



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Efecto de la restricción proteica como modulador de la respuesta inmune del Tracto gastrointestinal de ratones BALB/c infectados con *Leishmania infantum***

**Felipe Andrés Gaitán Albarracín**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá, Colombia

2022



# **Efecto de la restricción proteica como modulador de la respuesta inmune del Tracto gastrointestinal de ratones BALB/c infectados con *Leishmania infantum***

**Felipe Andrés Gaitán Albarracín**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título  
de:

**Doctorado en Ciencias Bioquímica**

Directora:

Doctor en Ciencias, Química MSc

Yadi Adriana Umaña Pérez

Codirector (a):

Título (Ph.D., Doctor, Químico, etc.)

Patricia cuervo

Línea de Investigación:

Eje GH/IGF-I y Nutrición

Grupo de investigación en Hormonas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2022



# Declaración de obra original

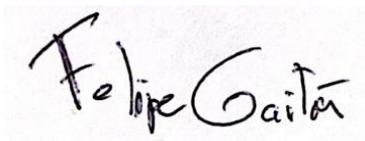
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



---

Nombre

Felipe Andrés Gaitán Albarracín

Fecha noviembre del 2022



## Resumen

La desnutrición proteica es la causa más frecuente de inmunodeficiencia secundaria que conlleva a alteraciones del sistema inmune innato y adaptativo, generando la colonización y proliferación de agentes patogénicos, convirtiéndose en uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de formas clínicas de leishmania visceral (LV).

Usando como modelo biológico ratones BALB/c, nuestro grupo de investigación mostró que animales sometidos a restricción proteica e infección con *L. infantum*, presentan graves atrofiaciones en órganos linfoides, alteraciones en las subpoblaciones de linfocitos T y en niveles de expresión de factores quimiotácticos en timo y bazo. Esas alteraciones sugieren que una precondition de desnutrición proteica afecta la respuesta inmune frente a *L. infantum*, modificando la migración de células T y la capacidad de controlar la proliferación de parásitos.

Aunque un patrón de diseminación y respuesta inmune órgano específica aún no ha sido claramente elucidado para el tracto gastrointestinal, algunos estudios reportan la aparición de estos parásitos en mucosa intestinal.

Nuestro objetivo fue evaluar la influencia de la restricción proteica en la respuesta inmune en tracto gastrointestinal de ratones BALB/c frente a la infección con *L. infantum*, observando como la infección y desnutrición generaron alteraciones inmunes en función del reclutamiento linfocitario tisular, alteraciones estructurales del tejido intestinal y alteraciones en la respuesta inmune adaptativa celular mediada por citoquinas y humoral a través de la secreción de Inmunoglobulina A de forma diferencial para el intestino delgado y grueso.

**Palabras clave:** IgA; *Leishmania infantum*; duodeno; GUT; inflamación; malnutrición; leishmaniasis visceral.

## **Effect of protein restriction as a modulator of the immune response of the gastrointestinal tract of BALB/c mice infected with *Leishmania infantum***

### **Abstract**

Protein malnutrition is the most frequent cause of secondary immunodeficiency that leads to alterations of the innate and adaptive immune system, generating the colonization and proliferation of pathogenic agents, becoming one of the main risk factors for the development of clinical forms of visceral leishmaniasis (VL). Using BALB/c mice as a biological model, our research group showed that animals subjected to protein restriction and infection with *L. infantum* present severe atrophies in lymphoid organs, alterations in T lymphocyte subpopulations and in expression levels of chemotactic factors in thymus and spleen. These alterations suggest that a precondition of protein malnutrition affects the immune response against *L. infantum*, modifying the migration of T cells and the ability to control the proliferation of parasites. Although a pattern of dissemination and organ-specific immune response has not yet been clearly elucidated for the gastrointestinal tract, some studies report the appearance of these parasites in the intestinal mucosa. Our objective was to evaluate the influence of protein restriction on the immune response in the gastrointestinal tract of BALB/c mice against infection with *L. infantum*, observing how infection and malnutrition generated immune alterations based on tissue lymphocyte recruitment, structural alterations of the intestinal tissue and alterations in the cellular adaptive immune response mediated by cytokines and humoral through the secretion of Immunoglobulin A differentially for the small and large intestine.

**Keywords: IgA; *Leishmania infantum*; duodenum; gut; inflammation; malnutrition; visceral leishmaniasis.**

# Contenido

	Pág.
1. Marco teórico.....	3
2. Metodología.....	23
3. Resultados.....	28
4. Discusión.....	51
5. Conclusiones y recomendaciones.....	57

## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1-1:</b> Ciclo de vida <i>Leishmania</i> spp.	<b>4</b>
<b>Figura 1-2:</b> Representación estructural y repertorio inmune de dos secciones del tracto gastrointestinal	<b>13</b>
<b>Figura 1-3:</b> Mapa de distribución malnutrición global y regiones endémicas para LV	<b>21</b>
<b>Figura 0-1:</b> Representación esquemática del diseño experimental.	<b>23</b>
<b>Figura 3-2:</b> Efecto de la restricción proteica en los parámetros morfométricos y nutricionales de ratones BALB/c desnutridos e infectados con <i>L. infantum</i> .	<b>29</b>
<b>Figura 3-2:</b> Alteraciones tisulares del intestino en los animales BALB/c desnutridos e infectados con <i>L. infantum</i> .	<b>31</b>
<b>Figura 3-3:</b> Variación en la concentración de citoquinas Pro y Anti - inflamatorias en duodeno y colon de los animales BALB/c desnutridos e infectados con <i>L. infantum</i> .	<b>33</b>
<b>Figura 3-4:</b> Niveles de expresión relativa de citoquinas en el duodeno y colon de los animales BALB/c desnutridos e infectados con <i>L. infantum</i> .	<b>35</b>
<b>Figura 3-5:</b> Análisis y cuantificación de los niveles séricos de IgA y secretados para duodeno y colon junto a la distribución de IgA en duodeno de los animales BALB/c desnutridos e infectados con <i>L. infantum</i> .	<b>37</b>

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 0-1:</b> Descripción general de los genes evaluados por qPCR.	<b>25</b>
<b>Tabla 0-2:</b> Alteraciones microscópicas observadas en intestino de ratones BALB/c sometidos a restricción proteica e infección con <i>L. infantum</i> .	<b>26</b>



## Introducción

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades causadas por protozoarios del género *Leishmania*, transmitidas por medio de vectores flebótomos hematófagos infectados [1]. En humanos, dependiendo de la especie del parásito infectante y el estado inmune del hospedero, se observan distintas formas de la enfermedad, tales como: lesiones ulcerativas en la piel (leishmaniasis cutánea), inflamación destructiva de las mucosas orofaríngeas (leishmaniasis mucocutánea) e infección visceral diseminada (leishmaniasis visceral) [2]. La leishmaniasis visceral es la forma más severa de la enfermedad y constituye una condición potencialmente fatal cuando no existe una intervención terapéutica. La LV es causada esencialmente por dos especies: *Leishmania donovani* y *Leishmania infantum* [3]. La desnutrición proteica es considerada un factor de riesgo primario para el desarrollo de LV en niños y adultos [4] y reconocida por la Organización Mundial para la salud (OMS) como un importante factor de riesgo epidemiológico para la enfermedad [5]. Sin embargo, las bases inmunológicas de esta interacción son desconocidas en su mayoría. El estatus nutricional del hospedero modula la respuesta inmune frente a infecciones, debido a la alta demanda de producción, activación y movilización de células específicas [6]. Se ha mostrado que la desnutrición puede originar defectos en la producción y movilización de células del sistema inmune en respuesta a la inflamación o frente a un agente infeccioso [7]. La desnutrición afecta múltiples órganos, entre ellos los tejidos linfoides del timo, bazo, nódulos linfáticos y médula ósea.

Losada y cols mostraron los efectos de la restricción proteica sobre órganos linfoides de ratones infectados con *L. infantum*, destacando la disminución en nivel de citoquinas tales como IL1 $\alpha/\beta$ , IGF1, IL12, y las quimioquinas CCL5, CXCL12, CXCL9 y CXCL10 en animales infectados. Esto sugiere que una precondición de restricción proteica afecta la

respuesta inmune frente a *L. infantum*, alterando la migración de células T e interfiriendo con la capacidad de controlar la proliferación de parásitos en bazo [8].

El intestino es considerado un órgano privilegiado del sistema inmune a causa de la interacción compleja entre el microbioma intestinal, antígenos y la barrera epitelial intestinal. A través de esta barrera, se secretan mediadores inmunes que regulan y promueven la agregación de células presentadoras de antígenos, células tolerogénicas inmunes innatas fagocitarias y células de regulación del sistema inmune adaptativo [9] mediante una interacción compleja que mantiene la homeostasis intestinal [10].

La presencia de *L. donovani* en los tejidos intestinales de mamíferos ha sido reconocida desde la época de los primeros reportes de la leishmaniasis como enfermedad [11]. Barati y cols revelaron que un 12% de los pacientes con LV mostraron alteraciones gastrointestinales [12, 13], otros estudios mostraron deficiencia en la absorción de vitamina A; posiblemente secundaria a parasitismo en las vellosidades intestinales, así como por la diarrea [14, 15]. Kleber y cols. en su estudio del 2010 de casos y controles incluyendo 13 pacientes con LV revelaron una disminución en varias citoquinas, aumento de marcadores CD68 de macrófagos y de linfocitos CD4 en el duodeno, junto a un aumento en el tamaño de las criptas intestinales y una atrofia leve de las vellosidades. Estos hallazgos podrían atribuirse a una inmunotolerancia del tejido a *Leishmania* [13]. A pesar de esto, un patrón de respuesta inmune órgano-específica aún no está claramente elucidada en el tracto gastrointestinal (TGI) y aún menos información en un modelo de desnutrición e infección. Este estudio busco relacionar si la restricción proteica asociada a infección con *L. infantum* genera alteraciones estructurales o funcionales en el intestino delgado y grueso, mediadas por una desorganización en la arquitectura intestinal o alteración en la inmunidad adquirida mediadas por citoquinas e IgA, que desencadenen una respuesta inmune ineficaz contra el parásito, llevando a un proceso de visceralización intestinal.

# 1. Marco teórico

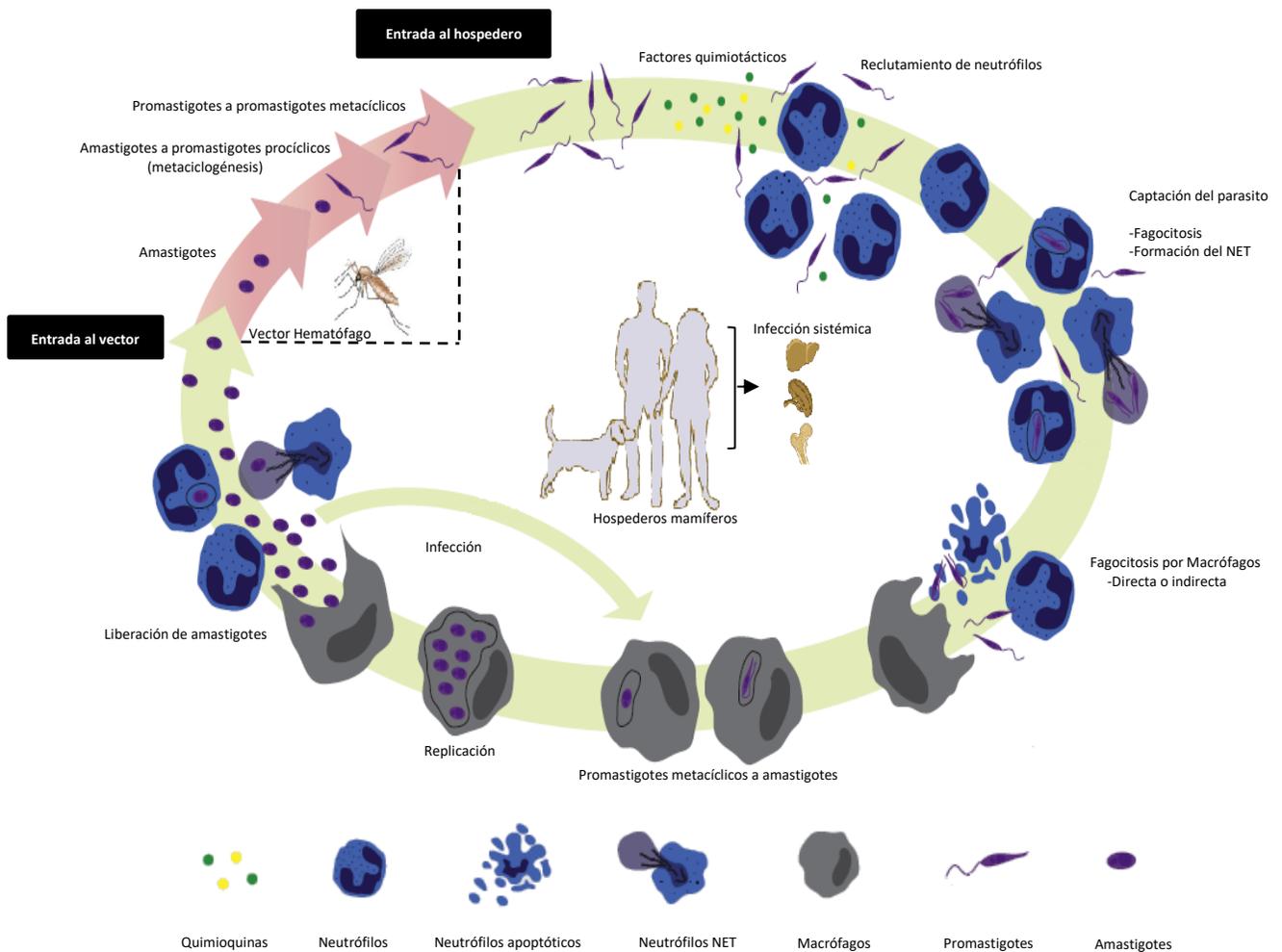
## 1.1 Generalidades de la Leishmaniasis

### 1.1.1 Aspectos etiológicos de la enfermedad

La leishmaniasis (o leishmaniosis) son un grupo complejo y heterogéneo de enfermedades parasitarias causadas por protozoarios del Orden Trypanosomatida (Kent, 1880), Familia Trypanosomatidae (Döflein, 1901) y Género *Leishmania* (Ross, 1903). Dentro de este género, se han identificado aproximadamente 30 especies que pueden infectar a mamíferos (caninos, roedores, marsupiales o seres humanos, entre otros) [16] de las cuales 20 especies resultan patogénicas para humanos, estableciéndose la posibilidad de ser transmitidas de forma antroponótica o zoonótica a través de vectores flebótomos que pertenecen predominantemente a los géneros *Phlebotomus* (viejo mundo) y *Lutzomyia* (nuevo mundo) [17, 18]. Las diferentes especies de leishmania (*Leishmania* spp.) presenta un ciclo de vida digenético, en el cual experimentan cambios morfológicos que aseguran su adaptación y consecuente supervivencia tanto en el vector como en el hospedero, alternando entre dos formas principales; Una forma promastigote flagelada (móvil) -extracelular que se desarrolla y multiplica en el tracto digestivo del vector, alojándose entre las microvellosidades intestinales que recubren el lumen [19]. Durante su etapa como promastigote y a medida colonizan el intestino del vector, el parásito experimenta un proceso de transformación denominado “metaciclogénesis” en el cual experimenta cambios morfológicos, genéticos y bioquímicos que finalizan cuando alcanza el estadio de promastigote metacíclico el cual resulta ser altamente infectivo para el hospedero en comparación a su estadio como promastigote procíclico el cual es poco o no infectivo [20]. En el hospedero, una forma amastigote aflagelada (inmóvil) -intracelular, convierte a *Leishmania* spp. en un parásito intracelular obligado del hospedero. Por medio de la picadura y durante el proceso de alimentación del vector, los promastigotes metacíclicos son inoculados a través de la piel del hospedero, donde

*Leishmania* spp. infecta y subsiste dentro del hospedero colonizando diferentes tipos celulares provenientes del linaje mieloide (Neutrófilos, Macrófagos (Mφ), Células Dendríticas (CD)) o no mieloideas como fibroblastos [21]. Dentro del repertorio celular que *Leishmania* spp. pueden infectar, los Mφ actúan como los principales reservorio de la infección, en los cuales los parásitos logran diferenciarse a su forma amastigote que se replica hasta romper las células liberando más amastigotes al torrente sanguíneo donde pueden ser nuevamente fagocitados por otros Mφ o CD [22], favoreciendo un evento de infección sistémica o ser ingeridos por un nuevo vector, completando así su ciclo de vida (Figura 1-1).

**Figura 1-1:** Ciclo de vida *Leishmania* spp.



### 1.1.2 Aspectos epidemiológicos de la enfermedad

La leishmaniasis cuenta con una extensa distribución geográfica, presente en todos los continentes a excepción de la antártica, afectando actualmente a cerca de 12 millones de personas a nivel mundial con un incremento anual estimado de 0.7 a 1.5 millones de nuevos casos ([Leishmaniasis \(who.int\)](http://www.who.int)). Con base en la información dispuesta por la Organización Mundial para la Salud, la leishmaniasis es una enfermedad endémica de áreas tropicales y subtropicales en las cuales se estima que alrededor de 350 millones de personas que residen en cerca de 98 países, viven bajo el riesgo constante de contraer alguna de las formas descritas de la enfermedad [23, 24]. A pesar de ser una de las enfermedades parasitarias con mayor incidencia, prevalencia y distribución geográfica, la leishmaniasis hace parte del grupo de enfermedades tropicales desatendidas (NDT, por su siglas en inglés), grupo en el cual se posiciona como la segunda causa más común de muertes y la cuarta en contagios, desencadenado secuelas permanentes para la salud en cerca de 2 millones de personas en base a los años de vida ajustados por la incapacidad (DALY, por sus siglas en inglés) con mayor impacto en poblaciones bajo condiciones socioeconómicas precarias (pobreza y malnutrición), principalmente de países en desarrollo caracterizados por un acceso limitado a la salud y tratamientos [25, 26]. A pesar de que la leishmaniasis es una enfermedad históricamente asociada a áreas tropicales y subtropicales, existen varios factores que contribuyen con la diseminación del parásito hacia áreas no endémicas, en las que se incluye el cambio climático, la deforestación, urbanización y los movimientos migratorios hacia y desde áreas endémicas [27-29], convirtiendo de esta forma a la leishmaniasis en un problema de salud pública.

### 1.1.3 Clasificación de la leishmaniasis

La leishmaniasis a través de su historia ha sido descrita según la interacción entre el vector de trasmisión y su distribución geográfica, diferenciándolas entre la leishmaniasis del viejo mundo o nuevo mundo. No obstante, la forma más frecuentemente usada para clasificar la leishmaniasis se basa en las diversas manifestaciones clínicas que pueden llegarse a presentar, a pesar de la estrecha relación entre los parásitos [30]. Teniendo en cuenta la especie infectante y la respuesta inmune desencadenada por el hospedero tras la infección, existen tres formas principales de leishmaniasis.

- *Leishmaniasis Cutánea (LC)*: Es la forma menos grave de leishmaniasis, que se desarrolla tras un periodo de incubación que oscila desde un par de semanas hasta algunos meses. La LC se manifiesta clínicamente por la aparición de pápulas en el sitio de la picadura que posteriormente progresan a lesiones tegumentarias ulcerativas focalizadas o difusas con una tendencia en la mayoría de los casos hacia la resolución espontánea al cabo de varios meses [31]. Adicionalmente, es la forma más comúnmente reportada de la enfermedad (0.7-1) millones de casos anuales, siendo endémica de 89 países, de los cuales solo siete países (Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, Iraq, Pakistán y la República Árabe de Siria) contribuyen con casi el 80% de casos a nivel mundial, con una mayor incidencia en la región oriental del mediterráneo (~70% de los nuevos casos) y América (~20% de los nuevos casos)[23].
- *Leishmaniasis mucocutánea (LMC)*: Presenta un periodo de incubación de algunos meses durante los cuales pueden o no desarrollarse afecciones cutáneas iniciales que eventualmente se curaran [31]. LMC tiene la tendencia a ocurrir de uno a cinco años posteriormente a la resolución de la infección inicial, debido a la diseminación linfática del parásito [32]. Las principales manifestaciones clínicas se caracterizan por la destrucción parcial o total de las mucosas orofaríngeas (cavidad oral, faringe y laringe) y la tráquea, resultando en síntomas de obstrucción nasal y sangrado [32, 33] . Esta forma de leishmaniasis se presenta principalmente en sujetos mayores o inmunocomprometidos y al ser poco frecuente, se ha identificado que el 90% de los casos ocurren en Brasil, Bolivia, Perú y Etiopía [23].
- *Leishmaniasis visceral (LV)*- también conocida como Kala-azar: Es la forma más severa de la enfermedad que resulta potencialmente fatal en el 95% de casos, si no se efectúa alguna intervención terapéutica. El curso de la infección puede abarcar semanas o años, siendo en la mayoría de los casos evidente desde el segundo al sexto mes post infección. La LV es una enfermedad que afecta principalmente a personas con algún grado de vulnerabilidad; niños menores de 5 años, adultos mayores y pacientes con morbilidad-asociada (comorbilidad) de inmunosupresión (VIH/SIDA) y desnutrición, entre otras [34]. Se caracteriza por ser una infección diseminada visceralmente, la cual invade predominantemente órganos del sistema reticuloendotelial (Bazo, Hígado, médula ósea y tejidos

linfoides) provocando en ellos algún tipo de disfunción. Se estima que anualmente ocurren entre 50.000 a 90.000 nuevos casos de LV distribuidos predominantemente en 79 países considerados endémicos para LV, reportándose la mayoría de nuevos casos en África (34%), la región oriental del mediterráneo (29%) y América (16%) [23]. Con base en la información de la Organización Panamericana de la salud, la LV es endémica en 13 países de las Américas con un promedio aproximadamente desde 2001 al 2020 de 3500 nuevos casos por año, los cuales ocurren mayoritariamente en Brasil [34].

En el contexto colombiano, según la información dispuesta por el Instituto Nacional de salud (INS) a través del sistema de vigilancia en salud pública (Sivigila), como entidad encargada de recopilar la información epidemiológica de enfermedades transmitidas por vectores, reportó para el año 2016 un total de 10.743 casos de leishmaniasis, de los cuales la forma más común de la enfermedad fue la LC con 10.561 casos (98%), seguida por 122 casos de LMC, que afectaron en su mayoría a hombres (78.9%) entre 15-44 años (70%) y 60 casos de LV en los cuales se identificó como la población más vulnerable a niños entre 1-4 años de edad o mayores. En comparación con los años siguientes, se observó una disminución en los índices para la enfermedad hasta el año 2019, en el cual se reportaron 3.760 casos de leishmaniasis [35], infortunadamente para el año 2021 se reportaron 5.177 casos de leishmaniasis con predominancia de LC [36]. Con base en la distribución geográfica de las especies causantes de leishmaniasis en Colombia, las especies más ampliamente distribuidas a través del territorio nacional son *L. (Viannia) panamensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. mexicana* y *L. infantum* presentes en 26, 19, 12 y 8 departamentos, respectivamente [37]. Dentro de los departamentos en los cuales se ha identificado a *L. infantum* como agente etiológico para LV, se han establecido los departamentos de Bolívar y Sucre como de muy alto riesgo de contagio junto a Córdoba, Huila y Tolima de alto riesgo, en los cuales se han establecido como principales reservorios a *Cannis familiaris*, *Didelphis marsupialis* y el humano, y como vectores exclusivos a *L. longipalpis* y *L. evansi*, los cuales presentan un límite de distribución altitudinal desde el nivel de mar hasta 1750 metros sobre nivel del mar (msnm).

## **1.2 Leishmania Visceral (LV)**

### **1.2.1 Manifestaciones clínicas**

Durante los estados tempranos de la infección por LV se han descrito síntomas como dolor de cabeza, episodios febriles por periodos largos, escalofríos, sudoración, diarrea, vómito, sangrado de encías y dolor articular. Estas manifestaciones son observadas en el 80-90% de los pacientes que la padecen; otros pacientes que desarrollan respuesta inmune, no manifiestan síntomas de la enfermedad [38].

