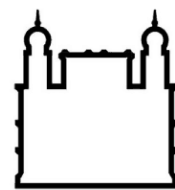




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**CINÉTICA DA DESESTRUTURAÇÃO DO TECIDO LINFOIDE
ESPLÊNICO NA LEISHMANIOSE VISCERAL: UM ESTUDO
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS E HAMSTERS**

CAROLINE VILAS BOAS DE MELO

Salvador - Bahia

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

**FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**CINÉTICA DA DESESTRUTURAÇÃO DO TECIDO LINFOIDE
ESPLÊNICO NA LEISHMANIOSE VISCERAL: UM ESTUDO
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS E HAMSTERS**

CAROLINE VILAS BOAS DE MELO

Orientador: Dr. Washington LC dos-Santos

Co-orientadora: Dra. Micely D'El-Rei Hermida

Tese de doutorado apresentada
ao Curso de Pós-Graduação em
Patologia Humana para
obtenção do grau de Doutor.

Salvador - Bahia

2019

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

M529c Melo, Caroline Vilas Boas de.
Cinética da desestruturação do tecido linfóide esplênico na leishmaniose visceral: um estudo experimental em hamsters e camundongos. / Caroline Vilas Boas de Melo. - 2019.
161 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Washington Luis Conrado dos Santos, Laboratório de Patologia e Intervenção.

Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

1. Leishmaniose visceral. 2. *Leishmania infantum*. 3. Baço.
I. Título.

CDU 616.993.161

Título da Tese: "CINÉTICA DA DESESTRUTURAÇÃO DO TECIDO LINFOIDE ESPLÊNICO NA LEISHMANIOSE VISCERAL: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM HAMSTERS E CAMUNDONGOS"

CAROLINE VILAS BOAS DE MELO

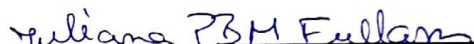
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 22 de agosto de 2019

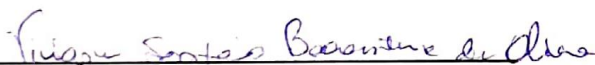
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Sérgio Marcos Arruda
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



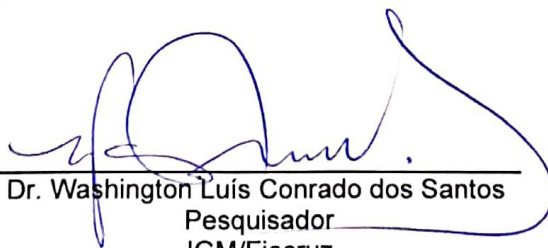
Dra. Juliana Perrone Bezerra de Menezes
Fullam
Pesquisadora
IGM/Fiocruz



Dra. Viviane Sampaio Boaventura de
Oliveira
Pesquisadora
IGM/Fiocruz



Dr. Leonardo Paiva Farias
Pesquisador
IGM/Fiocruz



Dr. Washington Luís Conrado dos Santos
Pesquisador
IGM/Fiocruz

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (**CAPES**) –
Código de Financiamento 001

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – **CNPq**

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – **FAPESB**

Dedico este trabalho aos animais que
fizeram esta pesquisa possível.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Inês Vilas Boas** e **Jailson Melo**, e minha irmã **Natalia Vilas Boas**, pela compreensão e amor incondicional.

Ao meu orientador **Dr. Washington dos-Santos**, pelos ensinamentos ao longo desses sete anos de convivência, e por me preparar tão bem para o mundo científico. Obrigada por tanto.

À **Dra. Micely Hermida**, que foi não somente minha coorientadora, mas se tornou uma de minhas mais queridas amigas. Sua generosidade, inteligência e ética são fonte de inspiração.

À **Jonathan Fontes** e **Bianca Mesquita**, que foram meus coorientandos de Iniciação Científica, desempenhando papel essencial na realização deste trabalho. Mas, ainda mais importante, pela amizade que construímos nesses anos de convivência. Eu não teria conseguido sem vocês.

Aos envolvidos no estudo de transcriptoma, **Dr. Ricardo Khouri**, pela contribuição em todas as etapas, comprometimento e paciência; ao doutorando **Felipe Torres** pelas manhãs na bat-sala e análises em telas pretas; à **Dr. Pablo Ivan** pela consultoria e **Cibele Orge** pelas contribuições nas etapas experimentais.

À **Dra. Reina Mebius**, por me receber em seu laboratório e pela oportunidade de aprender tanto com seu brilhantismo. Gratidão pela orientação recebida e pela contribuição neste trabalho.

À **Dra. Isadora Lima** e **Dr. Valter Almeida**, como veterinários, apoiando nas avaliações clínicas dos animais, e como grandes amigos, pelos muitos momentos de distração e confidências.

Aos amigos do **Grupo WLCS**, em especial à **Reginaldo Brito**, **Juliana Gomes**, **Selma Matos** e **Bruno Bouzas**, pelo apoio e por nunca deixarem faltar café.

Aos colegas do **LAPEM**, em especial à **Dr. Luiz Freitas**, pela sua contribuição na análise histopatológica e agradáveis diálogos nas manhãs de quinta-feira; à **Dra. Fabíola Cardillo** por compartilhar o seu conhecimento; à **Livia** pelo apoio de sempre e aos colegas **Amanda**, **Maiara** e **Davi** pelos momentos de descontração no laboratório.

À **Associação de Pós-graduandos (APG) Fiocruz Bahia**, em especial **Filipe Rocha**, pela oportunidade de ser parte de uma iniciativa tão importante no Instituto Gonçalo Moniz.

À **Vrije Universiteit Amsterdam** pela estrutura e pessoal, em especial à **Tanja Konijn** e **Jasper Koning**, por todas as vezes que pude contar com sua ajuda. Aos técnicos **Nanne Paauw** e **Marko Popovic** pela assistência na microscopia confocal. A todos os colegas do **MCBI**, pelos momentos de descontração nos borrels e festas do departamento.

À **Jessica Mariane**, pelos compartilhamentos de: laboratório, mestrado, doutorado, apartamento, menção honrosa, cerveja e fases de vida. Muito obrigada pela amizade de todos esses anos.

À **Victor Felzemburgh** pela realização da esplenectomia e a **Humberto Campos** pela contribuição neste processo. Agradeço a **Laís Caymmi** pela participação nos experimentos e análises.

Aos amigos queridos **Marcelo Jesus**, **Verônica Reis** e **Kelly Liz** pela amizade sincera.

À **Dennis van der Plas**, pelo apoio incondicional, dank je wel.

À **Patrícia Luz** e **Bruno Valença**, pela grande ajuda na gestão de projetos e demais atividades administrativas.

À **CAPES**, pela concessão das bolsas de doutorado no país e doutorado sanduíche no exterior. À **CNPq** e **FAPESB** pelo financiamento neste trabalho.

À **Coordenação de Ensino PGPAT**, em especial Valéria, Carol e Ana, pelo apoio fundamental neste período.

À **Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna**, pelo suporte, em especial à Ana Maria Fiscina.

Ao **Instituto Gonçalo Moniz**, pela estrutura e apoio dos servidores. Ao biotério, em especial **Adriana Mendes**, **Valdomiro Moitinho** e **Luís**, pela ajuda na captação e manutenção dos animais.

