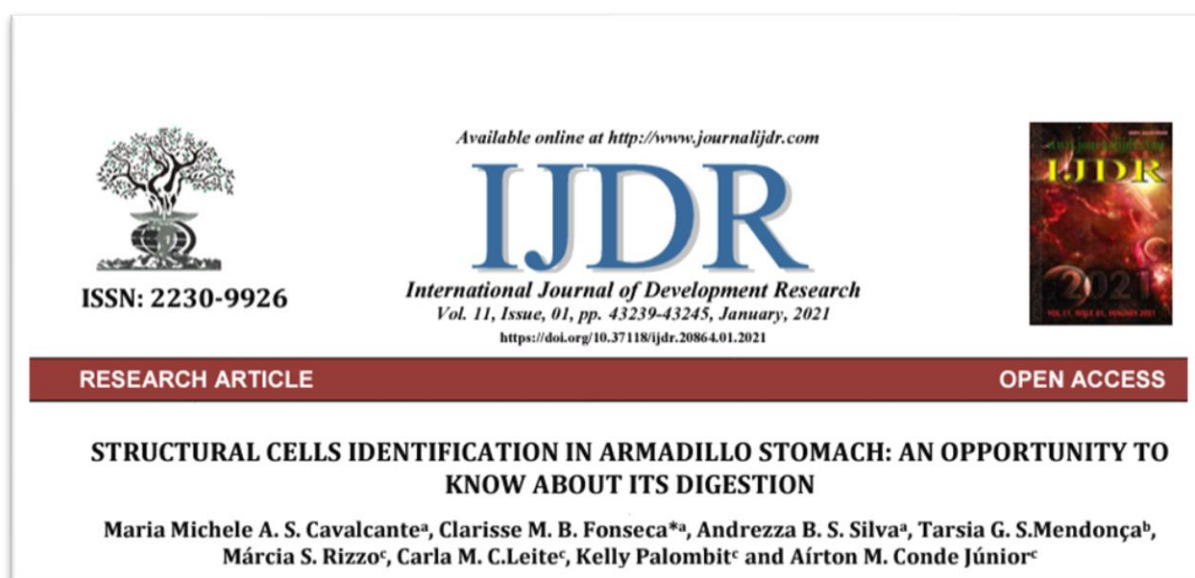
To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/aob/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Archives of Oral Biology

Archives of Oral Biology	
Leishmania infantum infection alters the histoarchitecture and expression of proteins in the salivary glands	
--Manuscript Draft--	
Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Keywords:	Microstructural change, Salivary glands, Leishmania infantum
Corresponding Author:	Clarisse Fonseca Federal University of Piaui BRAZIL
First Author:	Clarisse Fonseca
Order of Authors (with Contributor Roles):	Clarisse Fonseca (Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Supervision; Visualization; Writing – original draft; Writing – review & editing) Amanda Morais (Investigation; Methodology) Ingrid Santos (Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology) João Victor Araújo (Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Methodology; Visualization) Gabriel Barros (Data curation; Formal analysis; Methodology; Software) Felipe Oliveira (Investigation; Methodology; Validation) Fernando Amorim (Methodology; Resources) Michel Alves (Methodology; Resources) Maria do Socorro Cruz (Methodology; Resources) Aírlton Conde (Funding acquisition; Project administration; Resources; Supervision;

Anexo: Produções bibliográficas durante os 4 anos de doutorado





Structure of the parotid gland in natural infection by *Leishmania infantum* in *Canis familiaris*

Clarisse Maria Barbosa Fonseca^a , Tarsia Giabardo Silva Mendonça^a,
 Cristian Francisco de Carvalho Pereira^b, Gabriel Martins de Barros^a,
 Andrezza Braga Soares da Silva^c, Maria Michele Araújo de Sousa Cavalcante^c,
 Maria do Socorro Pires e Cruz^d, Ailton Mendes Conde Júnior^a

MICROSCOPY RESEARCH & TECHNIQUE

RESEARCH ARTICLE

Morphology of the stifle in agouti (*Dasyprocta prymnolopha*, Wagler 1831)

José Newton Fernandes da Silva Júnior, Gabriel Martins de Barros , Clarisse Maria Barbosa Fonseca, Sergio Paulo Lima Guerra, Juliana Brito Rodrigues, João Victor Silva Araújo ... [See all authors](#) ▾