Como parte de la visceralización del parásito, éste invade fagocitos mononucleares del hígado, bazo, médula ósea y nódulos linfáticos, causando pérdida de la arquitectura y organización de estructuras linfoides, como agrandamiento del hígado (hepatomegalia), bazo (esplenomegalia, atrofiadas en la pulpa blanca e hipergamaglobulemia policlonal), pérdida de funcionalidad de la médula ósea (pancitopenia) y caquexia caracterizada por anemia y pérdida de peso [38-41].

## **1.3 Interacción Hospedero – Patógeno en LV**

El éxito de la eliminación de la infección con LV por parte del hospedero depende de la acción coordinada de varias barreras defensivas del sistema inmune innato y adaptativo. Desde la entrada del parásito al torrente sanguíneo hasta su último destino en órganos primarios, ocurren diversos choques entre el parásito y elementos del sistema inmune del hospedero, direccionando la infección hacia su resolución y eliminación, o el establecimiento y prevalencia de la enfermedad en casos en donde la *Leishmania* evade el arsenal inmunológico del hospedero [42].

### **1.3.1 Respuesta sistémica del hospedero a la LV**

El primer contacto entre el hospedero y el parásito se da a través de la picadura. En conjunto los parásitos y la saliva de la mosca contienen sustancias anticoagulantes y vasodilatadoras (Maxadilan) que buscan inhibir la respuesta microbicida favoreciendo la exacerbación de la *Leishmania* [25, 42].

Una vez los parásitos se encuentran dentro del hospedero la secreción de alarminas como IL-33, señales moleculares de daño tisular, citoquinas y quimioquinas estimulan el reclutamiento de neutrófilos como primera línea de defensa. El reconocimiento de factores de virulencia como la metaloproteasa gp63, induce que estas células actúen mediante la producción de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), elastasas de neutrófilos y especies reactivas de oxígeno (ROS) cuando los parásitos son fagocitados. Los neutrófilos infectados con promastigote pueden secretar quimioquinas como IL-8 o IL-17 y proteínas inflamatorias de macrófagos (MIP)-1 $\beta$ , que juegan un papel crítico en el reclutamiento de más neutrófilos o macrófagos al sitio de infección [25, 43]. Si el parásito logra establecerse y evadir la respuesta de los neutrófilos estos se convierten en un “Caballo de Troya” ayudando a los promastigotes a entrar de forma silenciosa en los macrófagos cuando los cuerpos apoptóticos de los neutrófilos son reconocidos y fagocitados por los macrófagos [38].

Una vez los parásitos logran entrar en los tejidos del hospedero y difundirse a través del sistema retículo-endotelial, los macrófagos llamados al sitio de la infección o residentes de los diferentes órganos blanco (hígado, bazo o médula ósea), constituyen la segunda ola celular que entra en contacto con los parásitos. Esta interacción es mediada por moléculas de superficie en la membrana del parásito tales como gp63, lipofosfoglicano (LPG), proteasas de superficie en promastigotes (PSP) y glicosilinositolfosfolípidos (GPIs), en promastigote y amastigotes. Esta interacción se da a través de receptores de membrana como: 1) Receptores para la subunidad 3 del sistema complemento, 2). Receptores FC, 3) Receptores de lectinas y 4) Integrinas [44]. La proteína C3d actúa como opsonina que se une a *Leishmania* y promueve su absorción a través de receptores CR1 por parte del macrófago; gp63 en macrófagos puede convertir C3d en C3d inactiva (iC3d) que interactúa con CR3, lo cual inhibe consecuentemente la formación de C5b-9 y la formación del complejo de ataque a membrana (MAC) favoreciendo la fagocitosis del parásito sin que ocurra un evento lítico subsecuente.

Los promastigotes fagocitados por los macrófagos son resistentes a la proteólisis y degradación en el proteosoma gracias a la producción de fosfatasa ácida que inhibe la lisis celular. *Leishmania* también puede resistir el ataque lisosomal a través de bombas de protones que mantiene el pH intracelular neutro, igualmente el LPG juega un papel activo en la inhibición de enzimas lisosomales. Dentro del macrófago, *Leishmania* reside

como amastigote. Una vez la infección se establece en los macrófagos, exhibe características propias de células lisosomales (endosomas tardías) como una membrana enriquecida con proteínas LAMP 1-2, rab7 macrosialina y receptores de manosa 6 fosfato catión independiente que resulta en la disminución de la respuesta inmunológica [43-46].

- **Respuesta hepática a la Infección y prevalencia de LV**

El hígado es el sitio en el que la infección se manifiesta en fase aguda y puede ser resuelta por el hospedero. Durante esta fase, se presenta poco daño tisular y el hospedero se vuelve resistente a la reinfección. El control hepático de la infección es dependiente de la formación de granulomas [46]. Las células de Kupffer (KC) son las primeras células infectadas por los amastigotes y en respuesta a citoquinas como CCL2, CCL3 y CXCL10 se da un reclutamiento subsecuente de monocitos, neutrófilos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, lo que genera un control efectivo del crecimiento del parásito. En particular las células T CD4<sup>+</sup> que han sido activadas por células dendríticas (CD) productoras de IL-12, citoquina crítica para este proceso, inducen la producción de más citoquinas proinflamatorias incluidas IFN- $\gamma$ , TNF y linfotóxina alfa (LT $\alpha$ ). Estas citoquinas pueden aumentar el reclutamiento de KC, así como mecanismos microbicidas en estas células. Estas citoquinas encaminan la respuesta inmune hacia un fenotipo Th1, promoviendo la inmunidad innata mediada por células, a través de la activación de factores efectoros de células Natural Killer (NK) requeridos para la estimulación de moléculas con actividad leishmanicida. La IL-4 de tipo Th2 se requiere para la resolución de la infección y el “priming” de CD8<sup>+</sup> para la protección a tiempo largos [46-48].

Numerosas citoquinas inmunoregulatorias son producidas durante el desarrollo del granuloma, citoquinas que permiten mantener la inmunidad en el hígado y prevenir inmunopatologías asociadas. Dentro de este proceso IFN- $\gamma$  estimula la activación de KC vía inducción del sistema NADPH oxidasa y el óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), lo que conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) e intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI), que llevan a la muerte intracelular de las formas amastigotes del parásito [49, 50].

Las citoquinas como IL-10, TGF- $\beta$  e IL-27 pueden suprimir el control de la infección con LV. La actividad de IL-10 incluye la supresión de la actividad de macrófagos, de la

migración de células dendríticas y de la respuesta Th1. TGF- $\beta$  se asocia con inmunosupresión y la ausencia de IL-27 se ha relacionado con la regulación de la inflamación durante LV [47, 50].

- **Establecimiento de LV y compromiso estructural del bazo**

El bazo constituye un sitio clave en la inmunidad contra diversas infecciones sistémicas. En mamíferos, el bazo es un órgano altamente organizado que durante los estadios tempranos de la infección es estructuralmente estable y participa de manera activa en la generación de la respuesta inmune. Brevemente, este tejido está constituido por la pulpa roja y la pulpa blanca, separadas por una zona marginal (ZM). La pulpa blanca está compuesta por células B foliculares y áreas de células T que rodean la arteria central vaina linfática periarterial (PALS). Por otra parte, los macrófagos esplénicos están estratégicamente distribuidos en tres poblaciones: Macrófagos de la pulpa roja, macrófagos de zonas marginales (MZMs) y macrófagos metalofilicos marginales (MMM). Se estima que cerca del 95% de los parásitos que llegan al bazo son fagocitados por miembros de estas poblaciones. Cerca del 50% del inóculo inicial de parásitos es eliminado por MZMs en las primeras 24h post- inoculación. La eliminación de los parásitos al interior del fagosoma de MZMs y MMMs requiere el reclutamiento del factor regulatorio de interferón (IRF-7), que induce mecanismos leishmanicida independientes de ROS [41, 47].

En el bazo, las células dendríticas que migran a las PALS junto a las células T inducen la producción de IL-12, con el fin de iniciar una respuesta de tipo celular protectora. En las células T CD4<sup>+</sup>, la IL-12 induce una señal a través de factores de transcripción tipo STAT que resulta en la inducción de otros factores de transcripción, como el factor T-box 21. Este incrementa la expresión del receptor para IL-12, promoviendo la diferenciación de Th1 (13). Con la progresión de la infección, las DC pueden producir otras citoquinas como IL-6, IL-23p19 (IL-23) y TGF- $\beta$ , que a su vez promueven la diferenciación de Th17 a partir de células T CD4<sup>+</sup>. En ratones se ha observado que este linaje de células T actúa sinérgicamente con IFN- $\gamma$  para potenciar la producción de óxido nítrico en macrófagos infectados con *Leishmania* [41, 43].

En el bazo se da la fase crónica de la infección, caracterizada por niveles elevados de IL-10, citoquina que actúa como la mayor molécula mediadora de defectos inmunológicos

en este tejido. La IL-10 puede llegar a desactivar la maquinaria de los macrófagos para eliminar el parásito regulando la expresión de moléculas estimuladoras de macrófagos y complejo mayor de histocompatibilidad (MHCs). Igualmente puede disminuir la producción de IFN- $\gamma$  en células T o inhibir la migración de DC hacia las PALS. Durante la LV diferentes tipos celulares se han identificado como fuentes de IL-10 entre los que se encuentran las células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, Células B, NK, macrófagos y DC [51].

Aunque como se mencionó previamente uno de los síntomas más relevantes de la LV es la esplenomegalia, no es el único cambio presente en bazo por efecto de la parasitemia. El bazo sufre alteraciones en su microestructura, cambios que incluyen una desorganización de la pulpa blanca, hipertrofia de la pulpa roja y disrupciones en las zonas marginales. En la pulpa blanca se observa la desaparición de los centros germinales (CG) y colapso de los PALS, eventos mediados por TNF, quien además media la depleción de poblaciones de macrófagos de las ZMs, células dendríticas foliculares (FDC) y células B foliculares. La pérdida de FDC y CG impide la interacción entre células B y células T ayudadores foliculares, las cuales son necesarias para la producción de anticuerpos específicos neutralizantes de los parásitos de *Leishmania* [41, 47].

## **1.4 Visceralización en el tracto gastrointestinal de LV**

La dinámica hospedero - patógeno con LV no solo se caracteriza por su respuesta inmune como se mencionó anteriormente. En pacientes inmunocomprometidos el curso normal de la infección puede verse modificado donde las manifestaciones clínicas de la LV pueden ser similares o no independientemente del tipo de inmunosupresión como ocurre en pacientes VIH positivos, sin embargo, se puede observar presentaciones clínicas atípicas de la infección caracterizada por la aparición de parásitos en sitios inusuales como en la mucosa gastrointestinal distribuidos en secciones puntuales del intestino humano, acompañado de la aparición de diferentes afecciones intestinales como el síndrome de malabsorción [52].

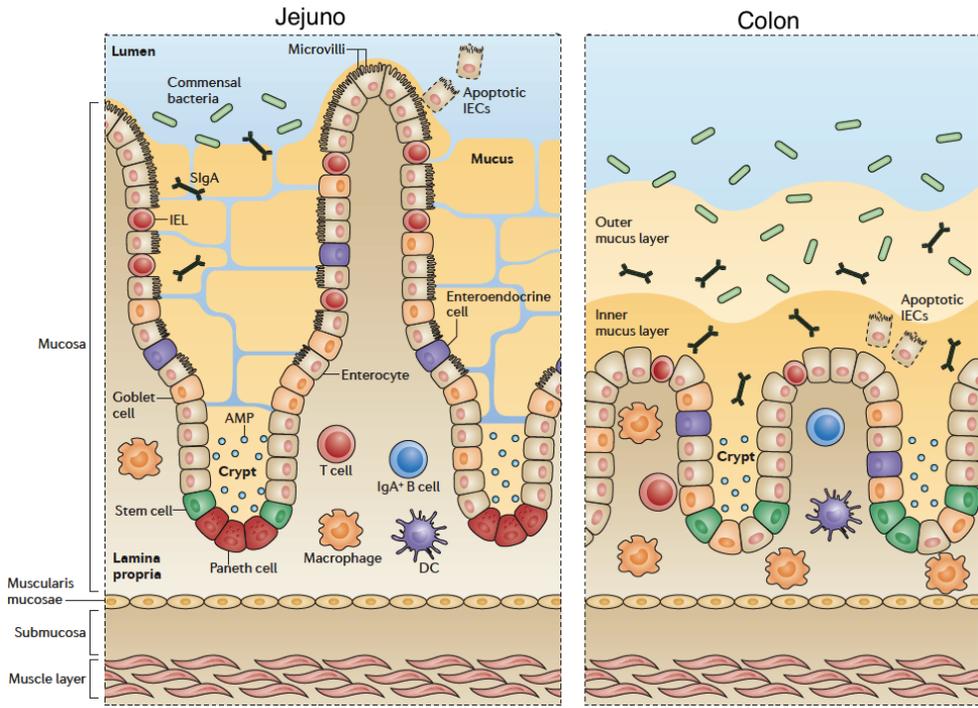
### 1.4.1 Sistema inmune del tracto gastrointestinal

El tracto gastrointestinal está dividido en esófago, estómago e intestino delgado y grueso. El intestino delgado comienza en el píloro y termina en la válvula ileocecal (punto de entrada del intestino grueso). El intestino delgado está dividido en tres segmentos: el duodeno es el segmento más cercano al estómago, seguido encontramos el jejunio y posteriormente el íleon [53]. El intestino grueso inicia con el cecum, seguido por el colon ascendente (proximal), el colon transversal, el colon descendente (distal) y finalmente con el recto y ano. Estructuralmente una de las mayores diferencias entre los intestinos es su tamaño, siendo el intestino delgado más largo y con un diámetro menor, en comparación con el colon [53].

La mayoría de los procesos inmunológicos del intestino tienen lugar en la mucosa, la cual comprende el epitelio intestinal, la lámina propia subyacente y la mucosa muscularis o capa muscular delgada debajo de la lámina propia (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) [53].

**Figura 1-2:** Representación estructural y repertorio inmune de dos secciones del tracto gastrointestinal

Células intestinales epiteliales (IEC), Péptidos antimicrobianos (AMP), Linfocitos intraepiteliales (IEL), Inmunoglobulina A secretada (SIgA). Tomado y modificado de [53].



- **Epitelio intestinal**

Los intestinos son el hogar de numerosas poblaciones celulares especializadas originadas a partir de células madre multipotentes dispuestas en una capa simple conformando el epitelio intestinal, constituyendo igualmente una vasta red de tejidos linfoides secundarios y no linfoides. La conformación de este epitelio varía localmente según los diferentes segmentos del intestino y generalmente se pueden encontrar poblaciones celulares con funciones de absorción y secreción, donde encontramos, enterocitos absortivos, coloncitos, células endocrinas de Goblet y células de Paneth, entre otras. Las células de Goblet constituyen el menos el 25% de todas las células epiteliales del colon distal, en comparación con su disposición en aproximadamente el 10% de los segmentos superiores del intestino delgado y junto a las células de Paneth distribuidas principalmente en el íleon, participan en la producción de una capa impermeable (moco) que actúa como barrera física: protegiendo el epitelio de los ácidos gástricos o secreciones duodenales y barrera antimicrobiana limitando infecciones parasitarias o promoviendo el mutualismo bacteriano, controlada por mediadores inmunes en los que se incluyen IL-9, IL13 y el TNF- $\gamma$  [54, 55]. Se ha identificado que defectos en la síntesis del moco puede llevar a un incremento en la permeación de

bacterias comensales en las superficies epiteliales llevando a una mayor susceptibilidad a afecciones intestinales. De forma independiente estas células participan en la producción de péptidos antimicrobianos como lisozimas y defensinas en respuesta a la presencia de IL-22 posterior a la estimulación de receptores “Toll-like” (TLRs) o gracias a la expresión de receptores para el reconocimiento de patrones moleculares (PRPs), se desencadena la producción y activación de mediadores que reclutan y activan células del sistema inmune.

- **Lamina propia**

Junto al epitelio intestinal la lámina propia también actúa como sitio efector del sistema inmune, funcionando como un compartimiento que alberga células B, T y células del sistema inmune innato incluyendo células dendríticas, macrófagos intestinales, eosinófilos y mastocitos.

Los macrófagos intestinales son muy abundantes encontrándose relativamente cerca de la superficie epitelial y localizándose mayormente en el colon [56]. Estas células mantienen la homeostasis intestinal, fagocitando y degradando microorganismos o produciendo mediadores que conducen la renovación celular epitelial y eliminación del tejido celular muerto. Estos macrófagos se caracterizan por producir una gran cantidad de IL-10, la cual no solo previene eventos inflamatorios por el bloqueo de la respuesta proinflamatoria desencadenada por un estímulo a través de TLRs, sino que también promueven la supervivencia a través de linfocitos T reguladores (Treg FOXP3<sup>+</sup> (Forkhead box P3) en la mucosa [56, 57]

Adicionalmente, la lámina propia contiene células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en una proporción 2:1 que posiblemente derivan de células T convencionales que han tenido un evento de “priming” en los órganos linfoides secundarios. Las CD4<sup>+</sup> producen IL-2, IFN- $\gamma$  e IL17, así como IL-10 produciendo la activación de Treg. Existe correlación entre IL-17 e IL-10 y la presencia de Treg, viéndose una disminución progresiva de IL-17 del duodeno hasta el colon y niveles elevados de Treg en el colon, mientras se presentan niveles constantes de IL-10 a lo largo del intestino. En el intestino delgado se observan poblaciones iguales de FOXP3<sup>+</sup>/FOXP3<sup>-</sup> y poblaciones mayoritarias FOXP3<sup>+</sup> en el colon [57, 58].

Otro de los componentes importantes de la respuesta inmune son las células B, las cuales al ser activadas se convierten en células plasmáticas secretoras de IgA a través de las capas epiteliales al lumen. Esta producción resulta ser dependiente de la sección del intestino, incrementando progresivamente desde duodeno hasta el colon [59].

Por último, es posible encontrar células “Natural killer intestinales” (iNKT) con un fenotipo efector que producen grandes cantidades de IL-4 e IFN- $\gamma$  tras el reconocimiento mediado por TCRs de glicolípidos presentados por MHC-Clase I como CD1d siendo estas predominantes en el intestino delgado [60].

- **Microbiota intestinal como reguladora del sistema inmune intestinal**

En el tracto gastrointestinal podemos encontrar organismos “*amigables*” y potencialmente patogénicos coexistiendo como un complejo simbiótico. Este complejo se basa en la funcionalidad del microbiota en términos de protección, metabolismo energético y fortalecimiento inmunológico en el hospedero, razón por la cual complejas interacciones entre el microbiota, sistema inmune de la mucosa y células del tejido intestinal proveen múltiples capas de regulación que controlan la inmunidad intestinal [61, 62].

Junto a la microflora intestinal, las enzimas digestivas y mucina, entre otras, hacen parte del componente no inmune de la inmunidad de la mucosa, capaz de establecer un *cross-talk* con componentes inmunes de tipo celular. La microflora puede influenciar el desarrollo del sistema inmune intestinal, previniendo la intrusión de patógenos exógenos, manteniendo un balance recíproco con el tejido linfoide asociado al intestino (GALT) [62]. Los microorganismos del intestino son la mayor fuente de antígenos naturales que continuamente estimulan el GALT e inducen tolerancia inmune a diferentes agentes tales como proteínas de la comida o componentes moleculares de bacterias comensales. En caso de la tolerancia a proteínas de la comida dada en el intestino delgado, se observa una influencia local y sistémica de la respuesta inmune mientras que en la tolerancia a bacterias en el colon solo se observa una influencia local, sin atenuar la respuesta inmune sistémica [61].

El GALT está compuesto por las placas de Peyer y folículos linfoides aislados, los cuales consisten en estructuras con numerosos folículos que albergan células B, flanqueados por pequeñas áreas de células T [63]. Los componentes del GALT actúan como centros

germinales induciendo “Priming” de la respuesta inmune adaptativa desencadenada principalmente en respuestas a antígenos presentes en el lumen. La localización de estas estructuras está en el costado antimesenterico del intestino delgado, en el cual se observa un incremento progresivo en la densidad y tamaño de las placas desde el jejunio hasta el íleon distal y frecuentemente ausentes en el duodeno [62].

### **1.4.2 Efectos del LV en tracto gastrointestinal de *Canis familiaris***

Este tropismo por parte del parásito a órganos blanco inusuales se ha observado no solo en humanos, también se ha reportado en diferentes reservorios de la infección como en hámster [64] o el principal reservorio de la infección (*Canis familiaris*), modelo en el cual se evaluó la presencia de parásitos en pulmón, riñones, corazón, esófago, estómago e intestinos, de los cuales solo para los intestinos se reportó la presencia de parásitos infectando macrófagos [61].

Los primeros indicios de un evento de visceralización a intestino se dio por los reportes de inflamación crónica de estos tejidos, acompañado de exudados compuestos por macrófagos, células plasmáticas y linfocitos a través de la mucosa del intestino (delgado y grueso), que tras un análisis microscópico se confirmó la presencia de parásitos en forma amastigote libres y al interior de los macrófagos presentes en la lámina propia de la mucosa [65].

A partir de estudios en perros infectados experimentalmente, se ha descrito como *L. infantum* puede alcanzar todos y cada uno de los diferentes segmentos del intestino delgado (duodeno, jejunio e íleon) y grueso (cecum, colon y recto), al igual que las capas y paredes del intestino (mucosa, muscularis de la mucosa y submucosa). Una vez los parásitos logran alcanzar y establecerse en cada una de las secciones del intestino pueden alterar la expresión de citoquinas y sus receptores en función de la carga parasitaria. En sitios en que se han reportado bajas cargas parasitarias como el jejunio se observaron incrementos en la frecuencia y expresión de IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , INF- $\gamma$ , CD11b, TLR-9 y sus receptores. En el colon, un mayor tropismo al igual que un mejor establecimiento del parásito gracias a una mayor carga parasitaria se observaron aumentos en la expresión de IL-4, TLR-2 y CD11cR [66].

La evaluación de los efectos de la infección en el tracto gastrointestinal se puede analizar inicialmente por la aparición de alteraciones macroscópicas leves poco comunes, como

producto de las altas concentraciones de parásitos en alguna de las diferentes secciones del intestino causando alteraciones estructurales o por el desarrollo hiperplásico de los folículos secundarios de los parches de Peyer debido a una alta producción y secreción de anticuerpos como respuesta inmune contra el parásito. Microscópicamente junto a su distribución a lo largo de los tejidos, se observaron aumentos en el número de macrófagos infectados o no, células plasmáticas, células gigantes, polimorfo nucleares y linfocitos.

Con base en la información obtenida a partir de estos estudios, se pudo observar que, aunque la distribución de los parásitos es generalizada no se da de forma estocástica, teniendo en cuenta que la infección en el intestino delgado se presentó difusamente a lo largo de la lámina propia mientras que en el intestino grueso los amastigotes estuvieron más concentrados cerca de la muscularis mucosa o cierta distancia del lumen [67].

Este patrón de diseminación de los parásitos resulta ser muy interesante y una posible explicación se ha propuesta a partir de estudios en macrófagos murinos y su papel en la regulación de la respuesta inmune en la mucosa intestinal. Se ha encontrado que el microbioma presente en el lumen intestinal varía de forma significativa para cada área del intestino, y el microbiota residente del intestino grueso consiste de  $10^{21}$  microorganismos más que en el intestino delgado. Un ejemplo de esta relación microflora-respuesta inmune se evidenció al evaluar la microflora en perros naturalmente infectados con *L. infantum* presentaron la expresión de TLR2 y TLR9, frente a macrófagos con un fenotipo CD11b<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup> y CD14<sup>+</sup> con una alta frecuencia de TLR2 en colon y TLR9 en el jejunio [66].

## **1.5 Malnutrición, un problema de salud pública**

La malnutrición según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) se define como una condición fisiológica anormal, causada por un consumo insuficiente, desequilibrado o excesivo de los macronutrientes que aportan energía alimentaria (carbohidratos, proteínas y grasas) y los micronutrientes (vitaminas y minerales) que son necesarios para el crecimiento y desarrollo físico-cognitivo [68]. Cualquier alteración alimenticia afecta directamente la nutrición adecuada de un individuo, afectando consecuentemente su desarrollo. Una correcta alimentación ayuda a

las personas a desarrollar su máximo potencial y de esta manera se establece una relación clara con el crecimiento económico de los países. En general, los países que se enriquecen gracias a su desarrollo socio-económico, son menos susceptibles a la inseguridad alimentaria [68].