MELO, Caroline Vilas Boas de. Cinética da desestruturação do tecido linfóide esplênico na leishmaniose visceral: um estudo experimental em hamsters e camundongos. 2019. 161 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Um dos principais problemas relacionados à leishmaniose visceral (LV) no Brasil é o surgimento de formas clínicas graves responsáveis por 5-20% dos óbitos associados à doença, mesmo na vigência do tratamento específico. Formas graves da LV humana e canina cursam com desorganização da polpa branca (PB) do baço. Ocorre redução de linfócitos B e T, células dendríticas foliculares e aumento de plasmócitos, associados a mudanças no padrão de expressão de citocinas e quimiocinas. É possível que a infecção por *Leishmania* provoque desorganização da PB por interferência nas comunicações celulares e contribua para a susceptibilidade à doença. O uso de modelo experimental pode contribuir para a compreensão desses mecanismos. **OBJETIVO:** Avaliar sequencialmente as alterações do baço no curso da infecção por *L. infantum*. **METODOLOGIA:** 56 hamsters Golden Syrian e 50 camundongos da linhagem BALB/c foram infectados com promastigotas de *L. infantum* por via intraperitoneal. Os animais foram acompanhados por 30, 60, 90 (apenas camundongos), 120 e 150 dias para avaliação de parâmetros clínicos e histológicos. Foi realizado sequenciamento do transcriptoma de 24 amostras de hamsters e imunofenotipagem das células do baço de camundongos por citometria de fluxo e histocitometria. Adicionalmente, avaliamos as alterações clínicas e histológicas da infecção por *L. infantum* em hamsters e camundongos esplenectomizados. **RESULTADOS:** Hamsters desenvolveram LV progressiva com desorganização da PB do baço, associado a maior frequência de sinais clínicos. Houve regulação gênica relacionada à quimiotaxia de linfócitos T e regulação de ciclo celular e ciclinas. Camundongos desenvolveram doença subclínica associada à arquitetura normal da PB, mas com remodelamento tecidual por alterações de células dendríticas plasmocitoides, linfócitos B e plasmócitos. Células estromais e células linfóides inatas se distribuíram dispersamente no baço de camundongos infectados por 60 dias. Houve maior produção de IFN e IL-6 a 90 dias de infecção. Hamsters infectados esplenectomizados apresentaram maior frequência de granuloma em linfonodo, enquanto ocorreu elevada letalidade em camundongos. **CONCLUSÕES:** A infecção por *L. infantum* induziu alterações sequenciais no baço. A desorganização da PB ocorreu por alterações de expressão gênica de citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição em hamsters, e de populações celulares no remodelamento tecidual em camundongos. A ausência do baço levou a perfil histopatológico mais grave em hamsters e alta letalidade em camundongos. Esses dados demonstram um papel centralizado do baço na patogênese da leishmaniose visceral.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, *Leishmania infantum*, baço.

MELO, Caroline Vilas Boas de. Kinetics of splenic lymphoid tissue disruption in visceral leishmaniasis in experimental model. 2019. 161 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

ABSTRACT

INTRODUCTION: One of the main problems related to visceral leishmaniasis (VL) in Brazil is the emergence of severe clinical forms responsible for 5-20% of deaths associated with the disease, even under specific treatment. Severe forms of human and canine VL progress with disruption of spleen white pulp (WP). There is a reduction of B and T lymphocytes, follicular dendritic cells and increased plasma cells, associated with changes in the expression pattern of cytokines and chemokines. *Leishmania* infection may cause WP disorganization by interfering with cellular communications and contribute to disease susceptibility. The use of experimental model can contribute to the understanding of these mechanisms. **OBJECTIVE:** Evaluate sequential spleen changes in the course of *L. infantum* infection. **METHODOLOGY:** 56 Golden Syrian hamsters and 50 BALB/c mice were infected by intraperitoneal route with *L. infantum* promastigotes. The animals were followed up to 30, 60, 90 (mice only), 120 and 150 days for evaluation of clinical and histological parameters. Spleen samples of 24 hamsters were used to assess the transcriptomic profile using RNA-seq. Mice spleen cell immunophenotyping was performed using flow cytometry and histocytometry. Additionally, we evaluated the clinical and histological changes of *L. infantum* infection in splenectomized hamsters and mice. **RESULTS:** Hamsters developed progressive VL with disruption of spleen WP, associated with a higher frequency of clinical signs. There was gene regulation related to T lymphocyte chemotaxis and cell cycle and cyclin regulation. Mice developed subclinical disease associated with the normal architecture of WP, but with tissue remodeling due to alterations in plasmacytoid dendritic cells, B lymphocytes and plasma cells. Stromal cells and innate lymphoid cells were dispersed in the spleen of infected mice for 60 days. There was higher production of IFN and IL-6 at 90 days of infection. Splenectomized infected hamsters had a higher frequency of lymph node granuloma, while high lethality occurred in mice. **CONCLUSIONS:** *L. infantum* infection induced sequential changes in the spleen. Disorganization of WP occurred due to alterations in cytokine gene expression, chemokines and transcription factors in hamsters and cell populations in the tissue remodeling in mice. The absence of the spleen led to a more severe histopathological profile in hamsters and high lethality in mice. These data demonstrate a centralized role of the spleen in the pathogenesis of visceral leishmaniasis.

Keywords: Visceral leishmaniasis, *Leishmania infantum*, spleen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Perfil de respostas imunes T-auxiliar na leishmaniose visceral...	22
Figura 2	Desenho esquemático do baço de camundongo.....	24
Figura 3	Desenho esquemático das polpas branca e vermelha do baço de camundongo.....	27
Figura 4	Desenho esquemático das alterações do baço na leishmaniose visceral.....	32
Figura 5	Classificação da desorganização do baço.....	33
Figura 6	Abordagem experimental do estudo sequencial da leishmaniose visceral em hamsters.....	41
Figura 7	Processamento do baço para estudo sequencial da leishmaniose visceral em hamsters.....	42
Figura 8	Frequência e intensidade de sinais clínicos de leishmaniose visceral em hamsters	45
Figura 9	Variação de peso dos hamsters.....	46
Figura 10	Avaliação de esplenomegalia em hamsters	46
Figura 11	Fotomicrografias de baço dos hamsters	48
Figura 12	Avaliação morfométrica da área de polpa branca do baço de hamsters.....	49
Figura 13	Avaliação de periesplenite em hamsters.....	50
Figura 14	Avaliação de granuloma em baço de hamsters.....	51
Figura 15	Fotomicrografia de fígado de hamsters.....	53
Figura 16	Avaliação de granulomas em fígados de hamsters	54
Figura 17	Fotomicrografia de linfonodo de hamster	55
Figura 18	Fotomicrografia de pulmão de hamster	56
Figura 19	Fotomicrografia de intestino de hamster.....	56
Figura 20	Eletroferograma de uma amostra de RNA extraída de baço de hamster.....	57
Figura 21	Gráfico representando score de qualidade de reads da biblioteca.....	58
Figura 22	Transcritos diferencialmente expressos na cinética de infecção em hamster.....	59