First published: 08 September 2021 | <https://doi.org/10.1002/jemt.23930> | Citations: 1

VIGILÂNCIA DE DOENÇAS NEGLIGENCIADAS NA APS: Doença de Chagas, Leishmaniose Visceral e Tegumentar

Maricélia de Aquino Santana
Clarisse Maria Barbosa Fonseca
Olivia Dias de Araújo
Vagner José Mendonça

Introdução ao tema da pesquisa

As Doenças Negligenciadas (DN) são o grupo de doenças tropicais endêmicas e persistentes entre as camadas sociais mais pobres, um agravamento que ameaça a saúde dessa população. Estas resultam das limitadas ações de políticas públicas voltadas aos indivíduos de baixa renda (SILVA-PIRES *et al.*, 2017; DIAS *et al.*, 2013).

Doença de Chagas (DC), Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT) estão classificadas como DN e por décadas intensificaram crises de saúde entre a população brasileira fazendo parte da realidade nacional e apresentando a faceta de desigualdades marcadas pela vulnerabilidade social (DE SOUZA *et al.*, 2020; DIAS *et al.*, 2013). São agravos predominantes em países subdesenvolvidos, especificamente, em populações que vivem em condições precárias ou sem acesso ao saneamento básico. Essas enfermidades acarretam consequências econômicas, quando acometidos pela doença muitos dos indivíduos ficam desabilitados das suas atividades físicas e sociais, o que pode gerar impacto nos serviços de saúde (VAN-LEBERGHE; VERDONCK, 2013; BRASIL, 2020).

Embora tenham ocorrido avanços científicos no tratamento, diagnóstico e prevenção da doença, as taxas de mortalidade e morbidade continuam crescendo em todo o mundo de forma preocupante (TORRES-GUERREIROS *et al.*, 2017). É desafiador tratar as doenças negligenciadas em um cenário com forte presença de doenças infecto-parasitárias emergentes e com taxa de transmissão mundial desconhecida para a humanidade que acomete a população de países ricos e pobres. Assim como, é laborioso tratar de doenças bem conhecidas que acometem populações considera-



[Capa](#) [Sobre](#) [Acesso](#) [Cadastro](#) [Pesquisa](#) [Atual](#) [Anteriores](#) [Notícias](#)

Capa > Revista Saúde em Foco, Teresina, v. 8, n. 2, mai./ago. 2021 > **Torres**

Impactos do Isolamento Social na Biosfera / Impacts of Social Isolation in the Biosphere

Graziele Lustosa Torres, Clarisse Maria Barbosa Fonseca, Aílton Mendes Conde Júnior

PARASITOLOGIA

HUMANA E VETERINÁRIA

BRUNO M.

CAPÍTULO 12

ALTERAÇÕES MICROESTRUTURAIS EM ÓRGÃOS ALVO DA INFECÇÃO POR *L. INFANTUM*

Palavras-chave:

Alterações Microestruturais; Fígado; Órgãos Linfáticos; Leishmania sp.

CLARISSE MARIA BARBOSA FONSECA¹
AÍRTON MENDES CONDE JÚNIOR²

¹Discente - Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional, Universidade Federal do Piauí

²Docente - Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Piauí



Acta Scientiae Veterinariae, 2022. 50: 1885.

RESEARCH ARTICLE
Pub. 1885

ISSN 1679-9216

Cardiovascular System of Agouti (*Dasyprocta prymnolopha*)

Maria Michele Araújo de Sousa Cavalcante¹, Clarisse Maria Barbosa Fonseca², Andreza Braga Soares Silva¹,
Tarsia Giabardo Silva Mendonça², Sérgio Paulo Lima Guerra³, Felipe José Costa Viana⁴,
Eunice Anita Moura Fortes³, Maria Acelina Martins Carvalho⁵ & Airton Mendes Conde Junior³

Anatomia Histologia
Embryologia

World Association of Veterinary Anatomists
Association Mondiale des Anatomistes Vétérinaires
Weltvereinigung der Veterinär Anatomen
Asociación Mundial de Anatomistas Veterinarios



ORIGINAL ARTICLE

Morphology of urinary system in six-banded armadillo (*Euphractus sexcinctus*, Linnaeus, 1758)