Aunque los índices generales de malnutrición disminuyen año por año, las estimaciones más recientes de la FAO para el periodo comprendido entre 2014-16 indican que aproximadamente 795 millones de personas están subalimentadas, y se estima que la malnutrición es responsable de aproximadamente 2,2 millones de muertes por año en niños menores a 5 años. El 21% de las muertes globales y discapacidades en niños menores a 5 años, se atribuye a la malnutrición y su relación sinérgica con el desarrollo de enfermedades infecciosas, siendo este el porcentaje más alto para cualquier factor de riesgo que puede presentar este grupo de edades [69, 70].

En particular, la malnutrición infantil es un problema de salud pública en Latinoamérica, cuya prevalencia es significativamente elevada debido a la situación de seguridad alimentaria de la región, donde el acceso a alimentos fuente de proteína es limitado, trayendo como consecuencia alteraciones en el desarrollo físico y mental, deficiencias de micronutrientes entre los que se destacan hierro y zinc, aumento de la susceptibilidad a infecciones, incremento de la estancia hospitalaria y en algunos casos la muerte [71]. En Latinoamérica cerca de 7,1 millones de niños padecen malnutrición crónica y cerca de 1,9 millones tienen bajo peso [71]. En Colombia, la prevalencia de malnutrición crónica para el año 2005 fue del 12% y de desnutrición global del 7%, en donde la tasa de prevalencia es significativamente más alta en las zonas rurales y la región del Atlántico [72]. En Brasil la prevalencia de malnutrición es del 5%, teniendo un impacto en el aumento de la susceptibilidad a infecciones respiratorias, del sistema gastrointestinal y parasitarias en zonas endémicas [71, 72].

La malnutrición considera dos tipos, malnutrición primaria relacionada con una deficiencia en el aporte de calorías, macronutrientes y micronutrientes y malnutrición secundaria caracterizada por una deficiencia en el aporte proteico con un suministro adecuado de calorías [73]. Estas disfunciones nutricionales se han relacionado con una alteración en la respuesta inmunológica frente a infecciones parasitarias, generando incremento en la susceptibilidad, frecuencia y severidad de la infección [74].

### **1.5.1 Alteraciones inmunes y gastrointestinales por efecto de la malnutrición proteica**

La malnutrición por restricción proteica usualmente se manifiesta de forma temprana entre niños que oscilan entre los 6 meses y 2 años, asociado con un destete temprano, retraso en la inducción de alimentos complementarios, una dieta baja en proteínas e infecciones frecuentes y severas. Y aunque la malnutrición puede darse en diferentes grupos de edades, eventos graves de malnutrición son casi exclusivos de niños. Muchos de estos niños presentan infecciones asintomáticas porque su sistema inmune falla en la respuesta a las quimioquinas, opsonización y fagocitosis de agentes patógenos. En ciertos casos el sistema inmune se encuentra tan deprimido que el cuerpo no desencadena eventos típicos de inflamación como la producción de eventos febriles [75].

En restricción proteica, la predisposición a infección se asocia a una atrofia en el timo y disminución de subpoblaciones celulares en órganos linfoides secundarios [73, 76], debido a una deficiencia de aminoácidos para la síntesis de proteínas, incluida la disminución en la síntesis de hormonas tiroideas, junto con una alteración en la producción y expresión de citoquinas proinflamatorias. Estas alteraciones se basan en cambios que inducen una reducción de linfocitos CD4<sup>+</sup>, que disminuye la expresión de citoquinas Th1 y IFN- $\gamma$ , de forma contraria a un incremento en la producción de citoquinas Th2 como IL-4 acompañado todo por una disminución en la actividad fagocítica de los macrófagos por cambios en la producción de óxido nítrico, maduración de células dendríticas y secreción de IgA generando un efecto inmunosupresor aumentando la sensibilidad a infecciones en el individuo [77]

Los efectos de la malnutrición en el incremento de la susceptibilidad a la infección incluyen una disminución en la activación de la respuesta inmune innata y adaptativa. En leishmaniasis visceral se sugiere que la inmunidad innata se ve afectada por estados de malnutrición por el incremento de la carga parasitaria en estadios tempranos de la infección, dados por una falla en la función de los folículos linfáticos como barrera, que permite la diseminación del parásito, asociado a la disminución en la producción de quimiocinas que causan alteración en la migración transendotelial impidiendo el reclutamiento de monocitos y neutrófilos a los sitios iniciales de infección.

A nivel gastrointestinal, la malnutrición genera alteraciones estructurales en los vellos atrofiándolos, generando hipoplasia de las criptas y modificando la permeabilidad intestinal lo que conlleva malabsorción, altera la homeostasis intestinal generando un aumento en la microflora bacteriana y pérdida de tolerancia intestinal junto a la reducción en la producción de ácidos gástricos. Muchos de estos efectos pueden ser revertidos rápidamente al mejorar el estado nutricional pero la síntesis de proteínas, gluconeogénesis y metabolismo de medicamentos permanecen disminuidos [78].

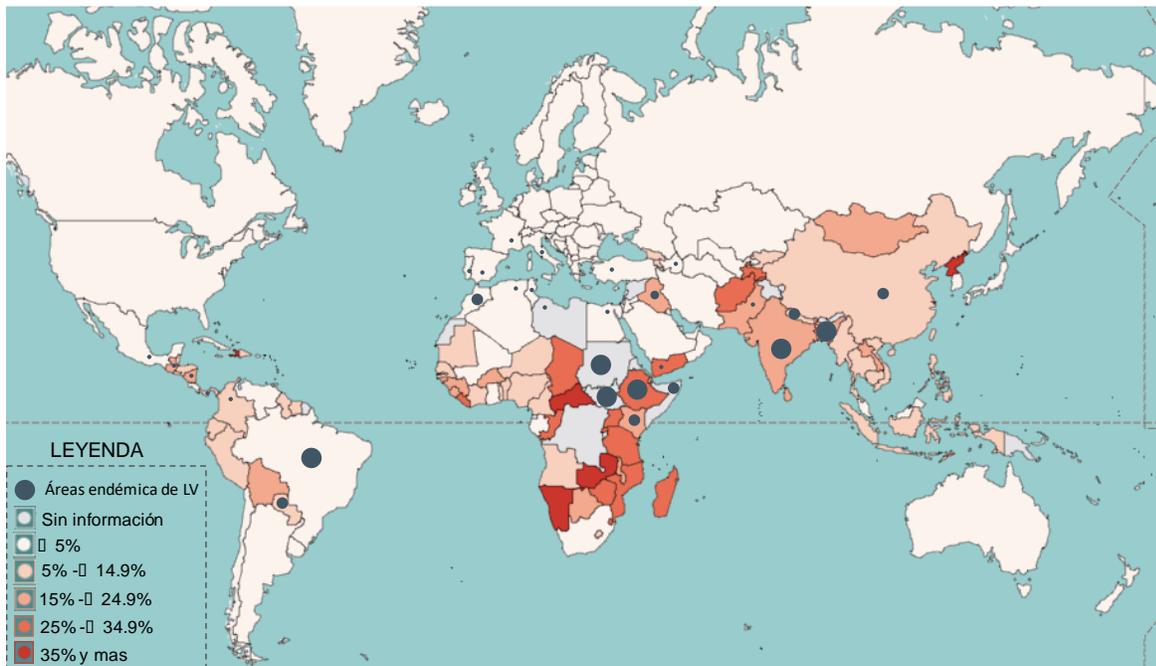
### 1.5.2 Visceralización de LV por efecto de la restricción proteica

En áreas endémicas para LV, la malnutrición por restricción proteica es probablemente el mecanismo de inmunosupresión más importante que predispone a los individuos a la infección, por alteraciones de la inmunidad innata y adaptativa (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) [79].

Aunque las bases inmunológicas de esta asociación aún no están completamente esclarecidas, esta sinergia lleva a la atrofia y alteración estructural de órganos linfoides, como el bazo y timo. La atrofia severa del timo resulta de la apoptosis masiva de timocitos, afectando la maduración de los linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, acompañado de una disminución en la proliferación celular. Adicionalmente se ha observado que, por efecto de la malnutrición, la falla en los nódulos linfáticos que actúan como una barrera que retrasa o reduce la diseminación de patógenos capturados por macrófagos y células dendríticas, lleva a un incremento en la diseminación temprana de los parásitos causantes de LV a otros órganos blanco [80].

**Figura 1-3:** Mapa de distribución malnutrición global y regiones endémicas para LV

Tomado y modificado: <http://www.fao.org/hunger/es/> y *Status of endemicity of visceral leishmaniasis, worldwide*, 2013. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>



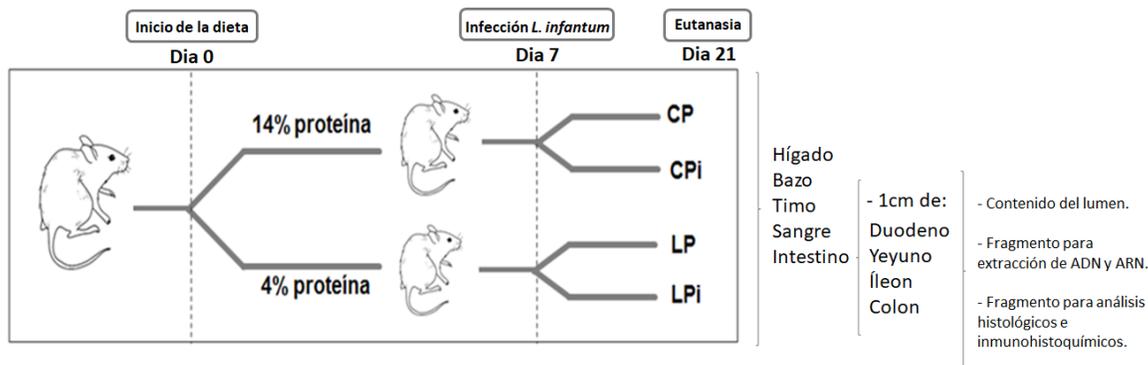
Teniendo en cuenta la relación existente entre LV, malnutrición y visceralización del parásito a tracto gastrointestinal resulta apremiante describir este mecanismo en particular con el fin de ofrecer nuevas oportunidades terapéuticas desde un enfoque múltiple que lleve en un futuro al control de la enfermedad y disminuir la progresión de la leishmania visceral u otros agentes patogénicos similares.

## 2. Metodología

### 2.1 Modelo Experimental

Ratones BALB/c (n=48) de tres semanas de edad recibieron una dieta estándar con un contenido proteico del 14% (MP Biomedicals, LLC. Numero de catálogo: 960258). Los ratones se mantuvieron en periodos de 12/12 horas de luz/oscuridad. Después de una semana de aclimatación, los animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos: 24 animales se alimentaron con una dieta de 14% de contenido proteico y 24 animales se alimentaron con una dieta de 4% (MP, Numero de catálogo: 960254) de contenido proteico. Ambas dietas son isocalóricas, y cada una proporciona 3,7 Kcal/g. Los animales tuvieron libre acceso al agua y los alimentos. Después de 7 días de dieta, cada grupo de animales se dividió en dos subgrupos y un subgrupo de cada dieta se infectó con  $1 \times 10^7$  parásitos de *L. infantum* cepa MCAN/ BR/ 2000/ CNV- FERROZ proveniente de la Colección de Leishmania del Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC), por vía intravenosa en la vena caudal, mientras que los otros dos subgrupos se inyectaron con PBS. Así, se obtuvieron cuatro grupos de estudio: animales alimentados con un 14% de proteína (Proteína de Control, Cp), animales alimentados con un 4% de proteína (Proteína Baja, Lp), animales alimentados con un 14% de proteína con *L. infantum* (Cpi), y animales alimentados con un 4% de proteína e infectados (Lpi). Estos experimentos se llevaron a cabo con protocolos aprobados por el Comité de ética de uso animal de Fiocruz (CEUA, licencia LW-27/14), (Figura 2-1).

**Figura 2-1: Representación esquemática del diseño experimental.** Ratones macho BALB/c se alimentaron con una dieta de 14% (Cp) o 4% (Lp) en proteína durante 21 días. En el día 7 del periodo que abarco el experimento, la mitad de los animales fueron infectados con *L. infantum* y la otra mitad recibió PBS. Cp: Animales alimentados con dieta de 14% en proteína. Lp: Animales alimentados con dieta de 4% en proteína. Cpi: Animales alimentados con dieta de 14% en proteína e infectados. Lpi: Animales alimentados con dieta de 4% en proteína e infectados [5].



## 2.2 Material biológico

Posterior al sacrificio de cada animal, se recolectó sangre para la extracción de suero, bazo, timo, hígado e intestino. Como parte inicial del procesamiento del intestino, se estableció su longitud y peso. Posteriormente se tomó un cm de cada segmento por animal. Adicionalmente se recolectaron muestras del contenido del lumen de las secciones del intestino por perfusión del lumen con PBS, material que se filtró por una membrana de 100  $\mu$ M para retirar partículas grandes y se centrifugó a 5000 rpm para clarificar la solución, se recuperó el sobrenadante. Cada muestra de tejido se procesó para ensayos histopatológicos, inmunoensayos y ensayos con ácidos nucleicos.

## 2.3 Medición de parámetros nutricionales

Los niveles de IGF1 y leptina se midieron en suero mediante ELISA (Abcam Cambridge, UK; Cat. ab100695 y ab100718, respectivamente) de acuerdo a las condiciones del fabricante. Los niveles de corticosterona en plasma se midieron por radioinmunoensayo de acuerdo con las condiciones del fabricante (MP Biomedicals, Solon OH, USA) en colaboración con el Dr. Vinicius Frias Carvalho del Instituto Oswaldo Cruz (IOC) [81, 82].

## 2.4 Determinación de la parasitemia en tejidos control e Intestino

Se evaluó el estado de la infección en hígado y bazo como órganos de referencia y como tejidos blanco de nuestro estudio se realizó la búsqueda de parásitos en duodeno y colon. Inicialmente, se realizó la extracción de ADN mediante el kit QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen) y cuantificación con espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000

(ThermoScientific). Este material se llevó a qPCR usando como blanco de reconocimiento el DNA del Kinetoplasto (KDNA) [5]. Los productos amplificados fueron posteriormente visualizados en geles de poliacrilamida y un sistema de detección con plata (ThermoScientific Cat. 24612) según instrucciones del fabricante (Tabla 2-1).

**Tabla 2-1:** Descripción general de los genes evaluados por qPCR.

Numero de acceso	Abreviatura	Primer sentido	Primer antisentido	Tamaño amplimero (pb)
NM_001289726.1	<i>gapdh</i>	GCCTCCGTTCTCTACC	CTTCACCACCTTCTTGATGTC	96
NM_025567.2	<i>cyc1</i>	GGTGTCATTGCGAGAAGG	GGTGCCATCATCATACTCC	106
NM_016774.3	<i>atpβ5</i>	TGAGTGTGAGCAGGAGATTC	TTGGCGACATTGTTGATTAGC	148
NM_013556.2	<i>htrp</i>	CGTGATTAGCGATGATGAACC	AAGTCTTTCAGTCCTGTCCA	124
NM_011577.1	<i>tgf-β</i>	ATTCCCTGGCGTTACCTTGG	CCTGTATCCGTCCTCTGG	117
NM_008337.3	<i>ifn-γ</i>	AGGACACAACAAGATGGA	TTAGTGAGAGTGAACATTACAG	141
NM_001278601.1	<i>tnf-α</i>	CTTCCTACCTTCAGACCTT	GCCTTCCAAATAAATACATTCAT	153
NM_010548.2	<i>il10</i>	ACAACATACTGCTAACCGACTCCT	GGCAACCCAAGTAACCCCTTAAAGT	57
NM_001159424.1	<i>il12</i>	TTCATATTCACTATACAAGTTG	GCTCTTCTGCTAACACAT	94
NM_010552.3	<i>il17a</i>	TCTGTTCTCATCCAGCAAGA	ATCTTCTCGACCCTGAAAGT	80
NM_145856.2	<i>il17f</i>	CATTTCTGTCCACGTGAAT	CAGCCAACCTTTTAGGAGCAT	255
AF169140.1	MiniC	TGTTGGTTGTGACTTTA	CATCCACCAGACTAATC	74

## 2.5 Análisis inmunohistoquímico para *L. infantum* e histopatológico del intestino

A partir de bloques de parafina se realizaron cortes transversales de 5µM de espesor, los cuales se fijaron y tiñeron con Hematoxilina y Eosina (H&E) para su análisis microscópico. Se evaluaron los cambios histopatológicos en base a alteraciones morfológicas o celulares como resultado de una respuesta inmune, en las diferentes capas celulares incluyendo epitelio, lamina propia, mucosa y capas musculares submucosas. Las alteraciones identificadas se describieron cualitativamente, estableciendo un score arbitrario de alteraciones, basadas en presencia/ausencia y severidad de la lesión (Tabla 2). De forma paralela a la determinación molecular de parásitos a nivel tisular, se analizó por inmunohistoquímica la presencia de *Leishmania*. Brevemente, se evaluó la presencia de formas amastigotas a lo largo de los segmentos del intestino de los grupos Cpi y Lpi usando un anticuerpo para la detección de antígenos solubles de *L. infantum* como anticuerpo primario y un anticuerpo secundario biotinilado (Dako) generando el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa el cual se reveló con el sistema AEC (Invitrogen) y contra coloración con hematoxilina de Meyer (Sigma) [5]. La evaluación histopatológica y parasitaria se realizó en colaboración con el Dr. Rodrigo Caldas Menezes del Instituto Nacional de Infectología Evandro Chagas (INI).

**Tabla 2-2:** Alteraciones microscópicas observadas en intestino de ratones BALB/c sometidos a restricción proteica e infección con *L. infantum*.

Tipo de alteración		Puntuación
<i>Inmunes</i>		
Infiltrado linfocitario en la Mucosa (M)	Discreto	1
	Moderado	2
	Transmural	3
Infiltrado linfocitario en la Submucosa (SM)	Discreto	1
	Moderado	2
Neutrófilos, macrófagos y plasmócitos		1
Hiperplasia linfoide		1
<i>Morfológicas</i>		
Atrofia de vellosidades		1
Hiperplasia tisular (criptas)		1
Ulceras		1
Sin alteraciones		0

## 2.6 Determinación de los niveles secretados de citoquinas en fluidos del lumen

La concentración (pg/ml) de citoquinas se determinó usando el kit LEGENDplex Multi-Analyte Flow Assay Kit (BioLegend, San Diego, CA, USA), inmunoensayo basado en perlas que permite cuantificar múltiples analitos solubles se forma simultánea. El kit incluye la medición de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL12(p70), TGF- $\beta$  y IL17A, entre otras. El análisis de los resultados se realizó mediante el software LEGENDplex™ Data Análisis software versión 8, donde los valores relativos de concentración para cada citoquina se calcularon mediante un algoritmo de cinco parámetros con regresión logarítmica de la curva por cada citoquina, según las condiciones propuestas por el fabricante.

## 2.7 Análisis de la expresión génica de citoquinas

A partir de fragmentos de intestino se extrajo el ARN total con el reactivo TRIzol® (Life Technologies, Inc.), material cuantificado a 260nm usando un NanoDrop. El ADNc se

---

sintetizo a partir de 1µg de ARN total haciendo uso de sistema de transcripción reversa SuperScript III (Invitrogen). Usando este material, se realizó el PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) por duplicado como replica técnica y con (n=6) por grupo como replica biológica, mediante SYBR® Green PCR MasterMix. Los transcritos analizados corresponden a genes codificantes para *tnf-α*, *ifn-γ*, *il12*, *tgf-β*, *il10*, *il17a* e *il17f* (Tabla 2). Se analizó expresión génica mediante el método de Pfaffl y normalizando frente a la media geométrica de cuatro genes de expresión constante (*gapdh*, *atp-β*, *Cyc-1* y *Htrp*) (Tabla 2-1).

## 2.8 Cuantificación de Inmunoglobulina A (IgA) Soluble

La concentración (ng/ml) de IgA soluble se determinó en suero y en los fluidos provenientes del lumen de cada sección del intestino, utilizando el sistema de ELISA IgA Mouse Uncoated (Numero de catálogo 88-50450, Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

## 2.9 Análisis de la localización tisular de IgA

Cortes trasversales de 5-9 µM de espesor por segmento de intestino preservado en el compuesto Tissue Tek O.C.T. (Sakura) se fijaron en laminas silanizadas (Dako, Carpinteria, CA, EE. UU) con Acetona P.A (Merck). Posteriormente a la hidratación con PBS, inhibición de peroxidasas endógenas e inhibir las uniones inespecíficas, los cortes se incubaron con el anticuerpo para la detección de IgA-FITC (ab97234, Abcam). Cada tejido se incubó con DAPI junto con medio de montaje (Fluoromount-G, eBioscience) y se analizó en un microscopio Nikon Eclipse E400 (Nikon digital camera DXM1200F and Nikon ACT-1 software, Nikon, Japón). La cuantificación de los niveles de IgA expresados como porcentaje de las áreas marcadas positivamente se calculó usando el programa Image J (NIH, USA) [8].

## 2.10 Análisis estadístico de los datos

Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa GraphPad Prism. Para evaluar la significancia estadística de los datos se usó la prueba de ANOVA de dos vías con Turkey pos-Hoc Test. Los datos fueron presentados como el error estándar de la media (SEM en inglés).

## 3. Resultados

### 3.1 La restricción proteica en la dieta genera una condición de desnutrición que induce alteraciones sistémicas en ratones BALB/c

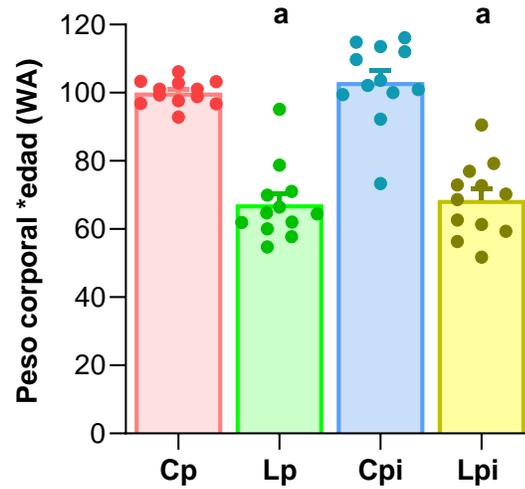
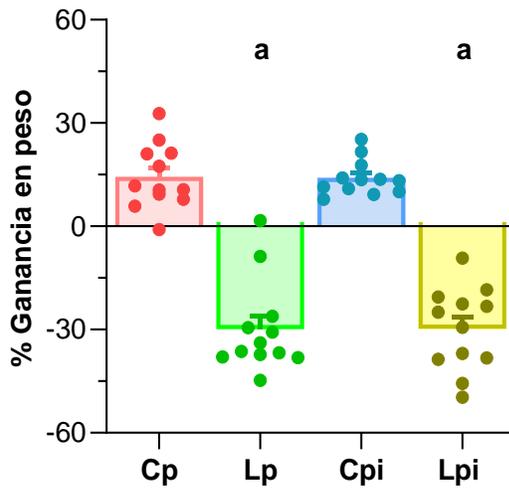
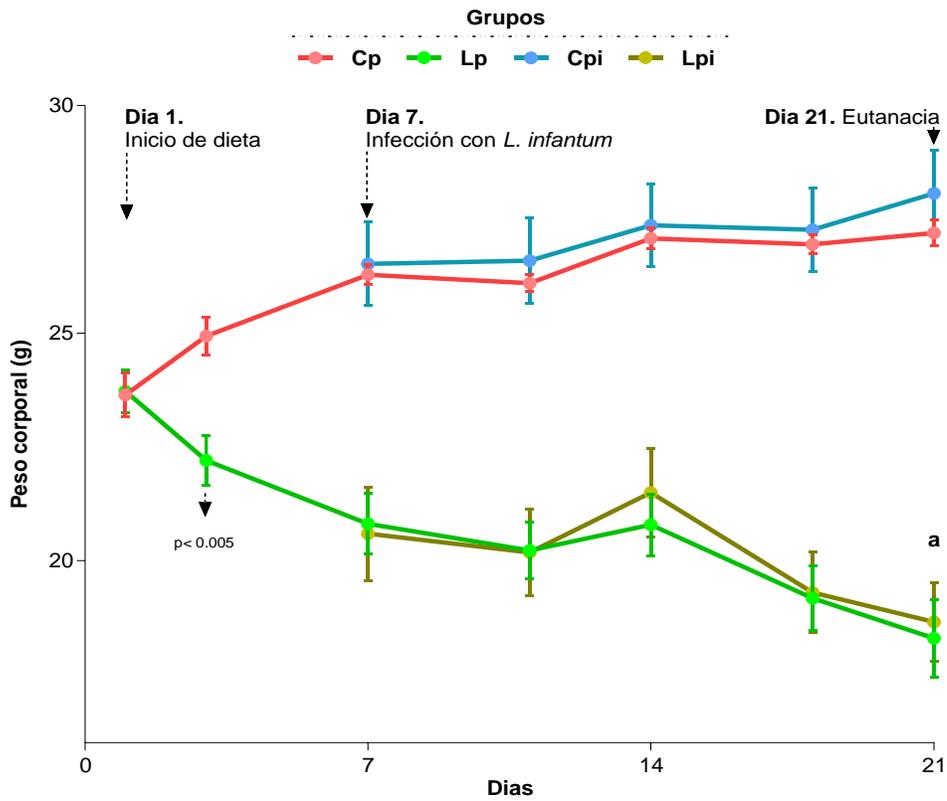
#### 3.1.1 La restricción proteica en la dieta genera una condición de desnutrición que induce alteraciones morfométricas en ratones BALB/c.