Figura 23	Mapa de interação de moléculas associadas a efetores regulatórios a 60 dias de infecção	60
Figura 24	Mapa de interação de moléculas associadas a efetores regulatórios a 120 dias de infecção.....	61
Figura 25	Mapa de interação de moléculas associadas a efetores regulatórios a 150 dias de infecção.....	62
Figura 26	Heatmaps de moléculas associadas a doenças ou funções diferencialmente expressas ao longo da cinética.....	63
Figura 27	Heatmaps de moléculas associadas a redes regulatórias diferencialmente expressas ao longo da cinética	64
Figura 28	Rede de interação de moléculas a 30 dias de infecção	65
Figura 29	Rede de interação de moléculas a 60 dias de infecção	66
Figura 30	Rede de interação de moléculas a 120 dias de infecção	67
Figura 31	Rede de interação de moléculas a 150 dias de infecção	68
Figura 32	Heatmaps de moléculas associadas a vias canônicas diferencialmente expressas ao longo da cinética	69
Figura 33	Rede de interação de moléculas associadas à desorganização da polpa branca do baço a 30 dias de infecção	70
Figura 34	Rede de interação de moléculas associadas à desorganização da polpa branca do baço a 60 dias de infecção.....	71
Figura 35	Rede de interação de moléculas associadas à desorganização da polpa branca do baço a 120 dias de infecção.....	72
Figura 36	Rede de interação de moléculas associadas à desorganização da polpa branca do baço a 150 dias de infecção.....	73
Figura 37	Abordagem experimental do estudo sequencial de leishmaniose visceral em camundongos.....	84
Figura 38	Processamento do baço para estudo sequencial da leishmaniose visceral em camundongos.....	85
Figura 39	Estratégia de análise de histo-citometria.....	92
Figura 40	Avaliação de esplenomegalia em camundongos	93
Figura 41	Avaliação de parâmetros histopatológicos no fígado de camundongos.....	95
Figura 42	Fotomicrografias de baço dos camundongos.....	96
Figura 43	Avaliação morfométrica da área de polpa branca do baço	97

Figura 44	Avaliação de granuloma no baço de camundongos	98
Figura 45	Avaliação do número de linfócitos T no baço de camundongos...	100
Figura 46	Avaliação do número de linfócitos B no baço de camundongos...	101
Figura 47	Avaliação do número de linfócitos T CD3-CD4 ⁺ no baço de camundongos.....	102
Figura 48	Avaliação do número de macrófagos no baço de camundongos	103
Figura 49	Avaliação do número de plasmócitos no baço de camundongos	104
Figura 50	Avaliação do número de células dendríticas foliculares no baço de camundongos.....	105
Figura 51	Avaliação do número de células dendríticas plasmocitoides no baço de camundongos.....	106
Figura 52	Avaliação de citocinas produzidas por esplenócitos em camundongos.....	107
Figura 53	Fotomicrografias de células estromais em baço de camundongos.....	108
Figura 54	Avaliação de células B e células dendríticas foliculares em baço de camundongos.....	109
Figura 55	Avaliação de células marginais reticulares MAdCAM ou ER-TR9 em baço de camundongos.....	110
Figura 56	Avaliação de célula fibroblástica reticular em baço de camundongos.....	111
Figura 57	Fotomicrografias de células linfoides inatas em baço de camundongos.....	112
Figura 58	Abordagem experimental do estudo sequencial de leishmaniose visceral em modelo de esplenectomia de hamsters e camundongos.....	121
Figura 59	Frequência e intensidade de sinais clínicos de leishmaniose visceral em hamsters e camundongos.....	122
Figura 60	Curva de sobrevivência de camundongos.....	123
Figura 61	Fotomicrografia de linfonodo de hamster esplenectomizado.....	125
Figura 62	Fotomicrografias de fígado de hamsters esplenectomizados.....	126
Figura 63	Fotomicrografia de linfonodo de camundongo esplenectomizado	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação da organização arquitetural do baço de hamsters dos grupos controle e infectado nos pontos de avaliação de 30, 60, 120 e 150 dias após a infecção.....	46
Tabela 2	Parâmetros de análise histológica do baço em hamsters a 30, 60, 120 e 150 dias após a injeção.....	48
Tabela 3	Parâmetros de análise histológica do fígado em hamsters a 30, 60, 120 e 150 dias após a injeção.....	51
Tabela 4	Parâmetros de análise histológica do linfonodo em hamsters a 30, 60, 120 e 150 dias após a injeção.....	54
Tabela 5	Lista de anticorpos conjugados e marcadores fenotípicos.....	86
Tabela 6	Características gerais dos camundongos.....	92
Tabela 7	Parâmetros de análise histológica do linfonodo em camundongos a 30, 60 e 90 dias após a injeção.....	93
Tabela 8	Classificação da organização arquitetural do baço de camundongos.....	95
Tabela 9	Parâmetros de análise histológica do baço em camundongos a 30, 60 a 90 dias após a injeção.....	96
Tabela 10	Números absolutos de subpopulações de linfócitos T nos grupos controle ou infectado, em 30, 60 e 90 dias após a injeção.....	98
Tabela 11	Números absolutos de subpopulações de linfócitos B nos grupos controle ou infectado, em 30, 60 e 90 dias após a injeção.....	99
Tabela 12	Números absolutos de subpopulações de linfócitos T CD3-CD4+ nos grupos controle ou infectado, em 30, 60 e 90 dias após a injeção.....	100
Tabela 13	Números absolutos de subpopulações de macrófagos nos grupos controle ou infectado, em 30, 60 e 90 dias após a injeção.....	101
Tabela 14	Números absolutos de subpopulações de plasmócitos nos grupos controle ou infectado, em 30, 60 e 90 dias após a injeção.....	102
Tabela 15	Números absolutos de subpopulações de células dendríticas foliculares nos grupos controle ou infectado, em 30, 60 e 90 dias após a injeção.....	103
Tabela 16	Números absolutos de subpopulações de células dendríticas plasmocitoides nos grupos controle ou infectado, em 30, 60 e 90 dias após a injeção.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
AL	Alexa fluor
APC	Allophycocyanin
APRIL	A proliferation-inducing ligand
Arg	Arginase
B.O.D.	Biochemical oxygen demand
BAFF	B-cell activating factor
BB	BD Horizon Brilliant™ Blue
Bcl	B-cell lymphoma protein
BCR	B-cell receptor
BSA	Bovin serum albumin
BV	BD Horizon Brilliant™ Violet
CBA	<i>Cytometry Bead Array</i> (kit de detecção de citocinas)
CCL	C-C Motif Chemokine Ligand
CD	Cluster differentiation
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
CG	Centro germinativo
CHGM	Hemoglobina corpuscular média
ConA	Concanavalina A
CXCL	C-X-C Motif Chemokine Ligand
CXCR	C-X-C Motif Chemokine Receptor
DALY	disability adjusted life years
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DLK1	Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPI	Dias após a infecção
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	Fetal bovine serum
FC	Fold change
FDR	False Discovery ratio
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FL	folículo linfoide
FSC	Forward side scatter
GEO	Gene Expression Omnibus
H&E	Hematoxilina e eosina
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HGM	Hemoglobina corpuscular média
Ido1	Indoleamine 2,3-deoxygenase
IFN	Interferon
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
IL	Interleucina
ILC	Innate lymphoid cell (Célula linfoide inata)
iNOS	Óxido nítrico sintase