Clarisse Maria Barbosa Fonseca✉, Tarsia Giabardo Silva Mendonça Mendonça,
Andreza Braga Soares da Silva, Maria Michele Araújo de Sousa Cavalcante ... See all authors ▾

First published: 23 May 2022 | <https://doi.org/10.1111/ahe.12817>



JORNAL INTERDISCIPLINAR DE BIOCIÊNCIAS

Homepage: <http://www.ojs.ufpi.br/index.php/jibi>

Artigo Original

Maria Michele de Sousa Cavalcante¹
Clarisse Maria Barbosa Fonseca¹
Tarsia Giabardo Silva Mendonça¹
Airton Mendes Conde Júnior¹

Structure of the stomach in the canine neonate

ABSTRACT

The stomach in the dogs is the key point among the organs of the digestive system that performs secretory and motor functions. Thus, our aim was to



Recebimento dos originais: 09/06/2022
Aceitação para publicação: 11/08/2022

Relação entre Sars-CoV-2 e animais domésticos como possíveis reservatórios: Revisão de Literatura

Relationship between Sars-CoV-2 and domestic animals as possible reservoirs: Literature Review

Amanda de Oliveira Moraes

Graduanda de Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Piauí (UFPI)
Instituição: Universidade Federal do Piauí (UFPI)
Endereço: Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Ininga,
Teresina - PI, CEP: 64049-550
E-mail: amandaoliveiraemoraiss@gmail.com

Clarisse Maria Barbosa Fonseca

Mestra em Ciências e Saúde pela Universidade Federal do Piauí (UFPI)
Instituição: Universidade Federal do Piauí (UFPI)
Endereço: Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Ininga,
Teresina - PI, CEP: 64049-550
E-mail: clarissembfonseca@gmail.com

João Victor Silva Araújo

Mestre em Ciências e Saúde pela Universidade Federal do Piauí (UFPI)
Instituição: Universidade Federal do Piauí (UFPI)



Recebimento dos originais: 09/06/2022
Aceitação para publicação: 11/08/2022

Histomorfometria de glândula salivar sublingual sob o efeito do Feijão-mungo (*Vigna radiata* L.) em modelo dislipidêmico

Histomorphometry of sublingual salivary gland under the effect of mung Bean (*Vigna radiata* L.) in a dyslipidemic model

Clarisse Maria Barbosa Fonseca

Mestre em Ciências e Saúde pela Universidade Federal do Piauí (UFPI)
Instituição: Universidade Federal do Piauí (UFPI)
Endereço: Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Ininga, Teresina - PI,
CEP: 64049-550
E-mail: clarissembfonseca@gmail.com

João Victor Silva Araújo

Mestre em Ciências e Saúde pela Universidade Federal do Piauí (UFPI)
Instituição: Universidade Federal do Piauí (UFPI)
Endereço: Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Ininga, Teresina - PI,
CEP: 64049-550
E-mail: araujo.vishin@gmail.com

Received: 21 July 2023 | Revised: 15 October 2023 | Accepted: 20 November 2023

DOI: 10.1002/jemt.24470

RESEARCH ARTICLE

MICROSCOPY
RESEARCH TECHNIQUE WILEY

Morphology of the small and large intestines of the six-banded armadillo (*Euphractus sexcinctus*) Linnaeus, 1758

Clarisse Maria Barbosa Fonseca¹ | Ingrid dos Santos Farias¹ |

João Victor Silva Araújo¹ | Rita de Cássia Viana² |

Andrezza Braga Soares da Silva³ | Maria Michele Araújo de Sousa Cavalcante⁴ |

Airton Mendes Conde Júnior⁵

**DOENÇAS
INFECCIOSAS E
PARASITÁRIAS**
Edição III

Capítulo 4

**PATOLOGIAS CUTÂNEAS E RENAIIS EM CÃES INFECTADOS POR
LEISHMANIA SPP. E TRATAMENTOS EXISTENTES**

INGRID DOS SANTOS FARIAS¹
CLARISSE MARIA BARBOSA FONSECA¹
AMANDA DE OLIVEIRA MORAES²
JONATA PAULINO DA CUNHA MONTEIRO RIBEIRO³
AIRTON MENDES CONDE JÚNIOR⁴