En base al modelo propuesto de alimentación e infección, los ratones BALB/c sometidos o no a restricción proteica fueron valorados periódicamente durante el transcurso del experimento y por medio de la evaluación de los cambios en el peso (g) corporal por individuo y la comparación entre grupos; se observó como la restricción de proteínas en la dieta indujo una disminución progresiva y significativa en el peso corporal registrado a partir de la primera semana del experimento ( $p < 0.005$ ), después del “inicio de dieta” entre los grupos Cp (grupo sometido a una dieta del 14% en contenido proteico) y Lp (grupo sometido a una dieta del 4% en contenido proteico), hasta el último día (día 21) en el cual los grupos Lp (18,3g) y Lpi (grupo sometido a una dieta del 4% en contenido proteico e infección con *L. infantum*) (18,6g) mostraron una mayor diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ) en relación al peso corporal, respecto al peso de los ratones con la dieta control Cp (27.2g) (**Figura 3.1.1.) (A)**. Por otra parte, no se observó que la infección con *L. infantum* lograra inducir algún efecto significativo en la modulación del peso corporal (28.1g) de los ratones BALB/c pertenecientes al grupo Cpi (dieta del 14% en contenido proteico e infección con *L. infantum*). Por otra parte, y mediante el análisis del porcentaje de ganancia en peso obtenido al dividir el peso final

(día 21) sobre el peso inicial (día 1 o inicio de la dieta) multiplicado por cien, se observó de forma estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ) como los ratones pertenecientes a los grupos Lp y Lpi en promedio, perdieron aproximadamente un 30% de su peso, frente a los grupos Cp y Cpi los cuales ganaron aproximadamente un 14%. Indicándonos como la restricción proteica no solo induce la pérdida en el peso corporal, sino que también afectó la posibilidad de que los ratones pudieran ganar peso eficientemente **(B)**.

Con el fin de establecer si la restricción proteica en la dieta indujo un estado nutricional cuantificable de desnutrición (severa, moderada o leve) en los ratones BALB/c pertenecientes a los grupos Lp o Lpi, se calculó la relación del peso corporal por edad o Weight for Age (WA). En base a la descripción de Ansted et al, quien propuso una escala de desnutrición basada en la clasificación Gómez et al, el cual evaluó el estado nutricional infantil por medio de los cambios en la relación WA. Ansted propuso una clasificación análoga a la clasificación de desnutrición infantil, en la cual los ratones con valores de WA entre 76-90%, son clasificados como levemente desnutridos, ratones entre 61-75%, son clasificados como moderadamente desnutridos y, por último, aquellos ratones con valores de  $WA \leq 60\%$ , resultan ser severamente desnutridos. En base a los resultados obtenidos para el día 21, se calculó la relación WA por individuo y entre grupos, observando una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ), entre los grupos Lp y Lpi, frente al grupo control (Cp) a partir de los valores promedio de WA por grupo; Cp (100%), Lp (67,3%), Cpi (103,2%) y Lpi (68,6%). Lo cual permitió establecer para este modelo como la restricción de proteína en la dieta generó un estado de desnutrición moderada para los grupos Lp y Lpi, y/o la ausencia de cambios en el estado nutricional por efecto de la infección con *L. infantum* en el grupo Cpi **(C)**.

**Figura 3.1.1. Efecto de la restricción proteica o infección con *L. infantum* en la alteración de parámetros morfométricos en los ratones BALB/c.** Variación del peso corporal (g) en función del tiempo **(A)**. Porcentaje de ganancia en peso corporal **(B)** y cambio en el peso por edad (WA) **(C)**. Registros tomados del día 21  $\pm$ SEM ( $n=48$ ), significancia estadística obtenida mediante el análisis de ANOVA de dos vías (factores), mostrando las diferencias significativas por la dieta (a) ( $p < 0.0001$ ), infección (b) e interacción dieta-infección (c) ns= no significativo. Cp (14% de proteína), Lp (4% de proteína), Cpi (14% de proteína e infectados), Lpi (4% de proteína e infectados).



### 3.1.2 La desnutrición moderada genero cambios morfométricos apreciables en los diferentes órganos de los ratones BALB/c.

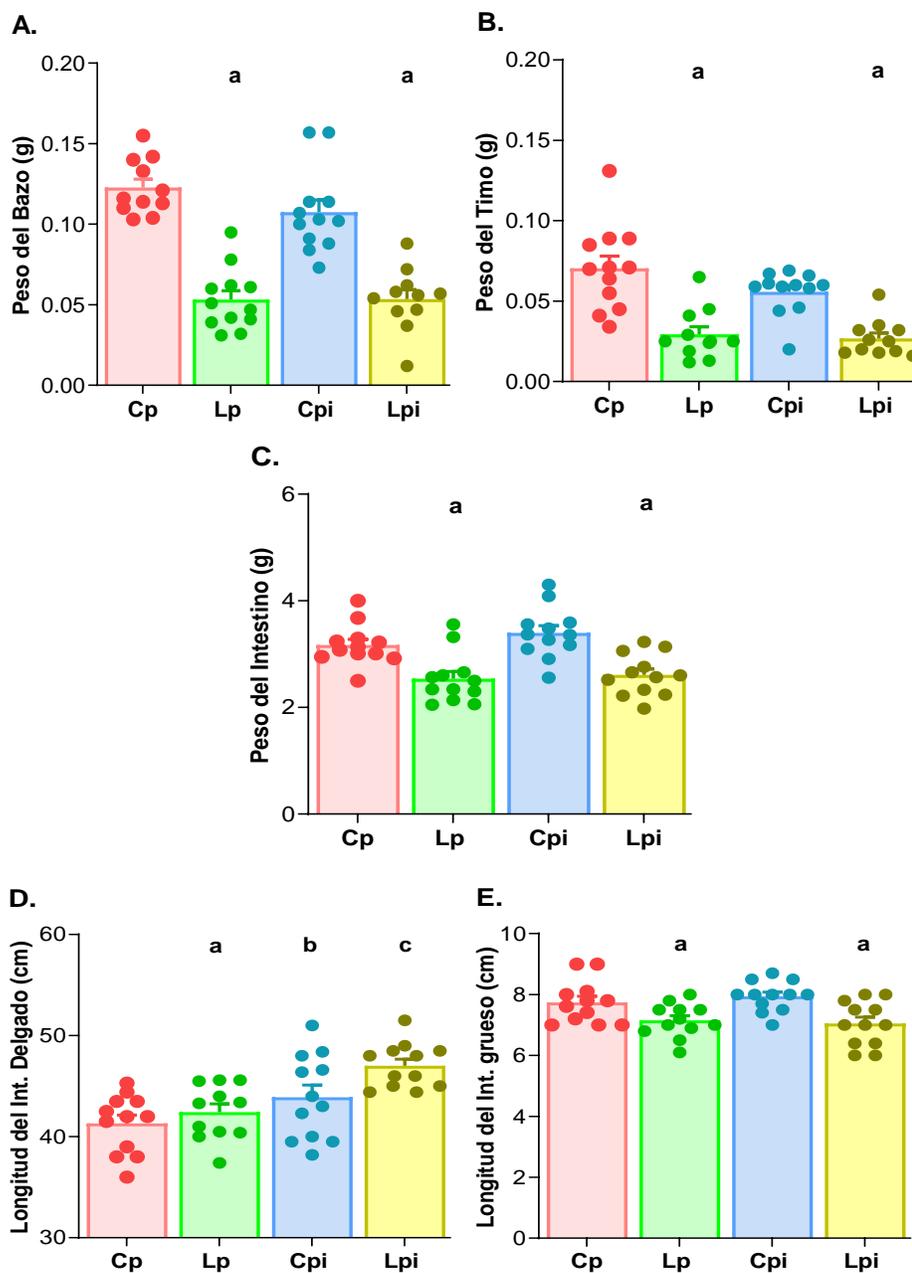
Con frecuencia, se ha reportado como la desnutrición proteica, calórica o proteico-calórica afectan de forma negativa el desarrollo y/o mantenimiento estructural de diferentes órganos clave que contribuyen activamente en la preservación de la homeostasis sistémica de un individuo. Por lo cual, y con el fin de establecer si la desnutrición moderada alcanzada con el modelo sería suficiente para repercutir en la morfometría de algunos órganos; se extrajeron y evaluaron cambios en el Bazo, Timo e intestinos al día 21 (**Figura 3.1.2.**). Tras evaluar la diferencia en el peso neto por órgano (bazo y timo) por individuo y promedios entre los grupos sometidos a restricción proteica Lp (0,05g y 0,03g), Lpi (0,05g y 0,03g) y grupo control Cp (0,12g y 0,07g), respectivamente; se identificó una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ) en los pesos del bazo (**A**) y timo (**B**), de los ratones sometidos a restricción proteica, respecto al peso por órgano en el grupo control. Por otra parte, al evaluar el efecto de la infección con *L. infantum* en los ratones BALB/c pertenecientes al grupo Cpi (0,11g y 0,05g), no se observó un efecto significativo como agente modulador del peso neto por órgano.

Adicionalmente, se evaluaron cambios morfométricos en función de las variaciones del peso húmedo y longitud (cm) del intestino (excluyendo en ciego) de los ratones BALB/c. Con base en los resultados obtenidos, se identificaron cambios en el peso promedio del intestino (**C**) de los grupos Lp (2,53g) y Lpi (2,60g), frente al grupo control Cp (3,17g), caracterizados por una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ) a causa de la restricción proteica. Asimismo, evaluando los cambios en la longitud del intestino por separado (intestino delgado y grueso), fue posible establecer como cambio la longitud promedio del intestino delgado (**D**) para cada grupo Lp (43,2cm), Cpi (44,0cm) y Lpi (47,0cm), en comparación con la longitud promedio en el grupo Cp (41,3cm). Dichos cambios, se caracterizaron por un modesto pero significativo ( $p < 0.05$ ) aumento longitudinal del Int. Delgado por efecto de la restricción proteica y un mayor amento longitudinal por efecto de la infección o la interacción infección-nutrición ( $p < 0.0005$ ).

Finalmente, tras evaluar los cambios en la longitud promedio del intestino grueso (**E**), fue posible establecer una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.0005$ ) en el tamaño

del Int. Grueso por efecto de la restricción proteica entre los grupos Lp (7,15cm) y Lpi (7,05cm), frente al grupo Cp (7,74cm). De forma contraria a lo observado para el Int. Delgado, la infección con *L. infantum*, no mostro inducir cambios significativos.

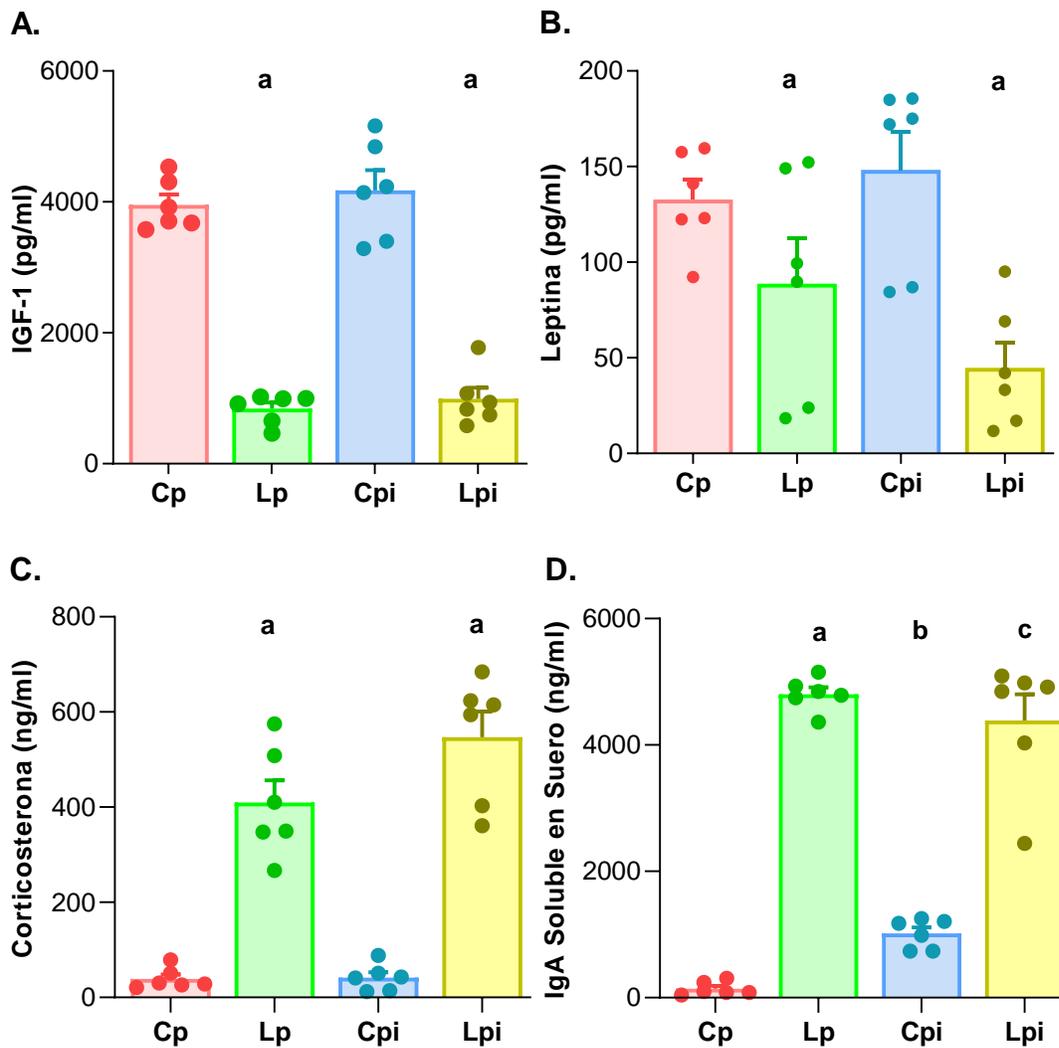
**Figura 3.1.2. Efecto de la restricción proteica en la variación del peso por órgano en los ratones BALB/c sometidos a restricción proteica e infección con *L. infantum*.** Variación del peso en gramos (g) del Bazo (A), Timo (B), Intestinos (C) y variación de la longitud (cm) del intestino delgado (D), colon proximal (E). Registros realizados al día 21,  $\pm$ SEM (n=48), significancia estadística obtenida mediante el análisis de ANOVA de dos vías (factores), mostrando las diferencias significativas por la dieta (a) ( $p < 0.0001$ ) en (A, B, C) y ( $p < 0.05 - 0.005$ ) en (D y E). Infección (b) e interacción dieta-infección (c) ( $p < 0.0005$ ) en (D).



### 3.1.3 La desnutrición moderada genero alteraciones hormonales e IgA sistémica sérica en los ratones BALB/c.

A la par del uso de parámetros morfométricos como indicadores de malnutrición, la evaluación en suero de múltiples parámetros bioquímicos permite identificar y establecer un diagnóstico de desnutrición. Para este estudio, mediante la evaluación en suero de la concentración de IGF-1, leptina y corticosterona, se evaluaron cambios a nivel hormonal e IgA como uno de los isotipos de inmunoglobulinas más relevantes en la función homeostática sistémica, en los ratones BALB/c sometidos o no a restricción proteica e infección con *L. infantum* (**Figura 3.1.3.**). En base a los resultados obtenidos tras la evaluación de las muestras de suero colectadas en el día 21, fue posible observar como la restricción de proteínas en la dieta genero una reducción estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ) en la concentración (pg/ml) sérica de IGF-1 (**A**), entre los animales pertenecientes a los grupos Lp (840,9pg/ml) y Lpi (992,8pg/ml), frente a la concreción de IGF-1 en el grupo Cp (3954,4pg/ml). Así mismo, tras analizar cambios en la concentración sérica de leptina (**B**), se observó una reducción significativa ( $p < 0.0005$ ) entre los animales de los grupos Lp (88,8pg/ml) y Lpi (44,7pg/ml), frente a la concreción en el grupo Cp (132,7pg/ml). En contraste a las observaciones anteriores, al evaluar cambios en la concentración (ng/ml) sérica de corticosterona (**C**), se observó como la restricción de proteínas en la dieta ocasionó un aumento significativo ( $p < 0.0001$ ) en los niveles de corticosterona entre los grupos Lp (409,6ng/ml) y Lpi (547ng/ml), en comparación con el grupo Cp (39,2ng/ml). En base a los resultados obtenidos frente a cambios hormonales por efecto de la infección con *L. infantum*, fue posible descartar la infección como factor determinante en la regulación hormonal de los ratones BALB/c, teniendo en cuenta la ausencia de cambios significativos en las secreciones de IGF-1 (4177,1pg/ml), leptina (148,2pg/ml) y corticosterona (41,6ng/ml) entre los grupos Cpi y Cp. Finalmente, al evaluar cambios en los patrones circulantes de IgA en suero (**D**), se observaron cambios estadísticamente significativos por efecto de la restricción de proteínas ( $p < 0.0001$ ), infección ( $p < 0.01$ ) e interacción nutricio-infección ( $p < 0.0001$ ), observando un aumento en la concentración sérica de IgA de los grupos Lp (4804ng/ml), Cpi (1017ng/ml) y Lpi (4386,3ng/ml), frente a la concentración de IgA en el grupo Cp (142,7ng/ml).

**Figura 3.1.3. Cambios en la concentración sérica hormonal y en IgA sistémica por efecto de la restricción proteica en la dieta e infección con *L. infantum*.** Variación en la concentración (pg/ml) a nivel sérico de (A) IGF-1 y (B) Leptina. Variación en la concentración (ng/ml) a nivel sérico de corticosterona (C) e IgA sistémica (D). Registros realizados al día 21  $\pm$ SEM (n=6). Significancia estadística obtenida mediante el análisis de ANOVA de dos vías (factores), mostrando diferencias significativas por la dieta (a) ( $p < 0.0001$ ) en (A), por la dieta (a) ( $p = 0.0005$ ) en (B), por dieta ( $p < 0.0001$ ) en (C, D), por interacción dieta-infección (c) ( $p < 0.01$ ) en (D), y por infección (b) ns= no significativo.



### 3.2 Identificación de alteración histológicas en las diferentes secciones de los intestinos por efecto de la desnutrición moderada y la infección con *L. infantum* en ratones BALB/c

La desnutrición como condición afecta la estructura (microarquitectura) y función de deferentes órganos o sistemas. Teniendo en cuenta la estrecha relación entre la nutrición y el tracto gastrointestinal, en este trabajo se evaluó como la desnutrición moderada o la infección con *L. infantum* afectan estructural y funcionalmente los intestinos de los BALB/c. En base a los resultados obtenidos en función de la frecuencia e intensidad de las diferentes alteraciones histológicas identificadas por medio del análisis histológico patológico de las diferentes secciones del intestino en conjunto, fue posible identificar como el grupo Lpi resulto ser el grupo con la mayor cantidad de alteraciones histológicas detectadas (43% de todas las alteraciones), presentando la mayor cantidad de individuos con infiltrados inflamatorios linfocitarios en la lámina propia a una intensidad de discreta a moderada, junto a la mayor detección de células del sistema inmune innato. Por otra parte, tanto el grupo Lp como el grupo Cpi presentaron la misma cantidad de alteraciones histológicas (21% de todas las alteraciones), teniendo en cuenta que las alteraciones histológicas identificadas entre estos dos grupos no resultaron ser las mismas con intensidades diferentes. Cabe resaltar que incluso los intestinos de los ratones pertenecientes al grupo Cp, manifestaron algún tipo de alteración histológica (12% de todas las alteraciones), pero en menor escala frente a los otros grupos (**Anexo A**).

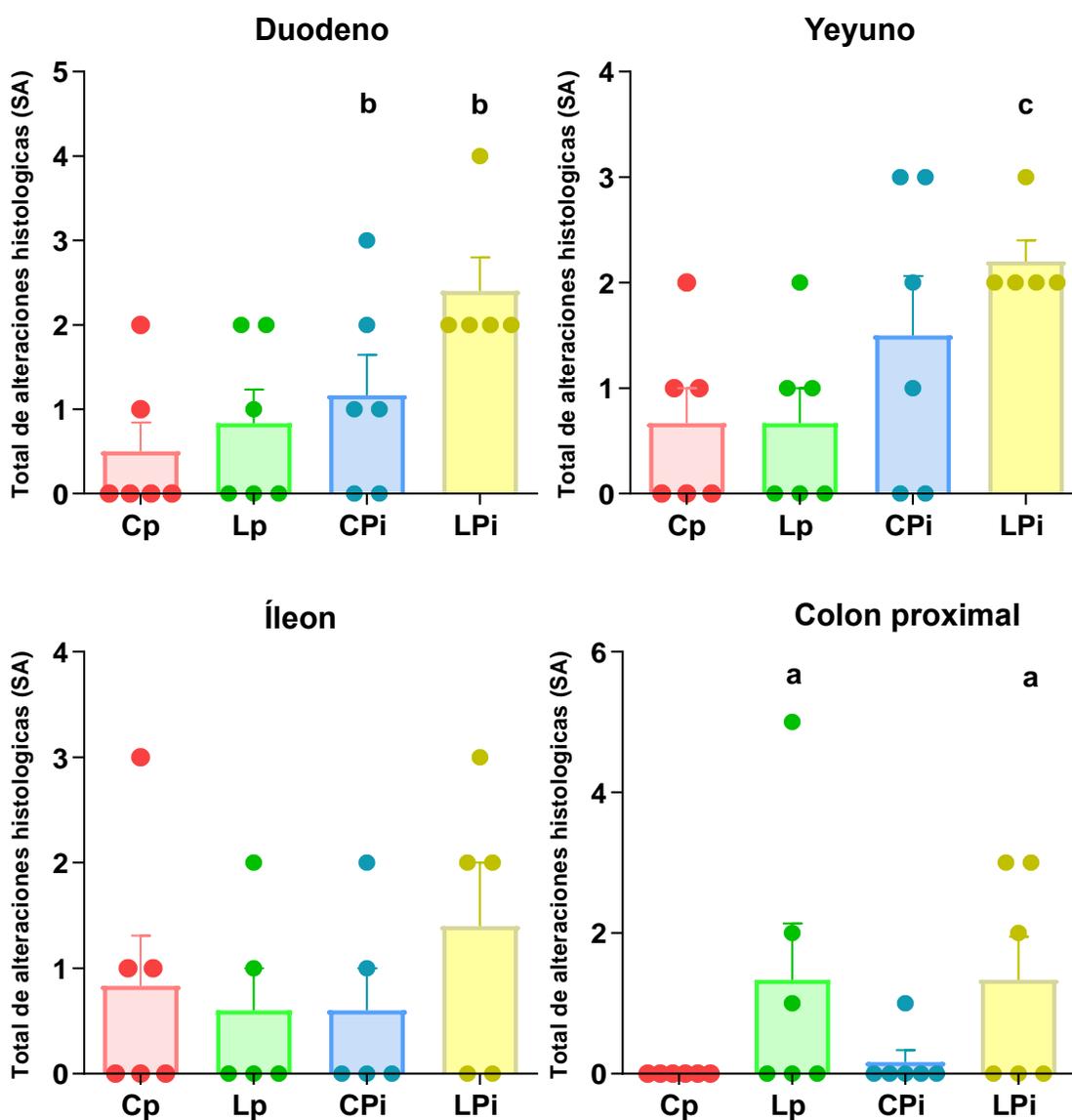
En base a la evaluación independiente por cada sección del Int. Delgado (Duodeno, Yeyuno e Íleon) o Int. Grueso (colon proximal) en los ratones BALB/c (**Figura 3.2.**), fue posible observar la aparición de alteraciones histológicas en por lómenos un individuo de cada uno de los grupos sometidos a restricción de proteína en la dieta, infección o en el grupo control para el Int. Delgado. En base al total de la puntuación para las alteraciones histológicas identificada y la frecuencia de estas mismas por individuo, se observó en un “n” de 6 individuos por grupo, como en el duodeno y el yeyuno los individuos pertenecientes al grupo Lpi (6:6) resultaron considerablemente afectados, seguidos en ambos tejidos por el grupo Cpi (4:6). Tras los análisis estadísticos de los resultados, fue posible identificar una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en el duodeno

de los ratones BALB/c pertenecientes a los grupos Cpi y Lpi, frente al grupo Cp; tejido en el cual las alteraciones histológicas podrían ser atribuidas a la infección con *L. infantum*. Adicionalmente, en el yeyuno también se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) entre el grupo Lpi, frente al grupo Cp, por efecto de la interacción entre la restricción de proteínas y la infección. Al evaluar los resultados obtenidos para el íleon, se observó que, aunque también ocurrieron múltiples daños entre los individuos de los diferentes grupos no se observó una condición predominante entre la restricción proteica o la infección capaz de lograr una cantidad diferencial entre las alteraciones histológicas.