IPA	Ingenuity Pathway Analysis
Irgm1	Immunity-related GTPase family M 1
Ki-67	Marcador de proliferação
LEP	Leptin
LES	Lupus eritematoso sistêmico
LPG	Lipofosfoglicano
LT	Linfotoxina
LTi	Lymphoid tissue inducer (indutora de tecido linfoide)
LV	Leishmaniose visceral
MAC	Meio de complexo de ataque à membrana
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nramp	Natural resistance-associated macrophage proteins
PALS	Periarteriolar lymphoid sheat
PB	Polpa branca
pb	pares de base
PBS	Phosphate-buffered saline (Tampão fosfato salina)
PE	Phycoerythrin
PV	Polpa vermelha
RIN	RNA integrity number (número de integridade de RNA)
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
Seq	sequência
SFB	Soro fetal bovino
SLA	Soluble Leishmania Antigen
Slc11a1	Solute Carrier Family 11 Member 1
SPP1	Secreted Phosphoprotein 1
SSC	Side Scatter
TA	Temperatura ambiente
TGF	Transforming growth factor
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico-pirúvica
Th	T helper
TNF	Tumor necrosis factor
unl	Unlabeled
VGM	Volume globular médio
ZM	Zona marginal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL	19
2.2 IMUNOPATOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	21
2.3 O BAÇO	23
2.3.1 Estrutura, histologia e função	23
2.3.2 O baço em doenças crônicas não infecciosas	28
2.3.3 O baço nas doenças infecciosas	29
2.3.4 O baço na leishmaniose visceral	30
2.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE LEISHMANIOSE VISCERAL.....	33
3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	35
4. OBJETIVOS	36
4.1 OBJETIVO GERAL	36
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5. METODOLOGIA GERAL	37
5.1 ANIMAIS	37
5.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	37
5.3 CULTURA DE <i>Leishmania infantum</i>	38
5.4 EXAME CLÍNICO.....	38
5.5 EUTANÁSIA E NECROPSIA	38
5.6 COLETA DE FRAGMENTO PARA ISOLAMENTO DE <i>L. infantum</i>	38
5.7 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS TECIDOS	38
5.8 PARÂMETROS DE ANÁLISE HISTOLÓGICA	39
6. CAPÍTULO I - Avaliação sequencial das alterações no curso da LV – hamster (objetivo específico #1)	40
6.1 METODOLOGIA	41
6.1.1 Animais	41
6.1.2 Injeção.....	41
6.1.3 Abordagem experimental.....	41
6.1.4 Avaliação histológica.....	42
6.1.5 Processamento do baço	42
6.1.6 Extração e seleção de RNA	42
6.1.7 Avaliação do perfil transcriptômico do baço	43
6.1.7.1 <i>Análise inicial dos dados</i>	43
6.1.7.2 <i>Alinhamento dos genes</i>	43

6.1.7.3 Anotação genômica e análise diferencial	43
6.1.8 Enriquecimento de vias de interações moleculares.....	43
6.2 RESULTADOS.....	45
6.2.1 Avaliação clínica e evidência de infecção	45
6.2.2 Análise histológica.....	47
6.2.3 Análise transcriptômica	57
6.2.3.1 Seleção de RNA	57
6.2.3.2 Qualidade das sequências.....	58
6.2.3.3 Caracterização geral dos transcritos.....	58
6.2.3.4 Enriquecimento funcional dos transcritos	59
6.3 DISCUSSÃO	74
7. CAPÍTULO II - Avaliação sequencial das alterações de fenótipo celular do baço no curso da LV – camundongo (objetivo específico #2)	83
7.1 METODOLOGIA	84
7.1.1 Animais	84
7.1.2 Injeção.....	84
7.1.3 Abordagem experimental.....	84
7.1.4 Avaliação histológica.....	85
7.1.5 Processamento do baço	85
7.1.6 Teste sorológico para <i>Leishmania</i>.....	85
7.1.7 Preparação das células para citometria de fluxo.....	86
7.1.8 Imunofenotipagem de células do baço por citometria de fluxo	86
7.1.9 Estimulação de esplenócitos para avaliação de citocinas no baço	87
7.1.10 Avaliação de citocinas por citometria de fluxo.....	88
7.1.11 Imunofenotipagem de células estromais no tecido esplênico por ensaio de imunofluorescência.....	88
7.1.12 Imunofenotipagem de células linfoides inatas no tecido esplênico por histo-citometria	89
7.1.13 Aquisição de imagens por microscopia confocal.....	90
7.1.14 Análise de imagens de microscopia de fluorescência e histo-citometria	90
7.1.15 Expressão dos resultados da análise fenotípica	92
7.2 RESULTADOS	93
7.2.1 Sinais clínicos e evidências de infecção.....	93
7.2.2 Análise histológica.....	93
7.2.3 Análise fenotípica de esplenócitos por citometria de fluxo	98
7.2.4 Análise de citocinas no baço por citometria de fluxo.....	106
7.2.5 Análise de células estromais do baço por microscopia confocal.....	107

7.2.6 Análise de células linfoides inatas no baço por histo-citometria.....	111
8. CAPÍTULO III - Avaliação sequencial das alterações em órgãos-alvo no curso da LV em modelo de esplenectomia – hamster e camundongo (objetivo específico #3).....	118
8.1 METODOLOGIA	119
8.1.1 Animais	119
8.1.2 Esplenectomia	119
8.1.3 Injeção.....	120
8.1.4 Abordagem experimental.....	120
8.1.5 Exame bioquímico e hematológico	121
8.1.6 Eutanásia e necropsia	121
8.1.7 Parâmetros de análise histológica	121
8.2 RESULTADOS.....	122
8.2.1 Avaliação clínica.....	122
8.2.2 Avaliação hematológica e bioquímica - Hamster	123
8.2.3 Análise histológica - Hamster	124
8.2.4 Análise histológica - Camundongos	126
9. DISCUSSÃO GERAL.....	130
10. CONCLUSÕES	131
REFERÊNCIAS	132
APÊNDICE A	144
APÊNDICE B	145

1. INTRODUÇÃO

Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença parasitária sistêmica grave, causada por protozoários das espécies *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani* (BADARÓ et al., 1986). É caracterizada por perda de peso, anemia, trombocitopenia, leucopenia e aumento do peso e dimensão do baço e fígado. Quando não tratada, a doença é fatal em 90% dos casos graves; contudo, mesmo sob tratamento, a letalidade alcança 6,8% no Brasil (BRASIL, 2014). Os principais fatores associados à esta letalidade são sangramento e susceptibilidade à coinfeções (COSTA et al., 2010).

Envolvido em todos os casos e todas as fases da LV, o baço apresenta alterações histológicas, que em condições normais, é organizada primariamente em polpa vermelha e polpa branca (PB) (HERMIDA et al., 2018). Sob infecção por *L. infantum*, a PB do baço sofre alterações na sua organização, que é mantida por uma complexa rede de sinalização por citocinas, quimiocinas e outras moléculas (HERMIDA et al., 2018). Animais naturalmente e experimentalmente infectados apresentaram PB desorganizada, associada com a fase crônica e maior gravidade da doença (HERMIDA et al., 2018). No entanto, essas observações foram circunstanciais e realizadas em estudo de corte transversal. Não se sabe as alterações estruturais do baço ocorrem por infecção por *L. infantum* ou por coinfeções, não sendo possível estabelecer relação causal.

Nossa hipótese é que a desorganização de microambientes linfoides é consequência direta da infecção por *L. infantum*, que resulta de um estado inflamatório de longa duração com morte de populações celulares, produção anormal de citocinas e migração inadequada de células leucocitárias e estromais. Neste trabalho propomos um estudo sequencial das populações celulares e moléculas potencialmente envolvidas no processo de desestruturação do baço na infecção experimental com *L. infantum*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL

A LV é uma doença parasitária sistêmica causada por protozoários tripanossomatídeos das espécies *Leishmania infantum* (sin. *L. chagasi*) e *L. donovani* (HERWALDT, 1999). Em um ciclo de infecção heteroxênico, estão envolvidos hospedeiros invertebrados infectados com a forma flagelada da *Leishmania*, denominada promastigota. O vetor invertebrado é um flebotomíneo pertencente ao gênero *Lutzomyia* (DESJEUX, 2001). Ao realizar o repasto sanguíneo, a fêmea do vetor flebotomíneo regurgita as formas infectantes da *Leishmania*, que ficam alojadas no esôfago. Nesse momento, o hospedeiro vertebrado adquire a *Leishmania* no sítio da picada, que é internalizada por células dendríticas e macrófagos residentes e se torna um parasito intracelular obrigatório na forma aflagelada, denominada amastigota (DESJEUX, 1996).

Os hospedeiros vertebrados são mamíferos silvestres como raposas e marsupiais. Nos centros urbanos a LV é mantida por um ciclo de infecção que envolve cães infectados como o principal reservatório da doença que leva à transmissão a seres humanos por meio do vetor flebotomíneo. Esse padrão de transmissão envolvendo cães e seres humanos nomeia a doença como leishmaniose visceral antroponótica (DESJEUX, 1996; QUINNELL et al., 1997). Embora a transmissão possa ocorrer entre seres humanos mediada pelo vetor, como ocorre na Índia, apenas a forma antroponótica da LV é relatada no continente americano (ALVAR et al., 2012).

O curso da infecção por *Leishmania* depende do estado nutricional, da virulência do parasito e imunidade celular do hospedeiro ao parasito (BADARO et al., 1986; PINELLI et al., 1994). Crianças, idosos e pacientes imunossuprimidos são considerados grupos de risco. A infecção pode variar entre assintomática ou sintomática, progressiva para morte (NYLÉN; KUMAR, 2012). O controle da infecção está relacionado à ausência de sinais clínicos de doença e menor probabilidade de transmissão do parasito ao vetor (SINGH et al., 2014). Entretanto, com o estabelecimento da infecção, a doença progride com apresentação clínica marcada por febre, perda de peso,

aumento do fígado e baço, distúrbios hemodinâmicos como pancitopenia evidenciada por anemia, trombocitopenia e leucopenia incluindo neutropenia e alguma linfocitose e monocitose, com ativação policlonal de células B que resulta em hipergamaglobulinemia (BADARO et al., 1986; COSTA et al., 2010).

A abordagem terapêutica atual com administração de glucantime, pentamidina ou anfotericina é efetiva na maioria dos casos (CHAPPUIS et al., 2007; HERWALDT, 1999). No entanto, a LV pode ser letal em seres humanos e em cães, mesmo na vigência do tratamento. No Brasil, cerca de 37.209 indivíduos foram acometidos por LV entre os anos de 2001 e 2011 com uma letalidade de 6,8% (2.549 óbitos) (Ministério da Saúde do Brasil, 2014). Em países europeus, nos quais o tratamento da LV canina é permitido, a cura é parcial com recorrência da enfermidade e deterioração progressiva do estado geral dos animais (ALVAR et al., 2012). Os principais fatores associados a essa letalidade são sangramentos e coinfeções (COSTA et al., 2010).

A alta prevalência de cães semidomiciliados, associação entre baixo nível socioeconômico e localização de residências em periferias de cidades com alta densidade de vegetação que podem favorecer o estabelecimento de vetores são fatores determinantes para aumento do risco para a doença em humanos (WERNECK, 2014). Essas características enquadram a LV como uma das doenças consideradas negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde. Constitui um importante problema de saúde pública, com um custo estimado em termos de DALY (disability adjusted life years) na ordem de 2,1 milhões de dólares. Esse custo é 3 vezes maior que o estimado para dengue (0.62 milhões) (TOWNSON et al., 2005).

As estratégias de controle da transmissão da LV no Brasil baseiam-se no controle do vetor e principalmente na eliminação do reservatório canino (Ministério da Saúde do Brasil, 2014). Os dois métodos, no entanto, são controversos, por dificuldades logísticas e operacionais. O primeiro, caracteriza demasiada mão de obra, bem como recusa de moradores quanto à aplicação do inseticida. A profilaxia baseada em borrifação com piretroides é ineficaz se não for realizada em um número suficiente de residências e em períodos de tempo de acordo com a sazonalidade e aumento da densidade

vetorial (ROMERO; BOELAERT, 2010). Atualmente, o Ministério da Saúde do Brasil preconiza a eutanásia de cães positivos para anticorpos anti-*Leishmania* por inquérito sorológico imunocromatográfico. Estes, no entanto, são rapidamente substituídos em áreas endêmicas, por cães jovens e possivelmente mais susceptíveis à infecção (NUNES et al., 2008).

2.2 IMUNOPATOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL

O estabelecimento da infecção ocorre em meio a um processo inflamatório desencadeado não somente pelo dano tecidual causado pela picada, como também pela ação de proteínas da saliva do flebótomo que favorecem a vasodilatação e inibição de coagulação sanguínea (KAMHAWI, 2000; PETERS; SACKS, 2009; TEIXEIRA et al., 2010). Forma-se então um lago sanguíneo, que favorece a regurgitação das formas promastigotas metacíclicas e sua fagocitose por células dendríticas e macrófagos da derme (ARNOLDI; MOLL, 1998; DE ALMEIDA et al., 2003). A infecção inicialmente ocorre por células residentes da imunidade inata, porém rapidamente os antígenos da *Leishmania* são processados, e quimiocinas são sintetizadas para recrutamento de novas células (DE ALMEIDA et al., 2003; PETERS et al., 2008). No entanto, a *Leishmania* evade o sistema imune do hospedeiro por diversos mecanismos, permitindo sua multiplicação (SACKS; SHER, 2002).

O controle da infecção por *Leishmania* depende inicialmente da capacidade microbicida de macrófagos (GANTT et al., 2001). Na infecção experimental e natural, animais e pacientes que desenvolveram doença subclínica ou até assintomática apresentaram maiores níveis de secreção de citocinas pro-inflamatórias como TNF- α , IL-12 e IFN- γ (KONG et al., 2017; MAIA; CAMPINO, 2012; MEDINA-COLORADO et al., 2017). IL-12 interage com células NK e linfócitos e atua na polarização para uma resposta imune celular protetora do tipo Th1 (*T-helper type*, T-auxiliar) (GHALIB et al., 1995). Nesse contexto, IFN- γ é dependente da produção de IL-12, que é produzida principalmente por células dendríticas e atua na geração de óxido nítrico e

espécies reativas de oxigênio, que caracterizam a função efetora de macrófagos no controle da replicação do parasito (GANTT et al., 2001).

De forma contrária, pacientes que apresentam sintomatologia clínica para LV apresentam redução de IL-12 (NYLÉN; KUMAR, 2012). Ocorre ainda um perfil misto de resposta pró e anti-inflamatória, de respostas do tipo Th1 e Th2 (Figura 1), em que a susceptibilidade está associada a uma resposta imune humoral exacerbada (SILVA-BARRIOS et al., 2016).