Por otra parte, y en comparación al Int. Delgado, el colon proximal resulto ser el segmento intestinal con la menor cantidad de alteraciones histológicas identificadas por grupo. Identificando la mayor cantidad de alteraciones histológicas entre los grupos Lp y Lpi (3:6), con una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), frente al grupo Cp. Teniendo en cuenta la variedad de respuestas observadas entre los diferentes segmentos del intestino delgado y grueso, los resultados permiten pensar en la existencia de respuestas localmente diferentes y específicas dependiendo de cada sección.

El tropismo que presentan los parásitos de *L. infantum* hacia órganos del sistema reticuloendotelial se considera un canon en el proceso de visceralización observado, pero a medida que el conocimiento sobre la infección aumenta, se han observado otros órganos igualmente susceptibles a la infección y colonización por parte de los miembros del complejo donovani. Con el fin de confirmar un posible tropismo por parte de *L. infantum* hacia alguna de las secciones del intestino evaluadas, se analizaron por inmunohistoquímica, como técnica patrón para el diagnóstico de LV en animales naturalmente infectados, identificando antígenos solubles (Ag-solubles) de *L. infantum* a nivel tisular. Como resultado de este análisis, no se detectaron parásitos intracelulares o libres en los grupos Cpi o Lpi (**Anexo B**). Por otra parte, mediante un abordaje molecular se evaluó la presencia de amplímeros de kDNA en el bazo de los ratones grupos Cpi o Lpi, se confino un estado infeccioso positivo (**Anexo C**).

**Figura 3.2. Alteraciones histológicas generadas en las secciones intestinales de los ratones BALB/c moderadamente desnutridos e infectados con *L. infantum*.** Totales de las alteraciones morfológicas/celulares evaluados por sección intestinal. Material colectado en el día 21,  $\pm$ SEM (n=6). Significancia estadística obtenida mediante el análisis de ANOVA de dos vías (factores), mostrando diferencias significativas por la infección (b) ( $p < 0.05$ ) en (**Duodeno**), por la interacción dieta-infección (c) ( $p < 0.01$ ) en (**Yeyuno**) y por la dieta (a) ( $p = 0.05$ ) en (**Colon proximal**).



### **3.3 Identificación de un perfil diferencial de citoquinas en duodeno y colon en ratones BALB/c infectados con *L. infantum***

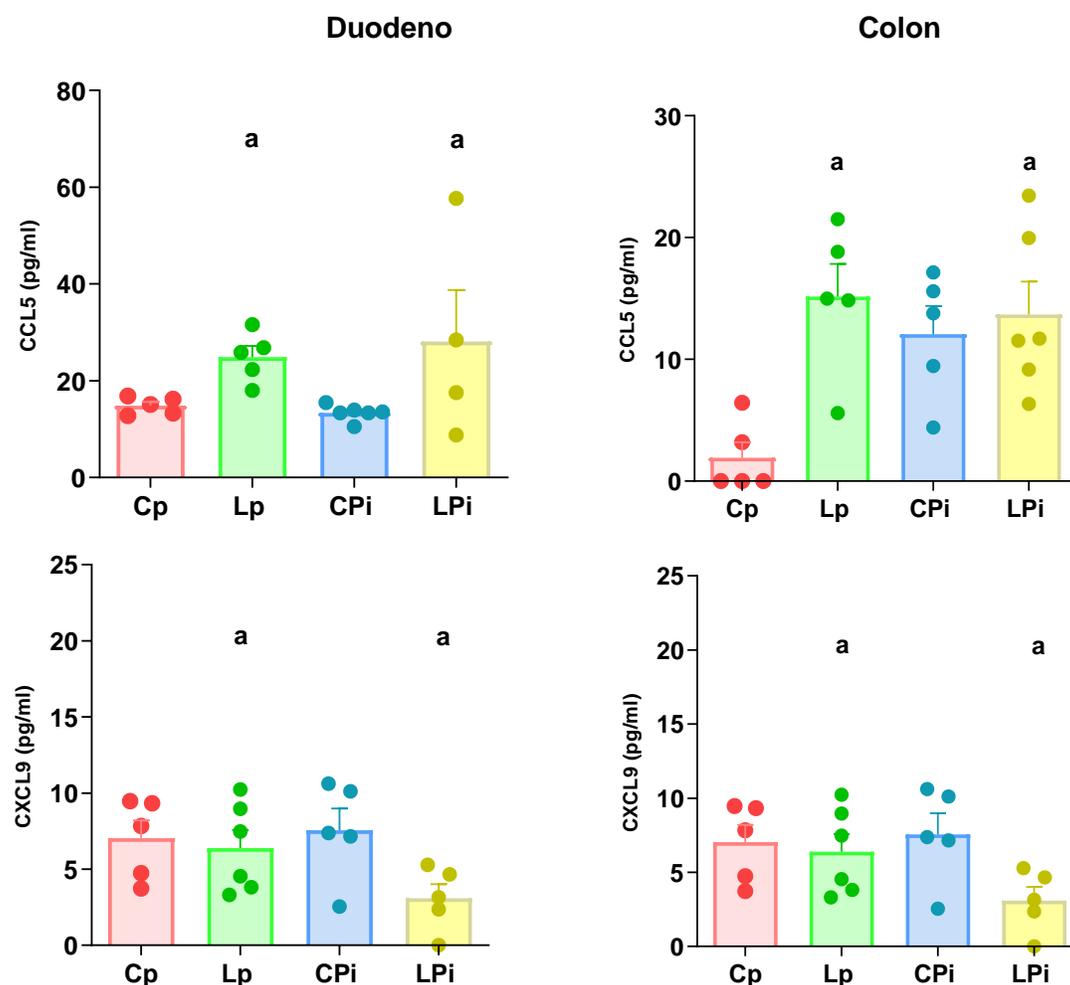
Con frecuencia la ocurrencia de daños a nivel tisular se puede relacionar con el desencadenamiento de una respuesta inmune inflamatoria local o la falta de ella. Con el fin de evaluar si la desnutrición moderada, infección o su interacción pueden llegar a modular la expresión proteica de mediadores celulares de inmunidad, se evaluaron los cambios en la concentración de quimioquinas, citoquinas pro o anti- inflamatorias encontradas a lo largo del contenido de la luz intestinal del duodeno y el colon proximal.

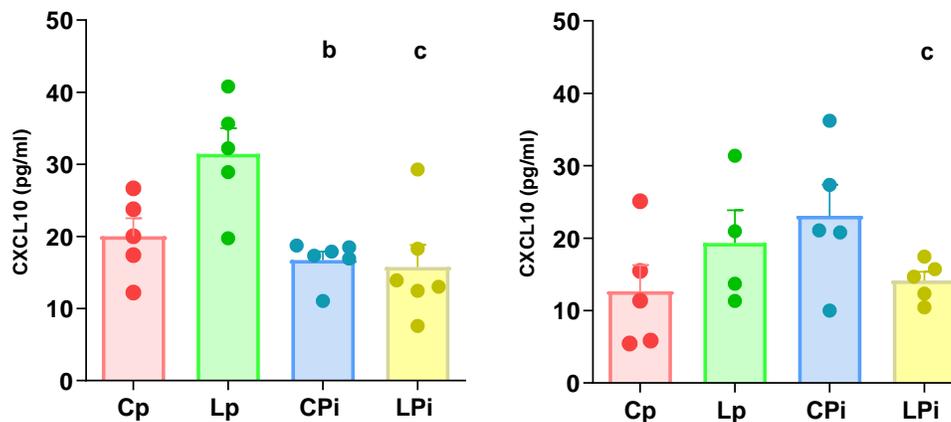
#### **3.3.1 La desnutrición moderada y la infección con *L. infantum* generan cambios en la concentración de quimioquinas en el duodeno y colon proximal de los ratones BALB/c.**

Por medio de la evaluación de dos familias diferentes de quimioquinas expresadas a través de las diferentes secciones del intestino, no solo caracterizadas por diferencias estructurales sino también por su capacidad para reclutar diferentes tipos celulares necesarios para el mantenimiento de la homeostasis intestinal, se evaluaron en muestras colectas a partir del contenido de la luz intestinal de las diferentes secciones de los intestinos, los cambios en la concentración de (CCL5, CXCL9 y CXCL10) por efecto de la desnutrición moderada, infección con *L. infantum* o su interacción (**Figura 3.3.1**). En base a los resultados obtenidos en relación con los cambios en la concentración (pg/ml) promedio para las diferentes quimioquinas en el duodeno, se observó un aumento en CCL5 por efecto de la restricción de proteínas en la dieta de forma significativa entre los grupos Lp ( $p < 0.01$ ) y Lpi ( $p < 0.05$ ), frente a la concentración en el grupo Cp. En base a los resultados obtenidos para los cambios en la concentración de CXCL10, se observó en el grupo Cpi, a causa de la infección y por la interacción nutrición-infección en el grupo Lpi una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.005$ ) y ( $p < 0.05$ ), respectivamente. Aunque se observaron cambios en la concentración de CXCL9 para los diferentes grupos, no resultaron estadísticamente significativos. Tras la evaluación en el colon proximal la concentración de las diferentes quimioquinas, se observó un aumento

en la concentración promedio de CCL5 por efecto de la restricción de proteínas en la dieta para los grupos Lp y Lpi ( $p < 0.05$ ), estadísticamente significativa. La restricción de proteínas en la dieta también indujo cambios significativos ( $p < 0.05$ ), en la concentración de CXCL9 entre los grupos Lp y Lpi, frente al grupo Cp, cambio caracterizado por una disminución moderada en Lp y aun mayor en Lpi. Finalmente, aunque la desnutrición y la infección causaron aumentos en la concentración de CXCL10, solo resultado estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) para el grupo Lpi, en el cual se observó una reducción en la concentración, respecto al control (**Anexo D-E**).

**Figura 3.3.1. Variación en la concentración quimioquinas en duodeno y colon de los animales BALB/c desnutridos e infectados con *L. infantum*.** Cambios en los valores de concentración para cada quimioquina evaluada normalizadas frente al promedio del grupo Cp, en duodeno y colon proximal.  $\pm$ SEM ( $n=6$ ). Significancia estadística obtenida mediante el análisis de ANOVA de dos vías (factores), mostrando diferencias significativas por la dieta (a), infección (b), y por la interacción dieta-infección (c).

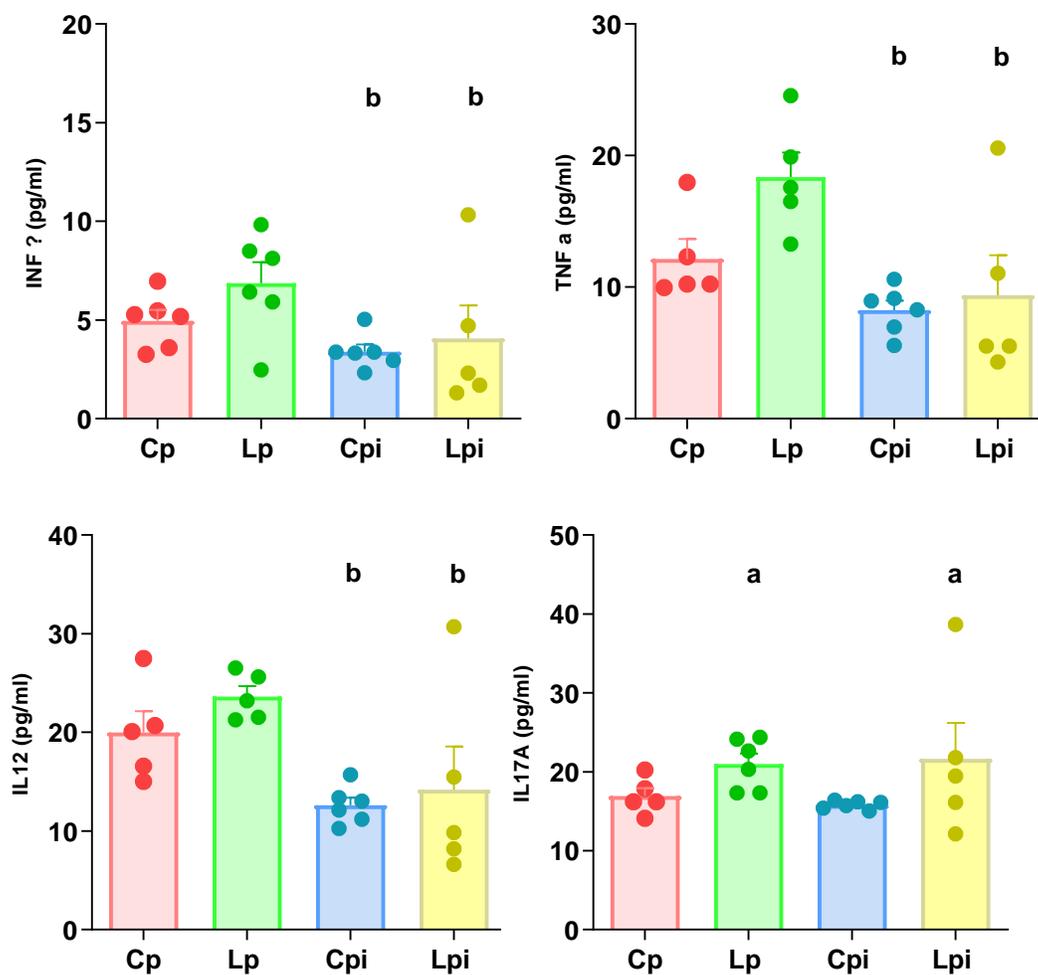


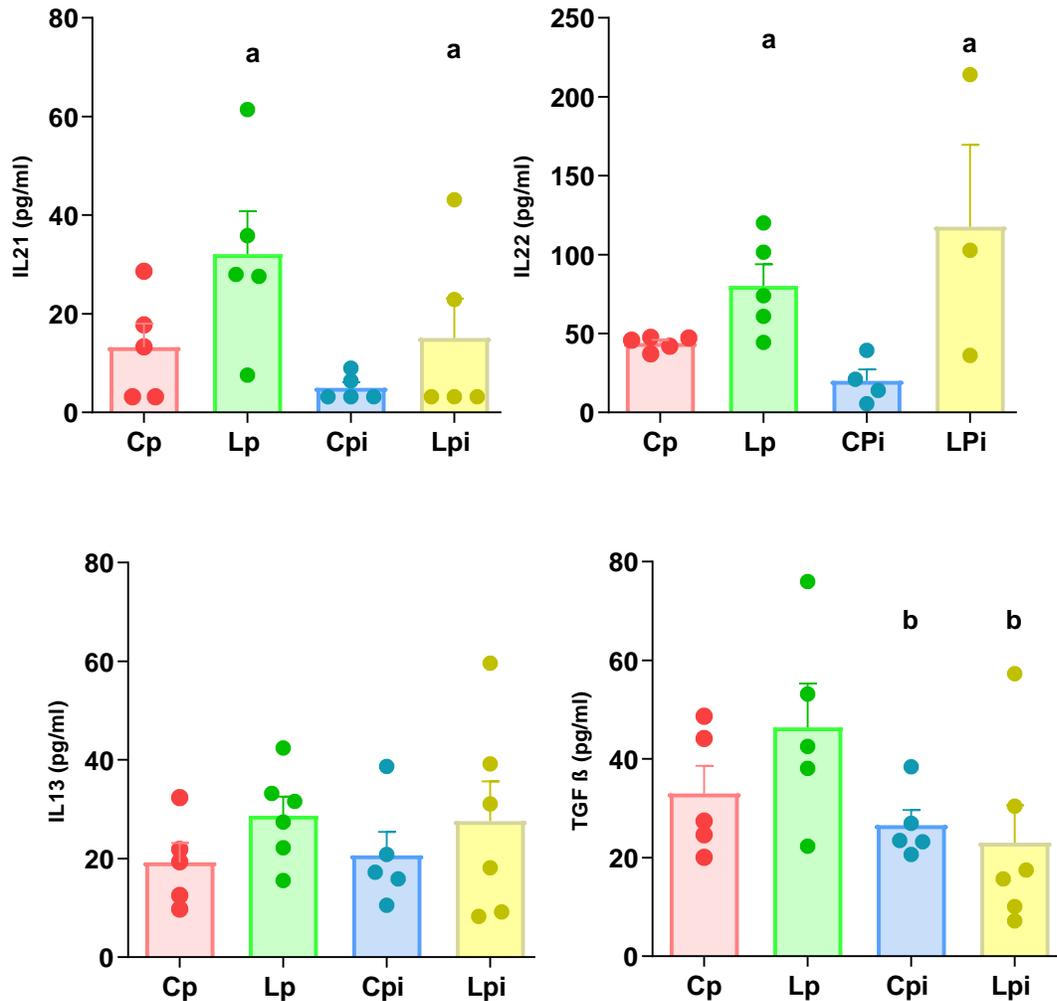


### 3.3.2 Identificación de los cambios en los perfiles de expresión de citoquinas Th1 y Th2 condicionados por la infección con *L. infantum* y Th17 por la desnutrición moderada en el duodeno.

Teniendo en cuenta el repertorio de citoquinas pro y antiinflamatorias evaluadas a través de las muestras colectadas en el contenido de la luz del duodeno, se observó una disminución generalizada en la concentración promedio de las diferentes citoquinas evaluadas para el grupo Cpi y Lpi, frente al grupo Cp. Lo cual nos permite pensar que la infección con *L. infantum* indujo una regulación negativa en la expresión de citoquinas (**Figura 3.3.2**). Aunque es importante resaltar que los perfiles mayormente afectados por la infección fueron los perfiles Th1 y Th2, dentro de los cuales la infección produjo una disminución estadísticamente significativa para INF $\gamma$  ( $p < 0.05$ ), TNF $\alpha$  ( $p < 0.005$ ), IL12 ( $p < 0.005$ ) como representantes de un perfil Th1 y TGF $\beta$  ( $p < 0.05$ ) como único representante de un perfil Th2, y aunque IL13 también hace parte de las citoquinas antiinflamatorias, no mostró diferencias estadísticamente significativas. Por otra parte, la desnutrición moderada indujo un aumento en la concentración de citoquinas entre de un perfil Th17 para los grupos Lp y Lpi, frente a la concentración en el grupo Cp; aumento que resultó estadísticamente significativo en IL17A ( $p < 0.05$ ), IL21 ( $p < 0.05$ ) e IL22 ( $p < 0.005$ ) (**Anexo D**).

**Figura 3.3.2. Variación en la concentración citoquinas Th1, Th17 y Th2 en duodeno de los animales BALB/c desnutridos e infectados con *L. infantum*.** Cambios en los valores de concentración para cada citoquina evaluada normalizadas frente al promedio del grupo Cp, en duodeno y colon proximal.  $\pm$ SEM (n=6). Significancia estadística obtenida mediante el análisis de ANOVA de dos vías (factores), mostrando diferencias significativas por la dieta (a), infección (b), y por la interacción dieta-infección (c).



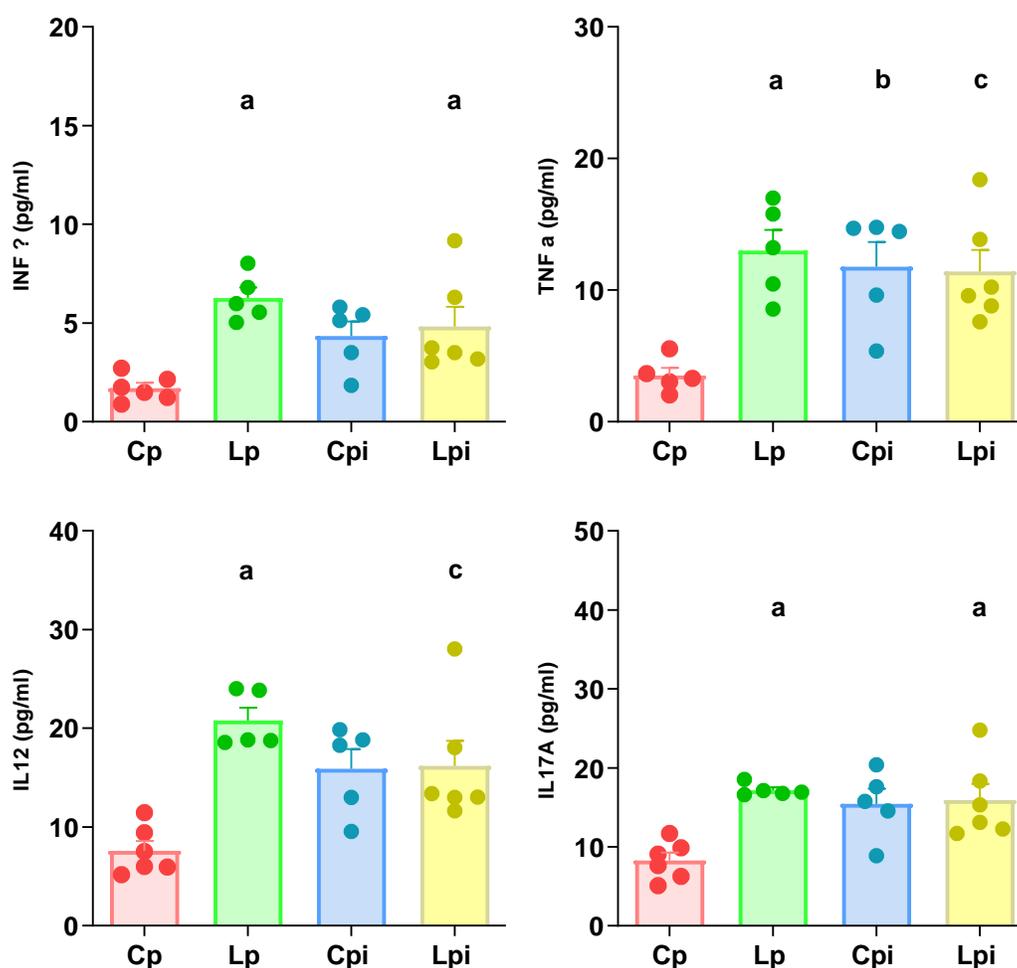


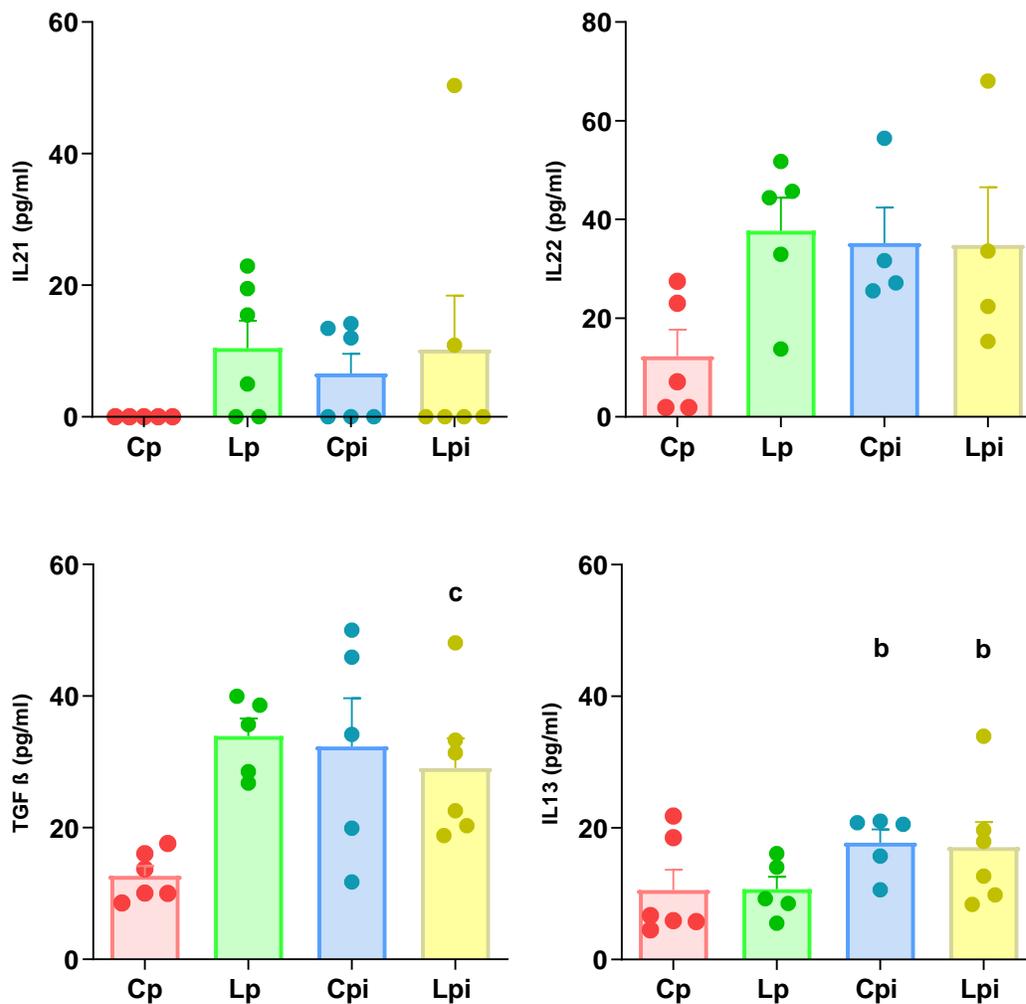
### 3.3.3 Identificación de efectos mixtos en los cambios en los perfiles de expresión de citoquinas Th1, Th2 y Th17 condicionados por la infección con *L. infantum* y la desnutrición moderada en el colon.