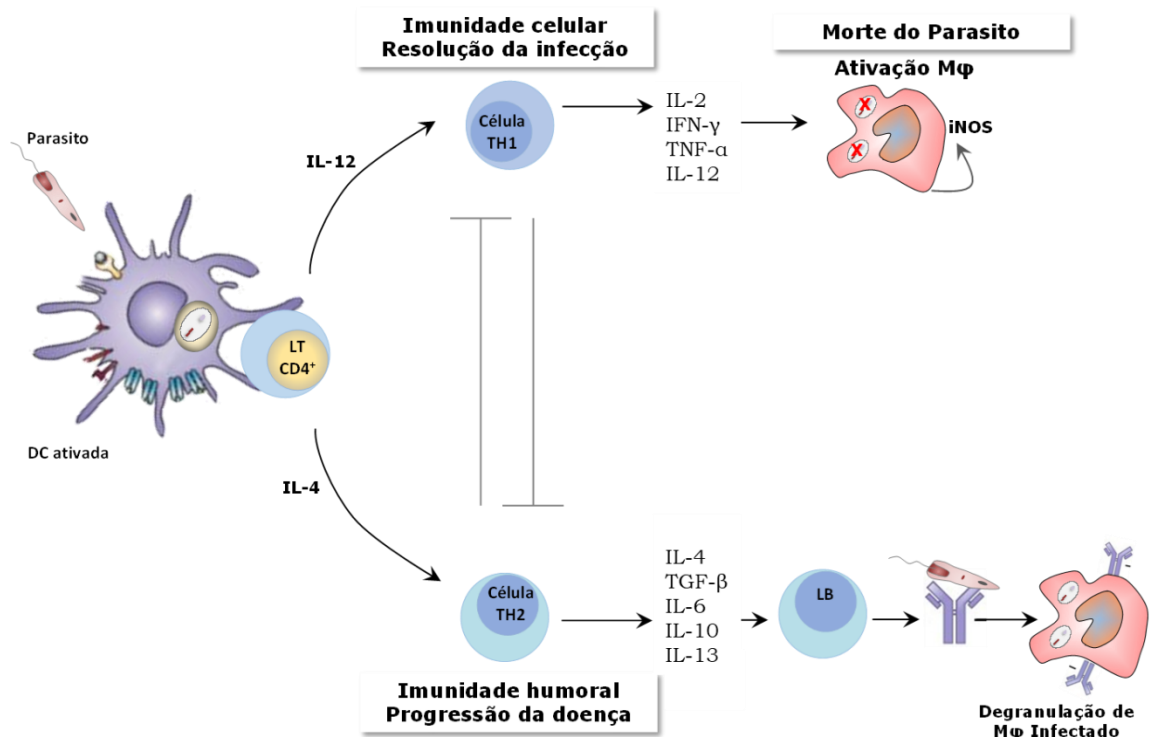


Figura 1: Perfil de respostas imunes T-auxiliar na leishmaniose visceral. Desenho esquemático mostrando a dicotomia da resposta de linfócitos T. Imunidade celular (Th1) pró-inflamatória está associada ao perfil de resistência e resolução da infecção. Imunidade humoral (Th2) anti-inflamatória está associada a susceptibilidade por exacerbação da resposta de linfócitos B.

Produção de citocinas como TGF- β , IL-10 e IL-4 e diminuição de TNF pela exposição ao parasito contribui para a supressão da função efetora de macrófagos via óxido nítrico (ESPÍLIA et al., 2014; MEDINA-COLORADO et al., 2017). Outro fator de resistência do parasito se dá pela expressão de lipofosfoglicano (LPG) na membrana da *Leishmania* que atua como uma barreira à ação do sistema complemento na tentativa de lisar a célula por meio de complexo de ataque à membrana (MAC) (MC CONVILLE; NADERER, 2011; SACKS; SHER, 2002). Dessa forma, a replicação ocorre

progressivamente e macrófagos contendo múltiplas amastigotas de *Leishmania* sofrem lise, e liberam os parasitos que infectam células adjacentes (SACKS; SHER, 2002). A disseminação de células infectadas ocorre por circulação sanguínea e vasos linfáticos até se estabelecerem em órgãos internos como medula óssea, intestino, linfonodos, fígado e baço (CHAPPUIS et al., 2007).

Baço e fígado são os principais órgãos parasitados e participam na patogênese da LV (BADARO et al., 1986). O fígado consiste em um local de infecção crônica, porém transiente, quando ocorre controle da infecção associada a alterações morfológicas no órgão. Ocorre hipertrofia e hiperplasia de células de Kupffer (GIUNCHETTI et al., 2008; HAG et al., 1994; SANCHEZ et al., 2004). A maior atividade de fagocitose por essas células e a formação de granulomas associados a menor carga parasitária, sugerem controle da infecção em modelos experimentais (ENGWERDA; ATO; KAYE, 2004; STANLEY; ENGWERDA, 2007). Entretanto, algum controle ocorre no fígado, mas a infecção no baço progride e adquire caráter crônico (KAYE et al., 2004; CARRIÓN et al., 2006; WILSON; STREIT, 1996). A proliferação do parasito no baço é lenta, porém persistente por um longo período de tempo (CARRIÓN et al., 2006; WILSON; STREIT, 1996). Por suas funções e particularidades, o baço está envolvido em todos os casos e fases de progressão da LV, e tem papel central na proteção ou susceptibilidade à infecção por *L. infantum* (DOS-SANTOS et al., 2004; 2014).

2.3 O BAÇO

2.3.1 Estrutura, histologia e função

O baço é um órgão grande e alongado, situado à esquerda da cavidade abdominal abaixo do diafragma e adjacente ao estômago (CESTA, 2006). Seu peso é altamente variável, correspondendo a uma média de 142g em humanos adultos sem relação direta com o peso do corpo, embora possa ser reduzido em tamanho associado a idades avançadas sem que haja prejuízo de função (MOLINA; DIMAIO, 2012). É envolto por uma cápsula fibrosa

densa, de fibra elástica e tecido muscular liso que se prolonga ao interior do órgão formando as trabéculas (BLOOM et al., 1962). As trabéculas são faixas de tecido fibroso conectivos, que recebem a artéria esplênica através do hilo e dão suporte à vasculatura que se forma através das ramificações em arteríolas e veias (MEBIUS; KRAAL, 2005). À medida que se ramificam e diminuem de diâmetro, os ramos arteriais deixam as trabéculas para formarem o sistema sinusoidal venoso que perpassam o parênquima do baço (BLOOM et al., 1962).

O parênquima do baço é composto por duas porções morfológicas distintas, denominadas de polpa vermelha (PV) e polpa branca (PB) com base no aspecto microscópico da região, devido à composição majoritária de eritrócitos e leucócitos, respectivamente (figuras 2 e 3). Essa compartimentalização reflete em nichos altamente específicos no desempenho de suas funções fisiológicas (STEINIGER; BARTH, 2000).

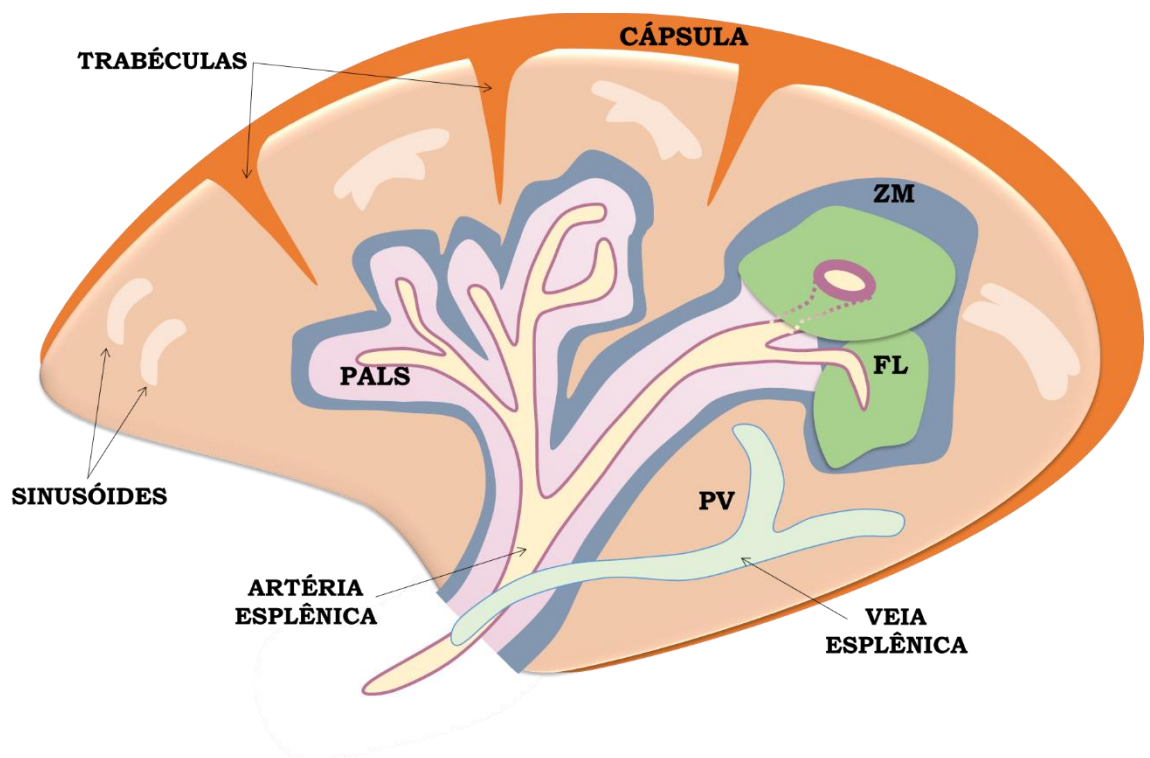


Figura 2: Desenho esquemático do baço de camundongo. Ilustração dos microambientes do baço em anatomia murina. PV= polpa vermelha; ZM= zona marginal. Polpa branca formada por PALS= bainha linfóide periarteriolar; FL= fóliculo linfóide.

A PV constitui em aproximadamente 75% do baço (BLOOM et al., 1962). É estruturada principalmente em sinusóides e cordões medulares que

se conectam por uma rede constituída por fibroblastos e fibras reticulares compostas de colágeno tipo III, fibras elásticas e microfibrilas (BLOOM et al., 1962). Os sinusóides são compostos por uma rede de células endoteliais em uma membrana basal (MEBIUS; KRAAL, 2005). Colágeno tipo IV e laminina compõem essa membrana que conectam entre si e entre os cordões medulares, formados pelos processos citoplasmáticos de células reticulares e macrófagos (STEINIGER; BARTH, 2000).

Macrófagos nos cordões esplênicos da PV desempenham função de reciclagem e estoque do ferro proveniente da hemoglobina pela eritrofagocitose (CESTA, 2006). Frequentemente é possível observar a presença de pigmentos de ferro como hemossiderina e ferritina no citoplasma dessas células (CESTA, 2006). Esses processos envolvidos no metabolismo do ferro também estão associados à capacidade de defesa contra infecções bacterianas na PV (STEINIGER; BARTH, 2000). A competição por ferro por diversas bactérias pode levar macrófagos a secretarem moléculas que limitam a proliferação de bactérias (RATLEDGE; DOVER, 2003). Esta função especializada de macrófagos contribui para a fagocitose de elementos estranhos e denota a capacidade do baço de desempenhar vigilância contra patógenos, possibilitada por um sistema eficiente de circulação sanguínea na PV.

Nessas áreas de vascularização da PV é possível encontrar células provenientes da circulação sanguínea como granulócitos. Podem ocorrer ainda a presença de megacariócitos, plaquetas e precursores mielóides e eritroides que caracterizam uma função extramedular de hematopoiese na PV, comum em roedores (CESTA, 2006; MEBIUS; KRAAL, 2005). Em humanos adultos, focos de células hematopoiéticas podem ser encontradas em resposta a um estímulo ou por carência funcional da medula óssea (KIM, 2010).

O baço constitui ainda importante sítio de diferenciação e recrutamento de diversas populações de leucócitos. Existe uma retenção de plasmócitos de vida curta na PV que está associada a maior rapidez de transporte de imunoglobulinas para a circulação sanguínea pela proximidade aos sinusóides (HAAN; MEBIUS; KRAAL, 2012; HARGREAVES

et al., 2001). A PV é também o lugar de células efetoras que migraram de outros órgãos linfoides como linfonodos, ou células geradas pela PB como linfócitos T e B (STEINIGER; BARTH, 2000).

Nesse sentido, a PB aparece como o compartimento do baço que desempenha funções iniciais na resposta imune, possibilitada pela associação próxima a segmentos arteriais do baço e pela composição dessas células efetoras. É constituída por uma bainha periarteriolar de linfócitos (*periarteriolar lymphocyte sheath* – PALS), folículos linfoides e zona marginal (ZM) (STEINIGER; BARTH, 2000). A PALS é formada concentricamente por linfócitos T predominantemente CD4⁺ circundando uma arteríola central (figura 3), enquanto o folículo linfoide é composto principalmente por linfócitos B. O folículo linfoide é separado da PV e conectado à PALS por meio da ZM, composta por linfócitos T e B e macrófagos metalofilicos (STEINIGER; BARTH, 2000). Essa localização próxima à circulação sanguínea permite o contato inicial com antígenos e patógenos veiculados pelo sangue (MEBIUS; KRAAL, 2005). Estabelecida a comunicação com o folículo linfoide, ocorre o recrutamento de linfócitos B de memória capazes de iniciar resposta imune T dependente ou independente. Macrófagos de ZM podem ser estimulados por BAFF e APRIL, citocinas que participam na diferenciação de linfócitos B em plasmócitos por resposta T independente (GRANT et al., 2012; KRAAL, 1992; LOPES-CARVALHO; FOOTE; KEARNEY, 2005). De outra forma, uma resposta T dependente pode ser ativada por meio da interação de linfócitos T no folículo que expressam ligante de CD40 nos centros germinativos (CG) (CERUTTI; PUGA; COLS, 2011; GRANT et al., 2012). Centros germinativos ocorrem em folículos linfoides secundários, formados por células dendríticas foliculares e linfócitos proliferantes, que podem ser encontrados devido à alta atividade de fator de proliferação Ki-67 e presença de Bcl-2 que protege contra apoptose (MACLENNAN, 1994). Isto explica a ocorrência de macrófagos contendo corpos apoptóticos. Separando o CG do folículo linfoide, uma camada de linfócitos pequenos forma a zona do manto (BROZMAN, 1985). O tamanho dos folículos e CG podem variar de acordo com a intensidade da resposta de célula B (BEYER; MEYER-HERMANN, 2008).