En comparación la respuesta mediada por citoquinas en el duodeno, tanto la desnutrición, la infección y su interacción, causaron un aumento en la concentración promedio de las diferentes citoquinas evaluadas en los diferentes grupos Lp, Cpi y Lpi, frente a la concentración en el grupo Cp. Teniendo en cuenta que el aumento resulto generaliza, no resulto igualmente significativo. Evaluando la significancia estadística por citoquina perfil de citoquinas, se observaron cambios significativos para INF $\gamma$  en los grupos Lp ( $p < 0.005$ ) y Lpi ( $p < 0.01$ ), TNF $\alpha$  en los grupos Lp ( $p < 0.01$ ), Cpi ( $p < 0.05$ ) y

Lpi ( $p < 0.01$ ), IL12 Lp y Lpi ( $p < 0.005$ ), como representantes del perfil Th1. En las citoquinas del perfil Th2, TGF $\beta$  en el grupo Lpi ( $p < 0.05$ ) y IL13 en los grupos Cpi y Lpi ( $p < 0.05$ ). Finalmente, en las citoquinas Th17, solo IL17A mostro diferencias estadísticamente significativas por efecto de la desnutrición en Lp ( $p < 0.01$ ) y Lpi ( $p < 0.05$ ) (**Anexo E**).

**Figura 3.3.2. Variación en la concentración citoquinas Th1, Th17 y Th2 en colon proximal de los animales BALB/c desnutridos e infectados con *L. infantum*.** Cambios en los valores de concentración para cada citoquina evaluada normalizadas frente al promedio del grupo Cp, en duodeno y colon proximal.  $\pm$ SEM ( $n=6$ ). Significancia estadística obtenida mediante el análisis de ANOVA de dos vías (factores), mostrando diferencias significativas por la dieta (a), infección (b), y por la interacción dieta-infección (c).





Es importante mencionar que la evaluación en el cambio de quimioquinas y citoquinas se realizó en las cuatro secciones del intestino, pero solo el duodeno y colon proximal mostraron cambios de concentración con diferencias estadísticamente significativas.

### 3.4 Alteraciones en la expresión génica de citoquinas del duodeno y colon por restricción proteica en ratones BALB/c

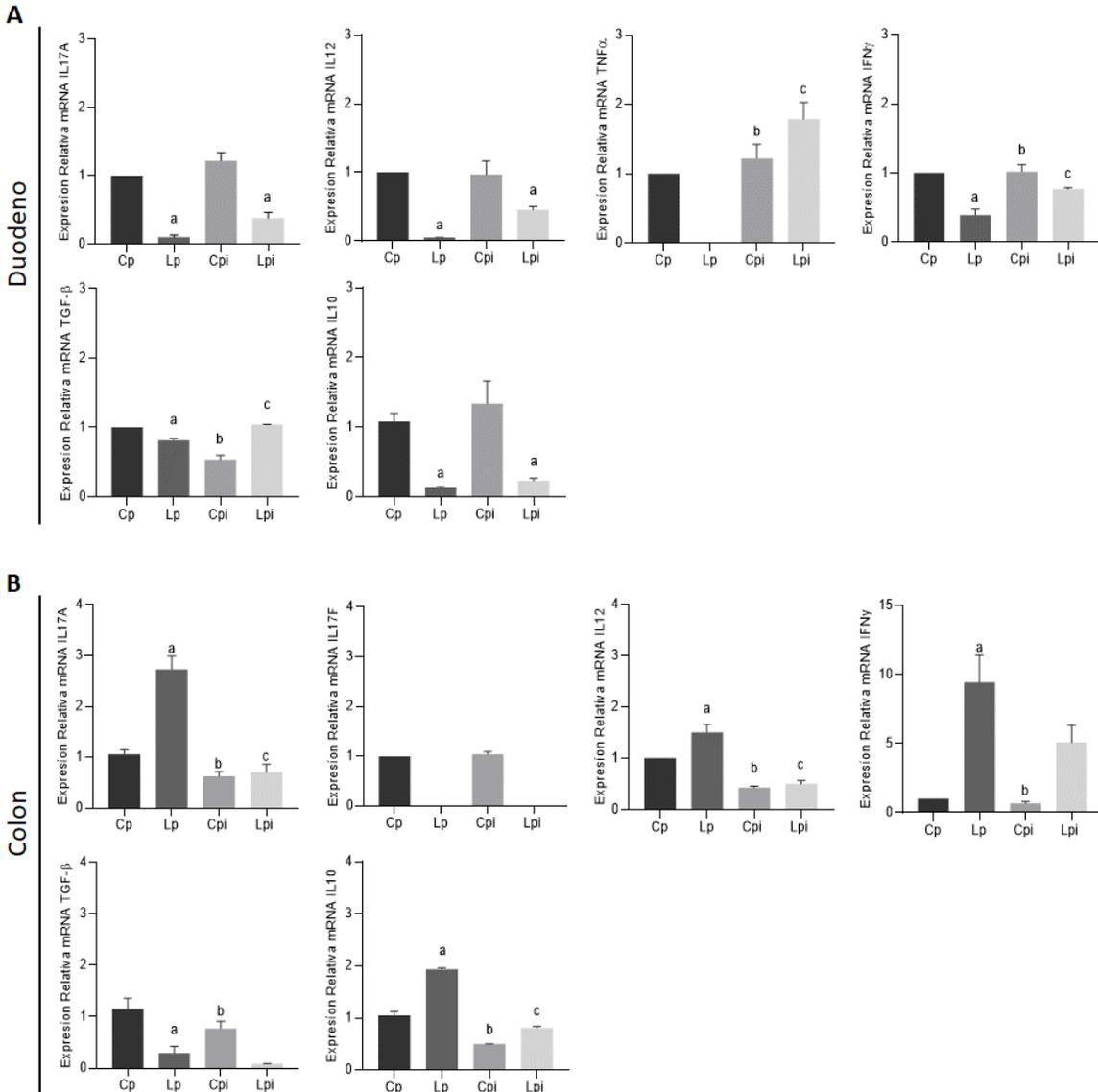
Evidenciando que el tratamiento logra modificar la concentración de citoquinas y teniendo en cuenta que estos cambios pueden originarse a partir de alteraciones en la transcripción, evaluamos mediante qPCR cambios en la expresión de RNA mensajero para IL17A, IL17F, IL12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e IL10. La medición de citoquinas proinflamatorias en duodeno reflejo una fuerte regulación a la baja en la expresión génica

de IL17A ( $p < 0.005$ ), IL12 ( $p < 0.01$ ), TNF- $\alpha$  (no detectada) e IFN $\gamma$  ( $p < 0.001$ ), por efecto de la restricción proteica. La infección con *L. infantum* mostró tener un impacto menor en la expresión génica, evidenciando aumentos en TNF- $\alpha$  ( $p < 0.001$ ), IFN $\gamma$  ( $p < 0.01$ ) y IL17A o IL12 mostraron aumento, aunque no significativo. Para el grupo Lpi se mostró un efecto atribuido a la interacción entre nutrición e infección para TNF- $\alpha$  ( $p < 0.005$ ) e IFN $\gamma$  ( $p < 0.05$ ) y aunque para IL17A e IL12 la restricción proteica resultó significativa, presenta una tendencia similar hacia un efecto combinado de ambos tratamientos. En duodeno, aunque se midió IL17F no se obtuvieron niveles detectables. Con relación a las citoquinas antiinflamatorias, IL10 ( $p < 0.005$ ) mostró ser fuertemente regulada por la restricción proteica de forma similar a la observada en las citoquinas proinflamatorias. TGF $\beta$  resultó regulada a la baja por infección o nutrición ( $p < 0.005$ ) y al alta por efecto de la interacción de tratamientos ( $p < 0.0005$ ), todos comparados frente al control (**Figura 3.4 A**).

En colon, por efecto de la infección con *L. infantum* se observó una regulación a la baja para IL17A ( $p < 0.005$ ), IL12 ( $p < 0.0005$ ), IFN $\gamma$  ( $p < 0.05$ ) e IL10 ( $p < 0.0001$ ). De forma contraria, la restricción proteica indujo un aumento significativo en la expresión génica de IL17A ( $p < 0.005$ ), IL12 ( $p < 0.01$ ), IFN $\gamma$  ( $p < 0.005$ ) e IL10 ( $p < 0.0001$ ). Por efecto de la interacción entre tratamientos se observó una regulación a la baja para IL17A ( $p < 0.0005$ ), IL12 ( $p < 0.05$ ) e IL10 ( $p < 0.0001$ ), IFN $\gamma$  fue la única citoquina que presentó un aumento por efecto de la interacción, aunque no resultó significativo. TGF $\beta$  mostró estar más fuertemente regulada por la restricción proteica ( $p < 0.0005$ ) que, por la infección ( $p < 0.05$ ), haciendo que los efectos de la interacción de tratamientos resulten en casi la anulación de su expresión. Para este tejido en particular, aunque TNF- $\alpha$  fue procesada, sus niveles no fueron detectables en ninguno de los tratamientos o control, y al evaluar IL17F como citoquina proinflamatoria que potencia la respuesta de IL17A fue detectada solo en el colon de los grupos Cp y Cpi y fuertemente regulado por la restricción proteica. (**Figura 3.4 B**).

**Figura 3-4: Niveles de expresión relativa de citoquinas en el duodeno y colon de los animales BALB/c desnutridos e infectados con *L. infantum*.** **A.** Expresión relativa de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en duodeno. **B.** Expresión relativa de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en colon. Los niveles de mRNA medidos por qPCR y cuantificando se expresión relativa a la media geométrica de cuatro genes de expresión constante como normalizadores. Las diferencias estadísticas fueron determinadas usando el análisis de ANOVA de dos vías con Turkey pos-Hoc Test. Diferencias: A. IL17A: por dieta a: ( $p < 0.005$ ), IL12: por dieta: a ( $p < 0.01$ ), TNF- $\alpha$ : por infección e interacción: b-c ( $p < 0.001$ ), IFN $\gamma$ : por dieta: a ( $p < 0.001$ ), por infección e interacción: b-c ( $p < 0.01$ ), TGF $\beta$  por dieta e infección: a-b ( $p < 0.005$ ), por interacción: c

( $p < 0.0005$ ) e IL10: por dieta: a ( $p < 0.005$ ). B. IL17A: por dieta a: ( $p < 0.005$ ), por infección: b ( $p < 0.005$ ), por interacción: c ( $p < 0.0005$ ), IL12: por dieta: a ( $p < 0.01$ ), por infección: b ( $p < 0.0005$ ), por interacción: c ( $p < 0.05$ ), IFN $\gamma$ : por dieta: a ( $p < 0.005$ ), por infección: b ( $p < 0.05$ ), TGF $\beta$ : por dieta: a ( $p < 0.0005$ ), por infección: b ( $p < 0.05$ ) e IL10: por dieta, infección e interacción: a-b-c ( $p < 0.0001$ ).



### **3.5 Cambios en la respuesta inmune local mediada por IgA por efecto de la restricción de proteínas en la dieta e infección con *L. infantum* en los segmentos intestinales de los ratones BALB/c**

#### **3.5.1 La desnutrición moderada y la infección con *L. infantum* inducen cambios en la concentración de IgA secretada en la luz del duodeno de los ratones BALB/c.**

A partir de muestras colectadas durante el día 21 del contenido de la luz en los diferentes segmentos intestinales, se evaluó si la desnutrición moderada o la infección con *L. infantum* pueden llegar a alterar la concentración (ng/ml) de IgA secretada (SIgA) localmente en los ratones BALB/c (**Figura 3.5.1**).

Dentro de los segmentos que constituyen el intestino delgado, en base a los resultados obtenidos se observaron cambios en la concentración promedio de SIgA en el duodeno (**A**), cambios caracterizados por el aumento generalizado en la concentración de SIgA para los grupos Lp (303ng/ml), Cpi (532ng/ml) o Lpi (141ng/ml), frente a la concentración de SIgA en el grupo Cp (7,3ng/ml) la cual resulto particularmente baja. Por medio de los análisis estadísticos, fue posible identificar diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.0001$ ) entre los grupos Cpi y Cp, posiblemente a causa de la infección con *L. infantum*. Por otra parte, a causa de la restricción de proteínas en la dieta se identificó una diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) leve entre los grupos Lp y Cp. Aunque el grupo Lpi mostro un aumento en la concentración de SIgA, no resulto ser estadísticamente significativo. Al proceder con la disposición anteroposterior del intestino, y tras analizar los cambios en la concentración de SIgA en la luz intestinal del yeyuno (**B**), se observó una fuerte regulación negativa en la concentración de SIgA apreciable a través de una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ) entre los grupos Cpi (27ng/ml) y Lpi (31ng/ml), frente a la concentración de SIgA en el grupo Cp (594ng/ml). Para este segmento del intestino, no se identificaron cambios entre los grupos LP (589ng/ml) y Cp, lo cual permite suponer que los efectos observados están relacionados localmente a la infección más que por desnutrición o la interacción. Finalmente, en la sección terminal del intestino delgado o íleon (**C**), no se observaron cambios en la concentración de SIgA que a su vez resultarían significativos por efecto de la restricción proteica Lp (29ng/ml), infección Cpi (15 ng/ml) o la interacción Lpi (31 ng/ml), frente al grupo Cp (27ng/ml).

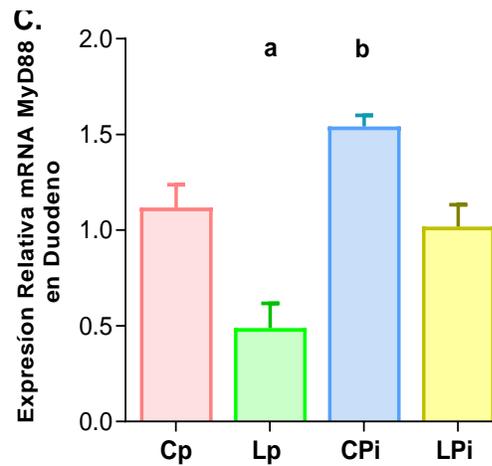
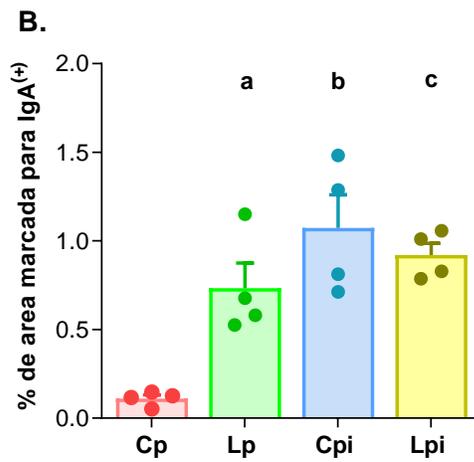
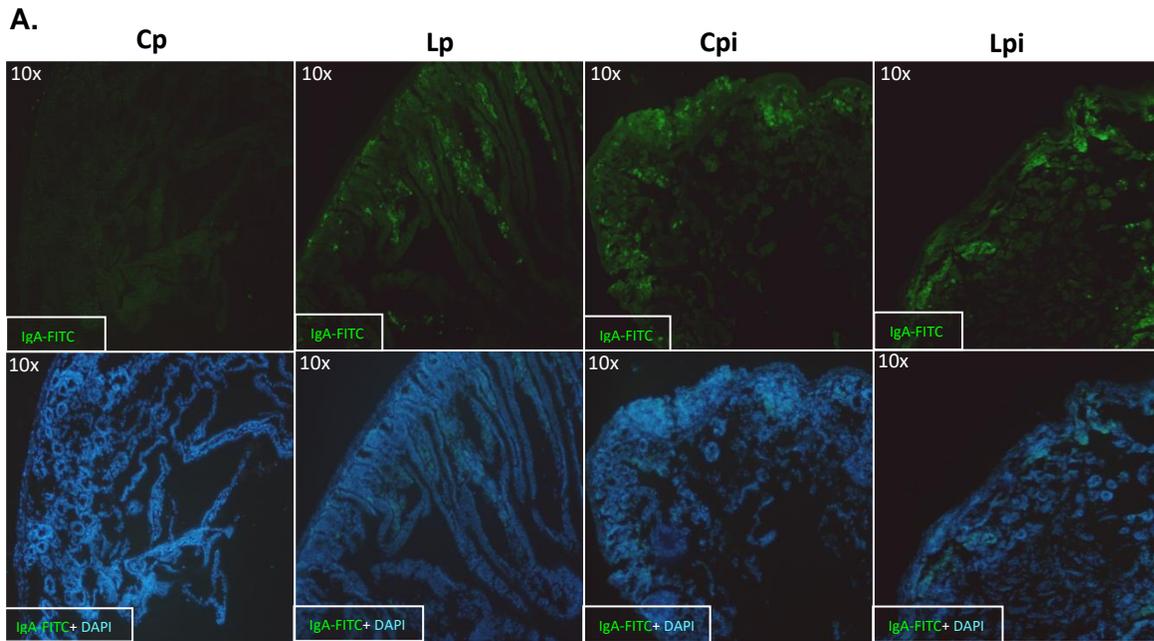


### 3.5.2 La desnutrición moderada y la infección con *L. infantum* inducen cambios en la proporción y distribución tisular de IgA en el duodeno de los ratones BALB/c.

Con frecuencia cambios en la concentración local de SIgA en la luz intestinal, resultan estar asociadas con un desequilibrio en la homeostasis tisular. A consecuencia de este, no solo se compromete la secreción de IgA hacia la luz intestinal, sino que también puede afectar su producción y distribución a través de la lámina propia. A modo exploratorio tomando el duodeno como tejido blanco para evaluar los efectos de la restricción de proteína en la dieta o la infección con *L. infantum* para inducir cambios en la IgA contenida a través de la lámina propia. Inicialmente fue posible observar exitosamente la marcación de la IgA presente a través de la lámina propia en los diferentes individuos de cada grupo (**Figura 3.5.2**). Observando cambios en el patrón de distribución de la IgA tisular apreciables principalmente entre los individuos del grupo Lp, mostrando un patrón de distribución con una mayor cantidad de IgA orientada hacia las velocidades del duodeno con dirección hacia la luz intestinal, para ser exteriorizada. En contraste, la IgA en los individuos del grupo Cpi mostro una mayor cantidad de IgA hacia a parte media de la lámina propia o la ausencia de un patrón discernible para el grupo Lpi (**A**). En base a los resultados observados respecto al cambio a los cambios en el porcentaje de las áreas positivamente marcadas para IgA, se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.0005$ ) en el porcentaje de IgA para el grupo Cpi (1,1%), frente al porcentaje de IgA en el grupo Cp (0,1%). Adicionalmente, fue posible identificar un aumento moderadamente significativo ( $p = 0.01$ ) en el porcentaje de IgA en el grupo Lpi (0,9%) y Lp (0,7%), frente al porcentaje de IgA del grupo Cp (**B**).

Por último, evaluando los cambios transcripcionales en la expresión relativa de los mensajeros para MyD88, que como proteína actúa como intermediario clave en la respuesta inmune mediada por los receptores tipo Toll, que consecuentemente inducen una respuesta inmune efectiva dependiente de anticuerpos en respuesta a diferentes patógenos intestinales, fue posible observar como en función de la infección se apreció un aumento significativo ( $p < 0.005$ ) de MyD88 para el duodeno de los miembros del grupo Cpi, y por otra parte, en los grupos Lp, se generó una disminución en el transcrito de MyD88 de forma significativa ( $p < 0.005$ ), frente al grupo Cp. Aunque para el grupo Lpi también se observó una disminución en la expresión de transcritos, esta disminución no resulto estadísticamente significativa (**C**).

**Figura 3.5.1. Cambios tisulares de IgA en el duodeno de los ratones BALB/c sometidos a restricción proteica e infección con *L. infantum*.** Imágenes representativas de IgA tisular (verde) y núcleos marcados con DAPI (azul) detectados en cortes de duodeno (A). Porcentaje de áreas marcada positivamente para IgA (B) para (n=4) animales por grupo. Cambios en la relativa de MyD88 en duodeno (C).  $\pm$ SEM (n=6). Significancia estadística obtenida mediante el análisis de ANOVA de dos vías (factores), mostrando diferencias significativas por la dieta (a) ( $p=0.01$ ), por la infección (b) ( $p < 0.0005$ ), e interacción (c) ( $p=0.01$ ) en (B), por la dieta (a) e infección (b) ( $p < 0.005$ ) en (B), y por interacción (c) ns= no significativo.



## 4. Discusión

Con un enfoque en restricción proteica como precondition frente a una infección, corroboramos que el modelo BALB/c presentó un estado de desnutrición moderada [84], caracterizado por pérdida en el peso corporal, tal como se observa en niños con desnutrición proteica [4, 86] o modelos murinos [87]. Como parte de una desnutrición proteica sostenida y antecediendo al deterioro sistémico de un individuo, resalta la alteración de órganos linfoides primarios como el timo [88] o secundarios como el bazo [89] y de forma similar a lo observado en nuestro modelo [8], estos órganos experimentan una disminución en su peso, efecto inverso al causado por la respuesta a la infección con LV, en el cual se genera hiperplasia de hígado y bazo [90]. En el modelo murino se identificaron cambios en la concentración de proteínas marcadoras de estrés nutricional, así la restricción proteica alteró la producción de hormonas leptina e IGF1, resultando disminuidas frente a un aumento del glucocorticoide corticosterona, lo cual refleja un desbalance asociado a atrofia funcional del timo cuando es inducido por desnutrición [88, 91, 92], que sin embargo no se presenta por la infección con *L. infantum* u otros modelos [93].

En un principio, el tropismo visceral que presenta *L. infantum* se restringió al hígado, bazo y médula ósea [1, 94-96]. En estudios posteriores se logró identificar un fuerte tropismo al timo, y ahora se sabe que existe un patrón de diseminación más extenso a órganos con un sistema inmune asociados a mucosas como son los pulmones, riñones o intestinos, lo cual establece una relación entre la aparición de patologías locales con la presencia de *L. infantum* o *L. donovani* como agentes causantes de LV [97-102]. Poco o nada, se ha evaluado el efecto de LV sobre los parámetros morfométricos en estos órganos blanco de infección no canónicos y en el modelo de forma similar a lo observado en hígado y bazo, la restricción proteica indujo una disminución en el peso del intestino, junto a un leve aumento por efecto de la infección; aumento que podría estar relacionado a la identificación de hiperplasias en los folículos linfoides del intestino delgado (Placas

de Peyer) o folículos linfoides aislados del intestino grueso. Resultado que clínicamente se encuentra asociado al desencadenamiento de una respuesta inflamatoria local, posiblemente por el reconocimiento de antígenos provenientes de *L. infantum* [103] o el aumento de antígenos provenientes del microbiota en estado de disbiosis, que genera un aumento de células linfoides y la diferenciación de células B a células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas. En este trabajo la hiperplasia linfoide se identificó predominantemente en el yeyuno de los grupos infectados, siendo la sección del intestino delgado que presenta un mayor número de Placas de Peyer en modelos murinos [104]. En la mayoría de los casos, alteraciones macroscópicas del intestino acompañan a alteraciones microscópicas mayormente de tipo inmune que conducen a eventos de inflamación que, al volverse crónica puede generar daños a nivel tisular de forma similar a lo ocurrido en la colitis ulcerosa. En nuestro modelo observamos como las alteraciones de tipo inmune y más puntualmente las que involucraron infiltraciones de células linfoides en la lámina propia de la mucosa, resultaron ser las más frecuentes. La desnutrición o la infección son capaces de inducir alteraciones de forma independiente y la severidad está estrechamente relacionada a la intensidad del estímulo, lo cual indica que con niveles de desnutrición severa o con una mayor progresión y establecimiento de una infección, se causan daños tisulares mayores [87]. Aunque nosotros no logramos identificar formas amastigote o KDNA de *L. infantum* libres o parasitando monocitos, los grupos Cpi y Lpi resultaron tener una mayor afectación a nivel histológico con los valores más altos por ocurrencias y severidad, lo cual puede considerarse un indicio de correlación entre la desnutrición e infección con *L. infantum*, para el intestino delgado. En el caso del colon esta correlación no se hace evidente ya que como factor determinante inductor de alteraciones resalta la desnutrición más que la infección, debido probablemente a las adaptaciones propias del colon como su multicapa gruesa de moco que limita aún más el contacto con agentes patógenos, o la ausencia de vellosidades, que resultan un posible punto de entrada de parásitos o lugar de establecimiento de los mismos como se ha reportado para *L. infantum* en otros modelos [103, 105].

El intestino se considera un microambiente complejo con respuestas pro y antiinflamatorias presentes, y producidas en respuesta a estímulos como la dieta o el microbioma, razón por la cual, en eventos inflamatorios, moléculas mediadoras de la respuesta inmune antagonizan entre sí de tal forma que propende un equilibrio que

previene una exacerbación o una respuesta insuficiente que no logre mantener la integridad funcional del tejido [106]. En la actualidad, se ha establecido que una respuesta inmune eficaz y protectora contra LV se basa en lograr montar una respuesta predominantemente proinflamatoria que inicia con la expresión de IL12 por parte de macrófagos activados o células dendríticas que reconocen y fagocitan parásitos. Posteriormente, IL12 direcciona la producción de IFN $\gamma$  por células T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> activas y Natural killer, que a su vez actúa como factor activador de monocitos y otras células T para generar la producción de TNF- $\alpha$ , el cual potencia la resolución de la infección por medio de granulomas. De forma paralela, IL17A favorece el desarrollo del granuloma y la resolución de la infección que al actuar de forma sinérgica con IFN $\gamma$  son capaces de regular la carga parasitaria en hígado y bazo de animales infectados con LV. La respuesta está acompañada y regulada por IL10 o TGF- $\beta$  [107-109]. En ratones BALB/c la respuesta inmune a LV difiere, se retrasa el desarrollo de una fase aguda y de esta forma se promueve la progresión acelerada de la infección, favoreciendo incrementos considerables en la carga parasitaria del hígado o bazo [95, 110]. Con base en la expresión de citoquinas, logramos establecer patrones similares de respuesta por parte de las citoquinas proinflamatorias en función de la infección o la restricción proteica o la interacción, patrones que también resultaron diferentes entre duodeno y colon. Como parte de la heterogeneidad de respuestas que puede desarrollar BALB/c, observamos animales que no presentaron una respuesta diferencial frente al control, siendo más frecuentes en el duodeno que el colon. Por efecto de la infección con *L. infantum*, en duodeno se observó una tendencia a la reducción en la expresión de todas las citoquinas proinflamatorias evaluadas, lo cual concuerda con un modelo de respuesta a Leishmania, caracterizado por una mayor expresión de TGF- $\beta$  que fuera de regular negativamente la expresión de citoquinas proinflamatorias, se le ha atribuido el efecto de retrasar la curación de la infección y contribuye con su establecimiento sistémico [111]. Según la dinámica temporal establecida por varios autores, sobre la infección con LV en modelos murinos, la expresión proteica y génica de las citoquinas varía en concordancia a la carga parasitaria. Estableciendo que, un aumento en la carga parasitaria del hígado o bazo genera un incremento de citoquinas proinflamatorias desde las primeras horas de infección hasta 12 o 15 días post infección, tiempo a partir del cual tiende a disminuir. Este comportamiento resulta sucesivo hasta alcanzar el control y cura de la enfermedad [112]. Por efecto de la infección se observó en duodeno un aumento en la expresión génica de las citoquinas proinflamatorias e IL10 que, de llegar a convertirse en proteína,

resultaría similar a la dinámica oscilante de citoquinas en respuesta a LV ya descrita. En contraste, por efecto de la restricción proteica los animales experimentaron menores cambios frente al control, aunque se apreció un aumento en las citoquinas proinflamatorias y TGF- $\beta$ , lo cual indica que la desnutrición moderada no afecta significativamente la respuesta inmune del duodeno, e incluso al desencadenarse un evento inflamatorio en respuesta al cambio de dieta o disbiosis, es posible llegar a su control para volver a un estado de homeostasis. A nivel transcripcional, se observó una muy fuerte regulación a la baja de la expresión génica para todas las citoquinas pro o antiinflamatorias. Lo cual puede ser la representación del efecto inmunosupresor atribuido a la desnutrición proteica sostenida en el tiempo, que conlleva a una respuesta inmune disminuida.

La respuesta inmune mediada por citoquinas en colon presentó un patrón de respuesta más homogéneo que el observado en el duodeno, caracterizado por el aumento generalizado de las citoquinas pro y antiinflamatorias de forma independiente a la infección o restricción proteica, mostrando un aumento en las citoquinas proinflamatorias junto al aumento de TGF- $\beta$  como citoquina reguladora de inflamación. A nivel transcripcional la restricción proteica resultó ser un regulador positivo de inflamación, lo cual indica una respuesta inmune sostenida que será potencialmente regulada por IL10 más que TGF- $\beta$ . Es de resaltar que la infección se identificó por una regulación negativa de la expresión de todas las citoquinas medidas.

La interacción entre desnutrición e infección en humanos se ha descrito como un proceso sinérgico que deteriora aún más la salud de un individuo; en el modelo BALB/c más que un efecto sinérgico se observó un perfil inmune mediado por citoquinas de tipo mixto, en el cual se evidencia respuesta proinflamatoria regulada por respuestas antiinflamatorias que promueven la homeostasis local [112, 113]. Aunque un perfil de citoquinas mixto no concuerda con una respuesta clásica a LV en humanos, si resulta útil para el estudio de LV en pacientes asintomáticos [114] en los que se han observado respuestas adaptativas similares.

La identificación de altos niveles de IgA circulante en suero en animales desnutridos concuerda con lo observado en niños con desnutrición [115, 116] u otros modelos [117]. A

su vez, el aumento en la concentración de IgA en respuesta a la infección con *L. infantum* sugiere el montaje de una respuesta humoral [85]. Siendo la IgA la inmunoglobulina dominante que controla la homeostasis intestinal, neutraliza agentes patogénicos provenientes de la dieta, microbiota intestinal o residuos producidos durante la restauración tisular induce la regulación tolerogénica [118, 119]. En duodeno, gracias a la tolerancia inmune a antígenos de la dieta más significativa en intestino delgado que grueso por su función digestiva, es probable que se observe una menor producción y secreción de IgA por efecto de la restricción proteica.

Por efecto de la infección, se observó una mayor respuesta humoral mediada por un aumento tisular y luminal de IgA. Este aumento particular se relaciona con el resultado previo en el que se mostró la hiperplasia de las placas de Peyer de los grupos infectados, en los cuales se asocia un aumento en la producción de IgA por las células plasmáticas locales, y consecuentemente un aumento de la concentración de IgAS [120-122].

En colon la regulación tolerogénica controla la proliferación, establecimiento y traslocación de diferentes poblaciones microbianas, secretando IgA específica que reconocer familias específicas de bacterias propias del microbiota normal, manteniendo de esta forma un equilibrio que logra prevenir eventos disbióticos y promover el desarrollo de microorganismos no patogénicos manteniendo la salud intestinal [123]. En colon la restricción proteica se estableció como el factor determinante de los cambios en los niveles de IgAS, lo cual indica el cambio de dieta y sus efectos en colon pueden promover el crecimiento de ciertas poblaciones bacterianas controladas por un aumento de IgAS.

En resumen, nuestros resultados muestran como la desnutrición moderada induce una variedad de alteraciones estructurales, inmunes y funcionales en los diferentes segmentos del intestino, que logran alterar la forma como el duodeno y colon responden a la infección con *L. infantum*. Esta respuesta alterada puede facilitar la diseminación de parásitos resultando en formas más severas de la enfermedad cuando hay una precondition de desnutrición. Además, nuestros resultados revelan que la infección per se, logra desencadenar una la respuesta inmune local inflamatoria que puede llegar a una eliminación del parásito, aunque por la concomitancia con desnutrición este proceso puede verse afectado generando una dificultad sistémica para controlar la Leishmaniasis.



## **5. Conclusiones y recomendaciones**

### **5.1 Conclusiones**

La infección por *L. infantum* indujo un aumento en el tamaño de las placas de Peyer en el yeyuno de ratones BALB/c, macroscópicamente apreciables.

La infección y la desnutrición causan cambios microscópicos, siendo el infiltrado linfóide la alteración más frecuentemente observada.

Se identificó un efecto sinérgico entre la desnutrición y la infección de manera comparable para cada segmento del intestino delgado.

Una condición previa de la desnutrición aumenta el número y la gravedad de los cambios inmunes y estructurales en los diferentes segmentos del intestino y estos se acompañan de un aumento en la respuesta antiinflamatoria, mediada por citoquinas, lo que podría resultar en la colonización y el establecimiento de parásitos en estos tejidos.

Aunque no es posible detectar parásitos en estos tejidos después de 15 días de infección, ya es posible observar respuestas asociadas exclusivamente con la infección por *L. infantum* en estos tejidos. Sin embargo, estas respuestas son revocadas por la condición previa de la desnutrición, lo que indica el efecto perjudicial que la deficiencia de proteínas en la dieta ejerce sobre este tejido en animales infectados.

### **5.2 Recomendaciones**

Con el fin de llegar a una caracterización más específica de los cambios funcionales en segmentos del intestino, se recomienda evaluar el efecto de la desnutrición y la infección por *L. infantum* sobre la permeabilidad celular, midiendo la Calprotectina como marcador.

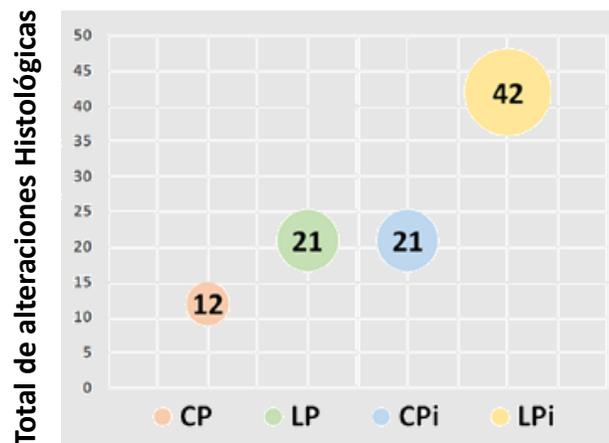
Para el análisis de la función de barrera, también se recomienda evaluar los niveles de expresión (ARNm) de proteína de unión estrecha-1 (TJP1), claudina2 (CLDN2), claudina4 (CLDN4) y claudina15 (CLDN15). Asociado a esta recomendación, cabe mencionar que como parte de la consecución del tercer objetivo, se realizó un análisis proteómico usando como tejido evaluado el Yeyuno por la factibilidad de recurrir a mas materia después de la extracción. En este caso en particular hubo una falla técnica en la cual a pesar de haber podido extraer una concentración considerable de proteínas, el procesamiento de masas en tándem, no generó resultados para el grupo control Cp, lo cual anula la opción de comparación entre todos los grupos.

También se recomienda evaluar la posible existencia de una traslocación biótica entre diferentes segmentos del intestino mediante el uso del inmunoensayo EndoCab, que evalúa diferentes poblaciones bacterianas, junto con la evaluación de CD14 soluble.

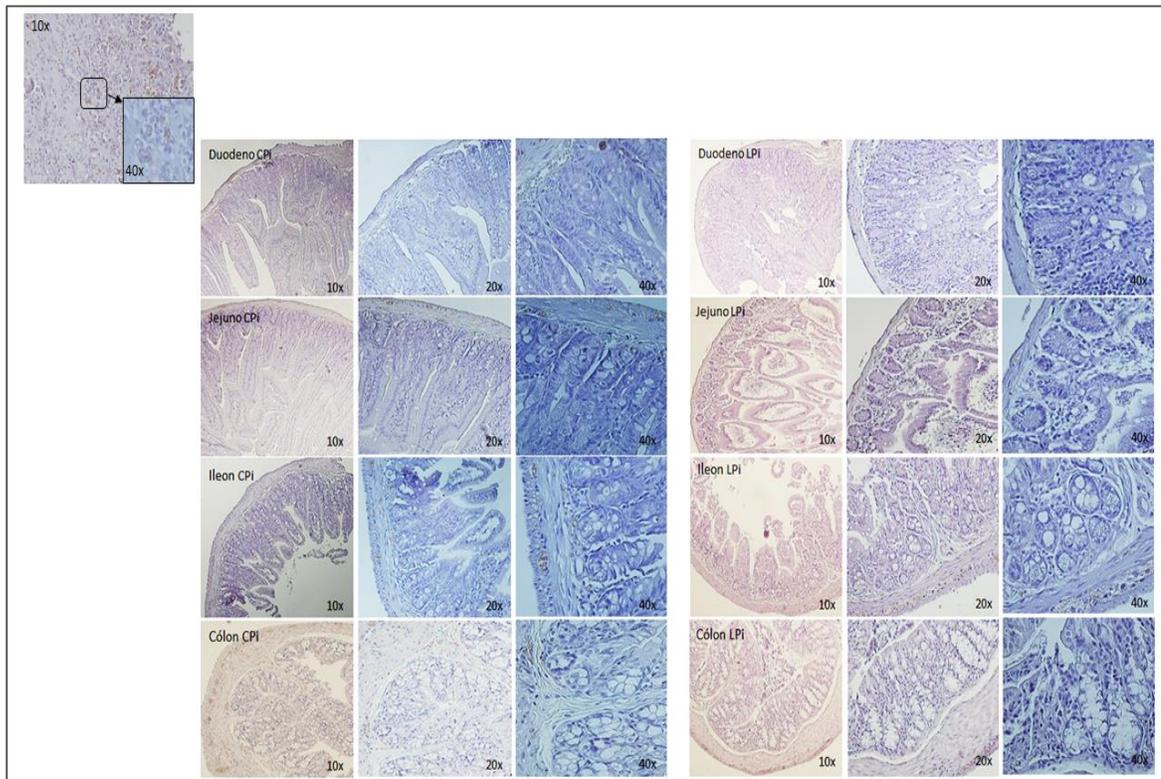
Como perspectiva a largo plazo, evaluar si la desnutrición y/o la infección por *L. infantum* alteran el microbiota intestinal de ratones BALB/c, pretendemos análisis metagenómico del contenido luminal de duodeno y colon.

## A. Anexo: Amplificación de KDNA por qPCR de ratones BALB/c infectados con *L. infantum*.

Tipo de alteración		Puntuación	Cp	Lp	Cpi	Lpi
Infiltrado inflamatorio linfocitario en la lámina propia	Discreto	1	5	8	7	10
	Moderado	2	2	0	4	12
	Transmural	3	0	3	0	0
Infiltrado inflamatorio linfocitario en la submucosa	Discreto	1	1	1	0	0
	Moderado	2	0	2	0	0
Neutrófilos, macrófagos y células plasmáticas		1	1	2	6	16
Hiperplasia linfoide		1	0	1	2	3
Atrofia de vellosidades		1	3	2	2	1
Ulceras		1	0	2	2	0
Total, de alteraciones histológica			12	21	21	42

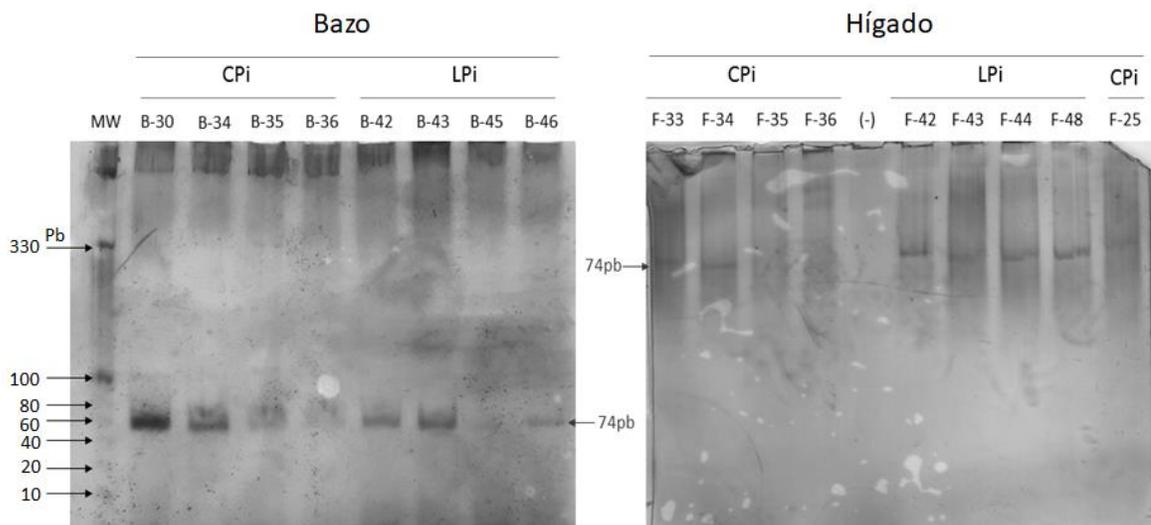


## B. Anexo: Análisis inmunohistoquímico de la presencia de *L. infantum* en las secciones del intestino de ratones BALB/c sometidos a restricción proteica e infección con *L. infantum*.



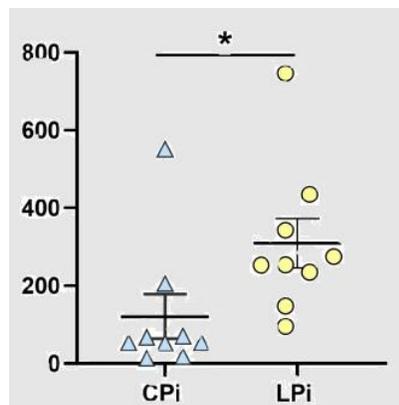
En la parte superior izquierda de la figura se muestra un control positivo de la marcación para *Leishmania* (nódulo linfático de perro infectado). Las demás figuras muestran imágenes representativas de las diferentes secciones del intestino de ratones pertenecientes al grupo (Cpi-izquierda) y (Lpi-derecha). No se identificaron parásitos en ninguno de los tejidos evaluados. n=6 animales por grupo

## C. Anexo: Amplificación de KDNA por qPCR de ratones BALB/c infectados con *L. infantum*.



PCR realizada según protocolo descrito anteriormente [5]. Correspondencia en Bazo de cuatro animales (Cpi), y cuatro animales (Lpi), corrido en gel de poliacrilamida del 7% y tinción con plata. MW =10-330pb (invitrogen). Correspondencia en hígado de cinco animales (Cpi) y cuatro animales (Lpi). En gel de poliacrilamida 15% y tinción con plata.

**Carga parasitaria (Parásitos/10<sup>9</sup> células)**





**D. Anexo: Determinación de los cambios en concentración de citoquinas y quimioquinas en el duodeno de ratones BALB/c sometidos a restricción proteica e infección con *L. infantum*.**

**Cambios en la concentración (pg/ml) de quimioquinas y citoquinas**

Duodeno				
Tipo de citoquina	Cp	Lp	Cpi	Lpi
<b>Quimioquina</b>				
CCL5	6.99	14.42	19.89	12.88
CXCL9	11.30	17.72	10.27	16.70
CXCL10	25.74	23.62	18.37	16.25
<b>Citoquinas Th1</b>				
INF $\gamma$	5.43	5.91	4.17	3.73
TNF $\alpha$	13.88	15.25	10.20	8.82
IL12	18.90	21.80	13.39	16.29
<b>Citoquinas Th17</b>				
IL17A	18.73	18.96	16.36	21.33
IL21	10.05	23.61	9.09	22.66
IL22	62.05	68.83	31.97	98.91
<b>Citoquinas Th2</b>				
TGF- $\beta$	34.72	39.72	29.78	24.78
IL13	23.97	28.15	19.91	24.10

## E. Anexo: Determinación de los cambios en la concentración de quimioquinas y citoquinas en el colon proximal de ratones BALB/c sometidos a restricción proteica e infección con *L. infantum*.

Cambios en la concentración (pg/ml) de quimioquinas y citoquinas

Tipo de citoquina	Colon			
	Cp	Lp	Cpi	Lpi
<b>Quimioquina</b>				
CCL5	14.12	26.52	8.53	20.75
CXCL9	6.70	4.74	7.29	5.32
CXCL10	15.99	16.73	17.87	18.61
<b>Citoquinas Th1</b>				
INF $\gamma$	294	5.50	3.99	4.50
TNF $\alpha$	7.65	12.21	8.26	11.60
IL12	11.74	18.49	14.18	16.04
<b>Citoquinas Th17</b>				
IL17A	11.86	15.68	16.55	12.73
IL21	3.30	8.41	5.23	10.34
IL22	23.75	25.00	36.27	35.02
<b>Citoquinas Th2</b>				
TGF- $\beta$	22.52	31.50	23.30	30.72
IL13	13.88	10.62	17.40	14.14

## Bibliografía

1. Antinori, S., Schifanella, L., Corbellino, M., *Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012. **31**(2): p. 109-18.
2. Cecilio, P., et al., *Deception and manipulation: the arms of leishmania, a successful parasite. Front Immunol*, 2014. **5**: p. 1-16.
3. McGwire, B.S., Satoskar, A. R., *Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. QJM*, 2014. **107**(1): p. 7-14.
4. Lima Maciel, B.L., Lacerda, H. G., Queiroz, J. W., Galvão, J., Pontes, N. N., Dimenstein, R., McGowan, S. E., Pedrosa, L. F. C., and Jerônimo, S. M. B., *Association of Nutritional Status with the Response to Infection with Leishmania chagasi. Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2008. **79**(4): p. 591–598.
5. Cuervo, E.S., Losada, B. M., Umana P. A., Porrozzi, R., Saboia, V. L., Miranda, L., Morgado, F. N., Menezes, R. C., Sanchez G. M., Cuervo, P., *T-cell populations and cytokine expression are impaired in thymus and spleen of protein malnourished BALB/c mice infected with Leishmania infantum. PLoS One*, 2014. **9**(12): p. e114584.
6. Schaible, U.E., Kaufmann, S. H., *Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts. PLoS Med*, 2007. **4**(5): p. e115.
7. Borelli, P., Mariano, M., and Borojevic, R., *Protein Malnutrition : Effect On Myeloid Cell Production And Mobilization Into Inflammatory Reactions In Mice. Nutrition Research*, 1995. **15**(10): p. 1477-1485.
8. Losada, B.M., Umaña, P. A., Cuervo, E. S., Berbert, L. R., Porrozzi, R., Morgado, N.F., Mendes-daCruz, A. D., Savino, W., Gómez, S. M., and Cuervo, P., *Protein malnutrition promotes dysregulation of molecules involved in T cell migration in the thymus of mice infected with Leishmania infantum. Scientific RepoRts* 2017. **7**(45991): p. 1-13.
9. Worbs, T., Bode, U., Sheng Yan, S., Hoffmann, M. W., Hintzen, G., Bernhardt, G., Förster, R., and Pabst, O., *Oral tolerance originates in the*

- intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. JEM, The Rockefeller University Press* 2006. **203**(3): p. 519–527.
10. Iweala, O.I., Nagler C. R., *Immune privilege in the gut: the establishment and maintenance of non-responsiveness to dietary antigens and commensal flora. Immunological Reviews* 2006. **213**: p. 82–100.
  11. Meleney, H.E., *The Histopathology of Kala-Azar in the Hamster, Monkey, and Man. Am J Pathol*, 1925. **1**(2): p. 147-168.
  12. Barati, M., Sharifi, I., Daie Parizi, M., and M. Fasihi Harandi, *Bacterial infections in children with visceral leishmaniasis: observations made in Kerman province, southern Iran, between 1997 and 2007. Ann Trop Med Parasitol*, 2008. **102**(7): p. 635-41.
  13. Kleber, G.L., Tuon, F. F., Duarte, M. I. S., Maia, G. M., Matos, P., de Oliveira Ramos, A. M., and Nicodemo, A. C., *Cytokine expression in the duodenal mucosa of patients with visceral leishmaniasis. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2010. **43**(4): p. 393-395.
  14. Adamama-Moraitou, K.K., Rallis, T. S., Koytinas, A. F., Tontis, D., Plevraki, K., and Kritsepi, M., *Asymptomatic Colitis In Naturally Infected Dogs With Leishmania Infantum: A Prospective Study. Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2007. **76**(1): p. 53–57.
  15. P. C. Sen Gupta, et al., *Avitaminosis in Kala-Azar: Preliminary Observations. Ind Med Gaz.* , 1952. **87**(10): p. 444–448.
  16. Quinnell, R.J. and O. Courtenay, *Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. Parasitology*, 2009. **136**(14): p. 1915-34.
  17. Akhoundi, M., et al., *A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. PLoS Negl Trop Dis*, 2016. **10**(3): p. e0004349.
  18. Steverding, D., *The history of leishmaniasis. Parasit Vectors*, 2017. **10**(1): p. 82.
  19. Volf\*, A.D.a.P., *Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. Dostálová and Volf Parasites & Vectors* 2012. **5**(5): p. 276.
  20. Carlos E. Muskus, M.M.V., *Metaciclogénesis: un proceso fundamental en la biología de Leishmania. Biomédica: revista del Instituto Nacional de Salud*, 2002 **22**(2): p. Biomédica: revista del Instituto Nacional de Salud.
  21. C Bogdan 1, N.D., R Döring, M Röllinghoff, A Diefenbach, M G Rittig, *Fibroblasts as Host Cells in Latent Leishmaniosis. J Exp Med.*, 2000. **191**(12): p. 2121–2129.
  22. Kaye, P. and P. Scott, *Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. Nat Rev Microbiol*, 2011. **9**(8): p. 604-15.
  23. WHO, *Weekly epidemiological record*.
  24. Alvar, J., et al., *Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e35671.

25. McCall, L.I., W.W. Zhang, and G. Matlashewski, *Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease*. PLoS Pathog, 2013. **9**(1): p. e1003053.
26. Mathers, C.D., M. Ezzati, and A.D. Lopez, *Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework*. PLoS Negl Trop Dis, 2007. **1**(2): p. e114.
27. Pavli, A. and H.C. Maltezou, *Leishmaniasis, an emerging infection in travelers*. Int J Infect Dis, 2010. **14**(12): p. e1032-9.
28. P.D., R., *Climate change: impact on the epidemiology and control of animal diseases*. Revue Scientifique et Technique, 2008. **27**(2): p. 399-412.
29. Purse, B.V., et al., *How will climate change pathways and mitigation options alter incidence of vector-borne diseases? A framework for leishmaniasis in South and Meso-America*. PLoS One, 2017. **12**(10): p. e0183583.
30. Peacock, C.S., et al., *Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease*. Nat Genet, 2007. **39**(7): p. 839-47.
31. William H Markle 1 and K. Makhoul, *Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment*. Am Fam Physician, 2004. **69**(6): p. 1455-60.
32. Valdir Sabbaga Amato a, Heitor Franco de Andrade Jr b, and M.I.S.D. c, *Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment*. Acta Tropica 2003. **85**: p. 39-49.
33. McGwire, B.S. and A.R. Satoskar, *Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment*. QJM, 2014. **107**(1): p. 7-14.
34. Salud., O.P.d.l., *Leishmaniasis: informe epidemiológico de las Américas [Internet]*. Washington, D.C.: OPS, 2021. **10**.
35. Salud., I.N.d., *Boletín Epidemiológico Semanal. Diciembre 2019. Reporte No. 41*. 2019.
36. Salud., I.N.d., *Boletín Epidemiológico Semanal. Diciembre 2021. Reporte No. 52*. 2021.
37. Salgado-Almarino, J., C.A. Hernandez, and C.E. Ovalle, *Geographical distribution of Leishmania species in Colombia, 1985-2017*. Biomedica, 2019. **39**(2): p. 278-290.
38. Khadem, F. and J.E. Uzonna, *Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy*. Future Microbiol, 2014. **9**(7).
39. Antinori, S., L. Schifanella, and M. Corbellino, *Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012. **31**(2): p. 109-118.
40. Kumar, R. and S. Nylen, *Immunobiology of visceral leishmaniasis*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 251.
41. Rodrigues, V., et al., *Regulation of immunity during visceral Leishmania infection*. Parasit Vectors, 2016. **9**: p. 118.
42. Gupta, G., S. Oghumu, and A.R. Satoskar, *Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis*. Adv Appl Microbiol, 2013. **82**: p. 155-184.

43. Asad, M.D. and N. Ali, *Dynamicity of Immune Regulation during Visceral Leishmaniasis*. Proceedings of the Indian National Science Academy, 2014. **80**(2): p. 247.
44. Vieira de Moraes, C.G., et al., *The Dialogue of the Host-Parasite Relationship: Leishmania spp. and Trypanosoma cruzi Infection*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 324915.
45. Vannier-Santos, M.A., A. Martiny, and W. de Souza, *Cell Biology of Leishmania spp.: Invading and Evading*. Current Pharmaceutical Design, 2002. **8**(4): p. 297-318.
46. Mougneau, E., F. Bihl, and N. Glaichenhaus, *Cell biology and immunology of Leishmania*. Immunological Reviews, 2011. **240** p. 286-296.
47. Stanley, A.C. and C.R. Engwerda, *Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis*. Immunology and Cell Biology 2007. **85**: p. 138-147.
48. Wilson, M.E., S.M. Jeronimo, and R.D. Pearson, *Immunopathogenesis of infection with the visceralizing Leishmania species*. Microb Pathog, 2005. **38**(4): p. 147-160.
49. Gollob, K.J., et al., *Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology*. Int Immunopharmacol, 2008. **8**(10): p. 1338-43.
50. Nylen, S. and D. Sacks, *Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis*. Trends Immunol, 2007. **28**(9): p. 378-384.
51. Faleiro, R.J., et al., *Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis*. PLoS Negl Trop Dis, 2014. **8**(7): p. e2914.
52. Diro, E., et al., *Atypical manifestations of visceral leishmaniasis in patients with HIV in north Ethiopia: a gap in guidelines for the management of opportunistic infections in resource poor settings*. The Lancet Infectious Diseases, 2015. **15**(1): p. 122-129.
53. Mowat, A.M. and W.W. Agace, *Regional specialization within the intestinal immune system*. Nature Reviews - Immunology, 2014. **14**: p. 667-685.
54. Steenwinckel, V., et al., *IL-9 promotes IL-13-dependent paneth cell hyperplasia and up-regulation of innate immunity mediators in intestinal mucosa*. J Immunol, 2009. **182**(8): p. 4737-43.
55. Ouellette, A.J., *Paneth cells and innate mucosal immunity*. Curr Opin Gastroenterol, 2010. **26**(6): p. 547-553.
56. Bain, C.C. and A.M. Mowat, *Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation*. Immunological Reviews 2014. **260**: p. 102–117.
57. Maynard, C.L., et al., *Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 931-941.
58. Veenbergen, S. and J.N. Samsom, *Maintenance of small intestinal and colonic tolerance by IL-10-producing regulatory T cell subsets*. Curr Opin Immunol, 2012. **24**(3): p. 269-276.

59. Mabbott, N.A., et al., *Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium*. *Mucosal Immunol*, 2013. **6**(4): p. 666-77.
60. Zeissig, S. and R.S. Blumberg, *Commensal microbiota and NKT cells in the control of inflammatory diseases at mucosal surfaces*. *Curr Opin Immunol*, 2013. **25**(6): p. 690-6.
61. Aldair J.W, et al., *Unusual Small Intestine Inflammatory Lesions in a Dog Whith Visceral Leishmaniasis*. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 2013. **6**(1): p. 19- 25.
62. F. Purchiaroni, et al., *The role of intestinal microbiota and the immune system*. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2013. **17**: p. 323-333.
63. Cornes, J.S., *Number, size, and distribution of Peyer's patches in the human small intestine. Part I The development of Peyer's patches*. *Gut*, 1965. **6**: p. 225 - 229.
64. J.L. Gonzaleiz, et al., *Intestinal amyloidosis in hamsters with visceral leishmaniasis*. *British Journal of Experimental Pathology*, 1986. **67**: p. 353-360.
65. Pinto, A.J., et al., *Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with Leishmania infantum*. *Acta Vet Scand*, 2011. **53**: p. 67.
66. Figueiredo, M.M., et al., *Expression of regulatory T cells in jejunum, colon, and cervical and mesenteric lymph nodes of dogs naturally infected with Leishmania infantum*. *Infect Immun*, 2014. **82**(9): p. 3704-12.
67. Silva, D.T., et al., *Correlation study and histopathological description of intestinal alterations in dogs infected with Leishmania infantum*. *Rev Bras Parasitol Vet*, 2016. **25**(1): p. 24-36.
68. FAO, F.y.P., *El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo 2015. Cumplimiento de los objetivos internacionales para 2015 en relación con el hambre: balance de los desiguales progresos*. 2015.
69. Black, R.E., et al., *Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences*. *The Lancet*, 2008. **371**(9608): p. 243-260.
70. FAO, *Panorama de la Inseguridad Alimentaria en América Latina y el Caribe*. 2015.
71. Mejía Naranjo, W. and M. Sánchez Gomez, *Protein malnutrition up-regulates growth hormone receptor expression in rat splenic B lymphocytes*. *Biomédica* 2004. **24**: p. 403-412.
72. Malafaia, G., *Protein-energy malnutrition as a risk factor for visceral leishmaniasis: a review*. *Parasite Immunol*, 2009. **31**(10): p. 587-96.
73. Mejia Naranjo, W., et al., *Protein Calorie Restriction Affects Nonhepatic IGF-I Production and the Lymphoid System: Studies Using the Liver-Specific IGF-I Gene-Deleted Mouse Model*. *Endocrinology* 2002. **143**(6): p. 2233–2241.

74. Malafaia, G., et al., *Protein-energy malnutrition decreases immune response to Leishmania chagasi vaccine in BALB/c mice*. Parasite Immunol, 2009. **31**(1): p. 41-9.
75. Muller, O. and M. Krawinkel, *Malnutrition and health in developing countries*. CMAJ, 2005. **173**(3): p. 279-286.
76. Hughes, S. and P. Kelly, *Interactions of malnutrition and immune impairment, with specific reference to immunity against parasites*. Parasite Immunol, 2006. **28**(11): p. 577-88.
77. Howes, A., et al., *Differential Production of Type I IFN Determines the Reciprocal Levels of IL-10 and Proinflammatory Cytokines Produced by C57BL/6 and BALB/c Macrophages*. J Immunol, 2016. **197**(7): p. 2838-53.
78. Grover, Z. and L.C. Ee, *Protein energy malnutrition*. Pediatr Clin North Am, 2009. **56**(5): p. 1055-68.
79. Evering, T. and L.M. Weiss, *The immunology of parasite infections in immunocompromised hosts*. Parasite Immunol, 2006. **28**(11): p. 549-565.
80. Ibrahim MK, et al., *The Malnutrition-Related Increase in Early Visceralization of Leishmania donovani Is Associated with a Reduced Number of Lymph Node Phagocytes and Altered Conduit System Flow*. PLoS Negl Trop Dis 2013. **7**(8): p. e2329.
81. Barragána, L.M., Adriana Umaña, P.A., Vega, R. A., Escobar, C. S., Renata Azevedo, R., Morgado, F., de Frias-Carvalho, V., Aquino, P., Carvalho, C. P., Porrozzia, R., Gómez, S. M., Padron, G., Cuervo, P., *Proteomic profiling of splenic interstitial fluid of malnourished mice infected with Leishmania infantum reveals defects on cell proliferation and pro-inflammatory response*. Journal of Proteomics 2019. **208**: p. 103492-14.
82. Prevatto, P.J., Torres, C.R., Diaz, L.B., Silva, R.M.P., Martins, A.M., and Carvalho, F. V., *Antioxidant Treatment Induces Hyperactivation of the HPA Axis by Upregulating ACTH Receptor in the Adrenal and Downregulating Glucocorticoid Receptors in the Pituitary*. Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2017. **2017**: p. 1-10.
83. Gómez, F., Galvan, R. R., Frenk, S., Muñoz, J. C., Chávez, R., and Vázquez, J., *Mortality in second and third degree malnutrition*. Bull World Health Organ, 2000. **78**(10): p. 1275–1280.
84. Anstead, G.M., Chandrasekar, B., Zhao, W., Yang, J., Perez, L. E., and Melby, P. C., *Malnutrition Alters the Innate Immune Response and Increases Early Visceralization following Leishmania donovani Infection*. Infection And Immunity, 2001. **69**(8): p. 4709–4718.
85. Pérez, M., Rojas, C., Hernández, O., Díaz, S., Alarcón, M., Zulay Maizo de Segnini, Z., Loredana Goncalves, L., Sánchez, M., *Determinación de la especificidad de IgA sérica producida en respuesta a antígenos de Leishmania (Leishmania) mexicana en leishmaniosis murina*. Invest Clin 2011. **53**(2): p. 216 - 229.
86. Marshall, S., *Protein-energy malnutrition in the rehabilitation setting: Evidence to improve identification*. Maturitas 2016. **86**: p. 77-85.

87. Attia, S., Feenstra, M., Swain, N., Cuesta, M., and Bandsma, R. H. J., *Starved Guts: Morphologic and Functional Intestinal Changes in Malnutrition. JPGN*, 2017. **65**(5): p. 491-495.
88. Savino, W., *The thymus gland is a target in malnutrition. European Journal of Clinical Nutrition* 2002. **56**: p. 46-49.
89. Rytter, M.J.H., Kolte, L., Briend, A., Friis, H., Christensen, V. B., *The Immune System in Children with Malnutrition—A Systematic Review. PLoS ONE* 2014. **9**(8).
90. Nascimento, M.S.L., Carregaro, V., Lima-Júnior, D. S., Costa, D. L., Ryffel, B., Duthie, D. S., de Jesus, A., Pacheco de Almeida, R., and Santana da Silva, J., *Interleukin 17A Acts Synergistically With Interferon  $\gamma$  to Promote Protection Against Leishmania infantum Infection. The Journal of Infectious Diseases*, 2015. **211**: p. 1015–26.
91. Maurya, R., Bhattacharya, P., Dey, R., Nakhasi, H. L., *Leptin Functions in Infectious Diseases. Front Immunol*, 2018. **9**: p. 2741.
92. Soares, R.O., Oliveira, L. M., Marchini, J. S., Rodrigues, A. J., Elias, L. L., Almeida, S. S., *Effects of early protein malnutrition and environmental stimulation on behavioral and biochemical parameters in rats submitted to the elevated plus-maze test. Nutr Neurosci*, 2013. **16**(3): p. 104-12.
93. Maurya, R., Bhattacharya, P., Ismail, N., Dagur, P. K., Joshi, A. B., Razdan, K., Philip McCoy J. P. Jr., Ascher, J., Dey, R., and Nakhasi, H. L., *Differential Role of Leptin as an Immunomodulator in Controlling Visceral Leishmaniasis in Normal and Leptin-Deficient Mice. Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2016. **95**(1): p. 109–119.
94. Khadem, F., and Uzonna, J. E., *Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. Future Microbiol.*, 2014. **9**(7): p. 901-15.
95. Faleiro, R.J., Kumar, R., Hafner, L. M., Engwerda, C. R., *Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis*, 2014. **8**(7): p. e2914.
96. Rodrigues, V., Cordeiro-da-Silva, A., Laforge, M., Silvestre, R., Estaquier, J., *Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. Parasit Vectors*, 2016. **9**: p. 118-31.
97. Pinto, A.J.W., Figueiredo, M. M., Ferreira, R. A., Caliari, M. V., Tafuri, L. W., *Unusual Small Intestine Inflammatory Lesions in a Dog with Visceral Leishmaniasis. Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 2013. **6**(1): p. 19-25.
98. Gonzalez, J.L., Insa, F., Novoa, C., and Pizarro, M., *Intestinal amyloidosis in hamsters with visceral leishmaniasis. Br. J. exp. Path.*, 1986. **67**: p. 353-360.
99. Amann, K., Bogdan, C., Harrer, T., and Rech, J., *Renal Leishmaniasis as Unusual Cause of Nephrotic Syndrome in an HIV Patient. J Am Soc Nephrol*, 2012. **23**: p. 586–590.
100. Alwazzeah, M.J., Alhashimalsayed, Z. H., *Visceral Leishmaniasis and Glomerulonephritis: A Case Report. Saudi J Med Med Sci* 2019. **7**: p. 40-3.

101. Bispo, A.J.B., Almeida, M. L. D., de Almeida, R. P., Bispo Neto, J., de Oliveira Brito A. V., França, C. M., *Pulmonary involvement in human visceral leishmaniasis: Clinical and tomographic evaluation. PLoS ONE* 2020. **15**(1): p. 1-12.
102. Alves, G.B.B., Pinho, F. A., Silva, S. M. M. S., Cruz, M. S. P., and Costa, F. A. L. , *Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with Leishmania (Leishmania) chagasi. Braz J Med Biol Res*, 2010. **43**(3): p. 310-315.
103. Silva, D.T., Neves, M. F., de Queiroz, N. M., Spada, J. C., Alves, M. L., Floro e Silva, M., Coelho, W. M., Panosso, A. R., Noronha Junior, A. C., Starke-Buzetti, W. A., *Correlation study and histopathological description of intestinal alterations in dogs infected with Leishmania infantum. Rev Bras Parasitol Vet*, 2016. **25**(1): p. 24-36.
104. Figueiredo, M.M., Deoti, B., Amorim, I. F., Pinto, A. J., Moraes, A., Carvalho, C. S., da Silva, S. M., de Assis, A. C., de Faria, A. M., Tafuri, W. L., *Expression of regulatory T cells in jejunum, colon, and cervical and mesenteric lymph nodes of dogs naturally infected with Leishmania infantum. Infect Immun*, 2014. **82**(9): p. 3704-12.
105. Pinto, A.J., Figueiredo, M. M., Silva, F. L., Martins, T., Michalick, M. S., Tafuri, W. L., Tafuri, W. L., *Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with Leishmania infantum. Acta Vet Scand*, 2011. **53**: p. 53-67.
106. Opazo, M.C., Ortega-Rocha, E. M., Coronado-Arrazola, I., Bonifaz, L. C., Boudin, H., Neunlist, M., Bueno, S. M., Kalergis, A. M., Riedel, C. A., *Intestinal Microbiota Influences Non-intestinal Related Autoimmune Diseases. Front Microbiol*, 2018. **9**: p. 432.
107. Dayakar, A., Chandrasekaran, S., Kuchipudi, S., and Kalangi S., *Cytokines: Key Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis: Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy. Front. Immunol*, 2019. **10**(670).
108. Murray, H., Flanders, K., Donaldson, D., Sypek, J., Gotwals, P., Liu, L., and Ma, X., *Antagonizing Deactivating Cytokines To Enhance Host Defense and Chemotherapy in Experimental Visceral Leishmaniasis. Infection And Immunity*, 2005. **73**(7): p. 3903–3911.
109. Adjei-Frempong, M., Minkah, B., Quaye, L., Acquah, S., Opoku, A., and Imrana, M., *Evaluation of changes in pro-inflammatory cytokines in malnourished children: A Ghanaian case study. Journal of Medical and Biomedical Sciences* 2012. **1**(3): p. 21-28.
110. Maran, N., Gomes, P. S., Freire-de-Lima, L., Freitas, E. O., Freire-de-Lima, C. G., Morrot, A., *Host resistance to visceral leishmaniasis: prevalence and prevention. Expert Rev Anti Infect Ther*, 2016. **14**(4): p. 435-42.
111. Gantt, K., Schultz-Cherry, S., Rodriguez, N., Jeronimo, S., Nascimento, E., Goldman, T., Recker, T., Miller, M., and Wilson, M., *Activation of TGF- $\beta$  by*

- Leishmania chagasi* : Importance for Parasite Survival in Macrophages. *J Immunol* March 2003. **170**(5): p. 2613-2620.
112. Rolão, N., Cortes, S., Gomes-Pereira, S., Campino, L., *Leishmania infantum*: Mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. *Experimental Parasitology* 2007. **115**: p. 270–276.
  113. Pérez-Cabezas, B., Cecílio, P., Gaspar, T.B., Gärtner, F., Vasconcellos, R., and Cordeiro-da-Silva, A. , *Understanding Resistance vs. Susceptibility in Visceral Leishmaniasis Using Mouse Models of Leishmania infantum Infection*. *Front. Cell. Infect. Microbiol*, 2019. **9**(30).
  114. Das, V., Bimal, S., Siddiqui, N., Kumar, A., Pandey, K., Sinha, S., *Conversion of asymptomatic infection to symptomatic visceral leishmaniasis: A study of possible immunological markers*. *PLoS Negl Trop Dis* 2020. **14**(6): p. e0008272.
  115. Sirisinha, S., Suskind, R., Edelman, R., Asvapaka, C., and Olson, R.E., *Secretory and Serum IgA in Children With Protein-Calorie Malnutrition*. *Pediatrics* 1975. **55**(2): p. 166-170.
  116. McMurray, D.N., Rey, H., Casazza, L.J., Watson, R.R, *Effect of moderate malnutrition on concentrations of immunoglobulins and enzymes in tears and saliva of young Colombian children*. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1977. **30**(12): p. 1944–1948.
  117. Mcgee, D.W., and McMurray, D.N., *The effect of protein malnutrition on the IgA immune response in mice*. *Immunology* 1988. **63**: p. 25-29.
  118. Macpherson, A.J., Yilmaz, B., Limenitakis, J. P., Ganai-Vonarburg, S. C., *IgA Function in Relation to the Intestinal Microbiota*. *Annu Rev Immunol*, 2018. **36**: p. 359-381.
  119. Yel, L., *Selective IgA deficiency*. *J Clin Immunol*, 2010. **30**(1): p. 10-6.
  120. Green, F., and Heyworth, B., *Immunoglobulin-containing cells in jejunal mucosa of children with protein-energy malnutrition and gastroenteritis*. *Archives of Disease in Childhood*, 1980. **55**: p. 380-383.
  121. Reddy, V., Raghuramulu, N., and Bhaskaram, C., *Secretory IgA in protein-calorie malnutrition*. *Archives of Disease in Childhood*, 1976. **51**: p. 871-4.
  122. Amaral, J.F., Foschetti, D.A., Assis, F.A., Menezes, J.S., Vaz N.M., and Faria, A.M.C., *Immunoglobulin production is impaired in protein-deprived mice and can be restored by dietary protein supplementation*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2006. **39**: p. 1581-1586.
  123. Korpe, P.S., Petri, W. A., Jr., *Environmental enteropathy: critical implications of a poorly understood condition*. *Trends Mol Med*, 2012. **18**(6): p. 328-36.