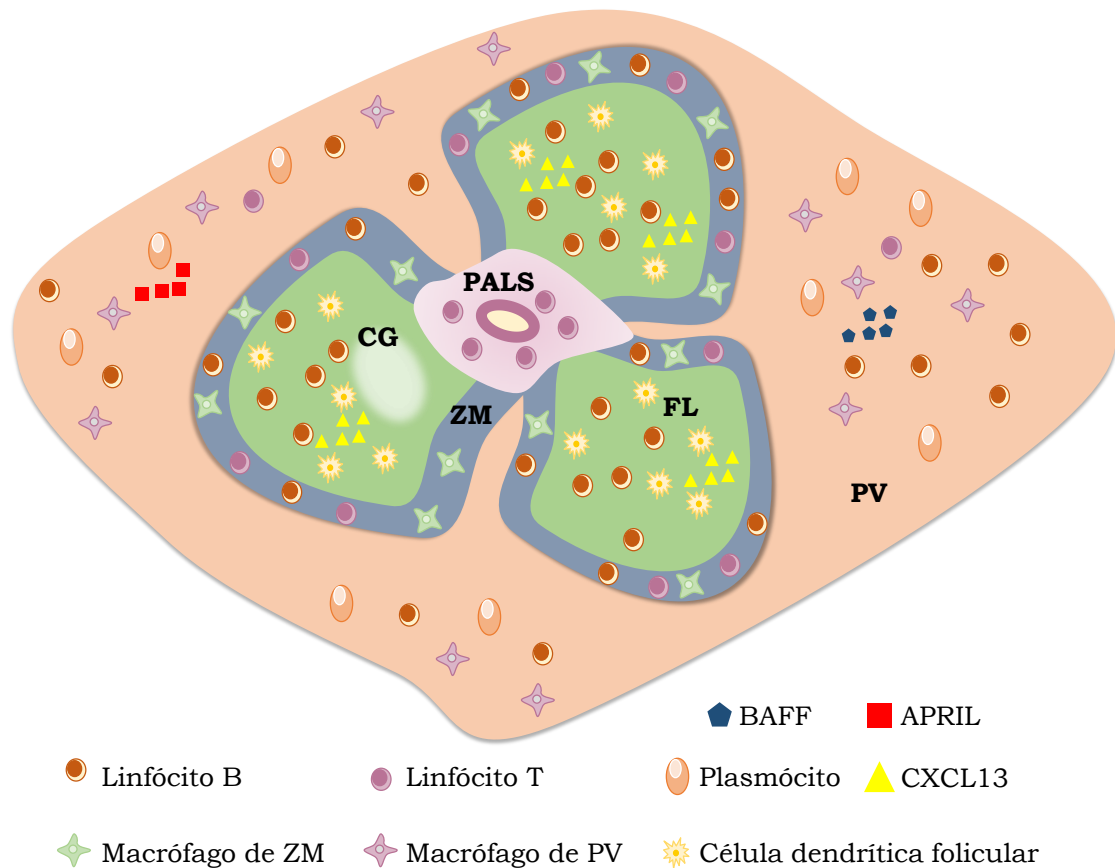


Figura 3: Desenho esquemático das polpas branca e vermelha do baço de camundongo. Ilustração dos microambientes do baço em anatomia murina. PV= polpa vermelha; ZM= zona marginal; Polpa branca formada por FL= foliculo linfoide; CG= centro germinativo; PALS= bainha linfóide periarteriolar.

As células B desempenham ainda importante função na organização da PB. Sua retenção nos folículos linfóides depende da quimiotaxia de CXCL13 (SHI et al., 2001; VAN DE PAVERT; MEBIUS, 2010). Esta é uma quimiocina que interage com receptor CXCR5 na superfície de células B, secretada principalmente por células dendríticas foliculares e células estromais. CCL21, uma quimiocina essencial para o recrutamento e retenção de linfócitos T na PALS, é dependente da expressão de Linfotóxina- $\alpha 1\beta 2$ (LT- $\alpha 1\beta 2$), um membro da família do TNF produzida também por células estromais (ANSEL et al., 2000; FÖRSTER et al., 1996; MEBIUS; KRAAL, 2005). Estes dados denotam a função orquestrada de fatores de transcrição, quimiocinas e citocinas, bem como moléculas de adesão, para promover a manutenção da arquitetura do baço (VAN DE PAVERT; MEBIUS, 2010).

2.3.2 O baço em doenças crônicas não infecciosas

Doenças que cursam em longo prazo podem prejudicar a função do baço. Com estímulos persistentes de antígenos, mesmo na ausência de infecção, o baço adquire uma remodelação tecidual para compensar a falta de funções (PEREIRA et al., 2002). Dentre as alterações possíveis, esplenomegalia é mais frequente (POZO; GODFREY; BOWLES, 2009). O aumento do baço decorre de hiperplasia em uma ou ambas PV e PB.

Na PB, ocorre hiperplasia folicular com formação de centro germinativo associada ao Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) (MOK; LAU, 2003). Este padrão de estado ativado do folículo é observado em doenças autoimunes em resposta à estimulação antigênica (AUERBACH et al., 2013). Na doença falciforme, os achados histológicos incluem atrofia da PB, marcada pela redução do número de células T e B. As zonas marginais e de células T não aparecem distinguíveis entre si (SZCZEPANEK et al., 2012). No linfoma não-Hodgkin, a PB é gravemente alterada, com folículos aumentados ou com expansão para PV (BROX; SHUSTIK, 1993). A ZM aparece com depleção de células B, que prejudicam a função das imunoglobulinas e consequente susceptibilidade à infecção bacteriana na síndrome linfoproliferativa autoimune (OLIVEIRA, 2014).

As alterações da PV em LES incluem elevado número de plasmócitos, originados de ativação policlonal de células B, linfócitos ou imunoblastos (MOK; LAU, 2003). Nas arteríolas observam-se lesões com aparência morfológica de casca de cebola, compostas por múltiplas camadas de fibrose perivascular (KITAMURA et al., 1985). Em uma série de casos de LES, foi observada hematopoiese extramedular (AUERBACH et al., 2013). Apesar do aumento do baço, observou-se necrose fibrinoide, mostrando debris celulares cariogênicos e apoptose. Na doença falciforme, a PV aparece aumentada, com maior número de células mononucleares, representadas principalmente por linfócitos e hemácias nucleadas (SZCZEPANEK et al., 2012).

2.3.3 O baço nas doenças infecciosas

A função efetora do baço é crucial na proteção contra antígenos e patógenos circulantes, enquanto sua ausência está associada a uma maior suscetibilidade à disseminação de infecções por bactérias encapsuladas e a um aumento na mortalidade por essa infecção (ANDRADE; CARVALHO; ROCHA, 1990; KYAW et al., 2006). Alterações na sua estrutura são comuns em infecções sistêmicas causadas por vírus, parasitos e bactérias.

Esplenomegalia é frequente em doenças infecciosas, relatada na esquistossomose, doenças causadas por protozoários como malária, babesiose e toxoplasmose, bem como infecções bacterianas como erliquiose e virais como na AIDS e mononucleose. Alterações na microarquitetura do baço também tem sido relatadas nessas doenças, evidenciadas pelo desaparecimento da ZM, diminuição dos folículos linfóides por depleção de linfócitos T, B e células dendríticas foliculares (ANDRADE; ANDRADE, 1966; ANDRADE; BINA, 1983; WANG et al., 2011).

Hiperplasia da PB foi observada em animais infectados por *Toxoplasma gondii*, *Babesia divergens* e *Ehrlichia canis* e infecções virais (ABREU et al., 2001; DE CASTRO et al., 2004). Os CG aparecem com figuras necróticas ou apoptóticas na cinomose e herpesvirus canina, ou são ausentes como na esquistossomose e AIDS. Na malária, os CG foram observados em tamanhos aumentados (CADMAN et al., 2008; DKHIL, 2009). A perda de células dendríticas foliculares foi relatada na AIDS, toxoplasmose e esquistossomose (FOX; COTTLER-FOX, 1992; GLATMAN ZARETSKY et al., 2012; WANG et al., 2011; YAN-JUAN et al., 2017).

Hiperplasia da PV na infecção por *Babesia* foi evidenciada por aumento progressivo da celularidade basofílica. Na erliquiose, o aumento da celularidade da PV é observado com focos de hematopoiese extramedular e infiltração de macrófagos. Alterações nos cordões esplênicos são evidenciadas pela diminuição de células T CD8⁺ que levaram ao seu afinamento em um estudo de infecção experimental por *Ehrlichia*, enquanto ocorre expansão da PALS (LEPIDI et al., 2000; MARTIN; BUNNELL; STEPHEN DUMLER, 2000; OLANO et al., 2004).

2.3.4 O baço na leishmaniose visceral

O baço está envolvido em todas as fases durante o curso da LV (CARRIÓN et al., 2006; WILSON; STREIT, 1996). Em indivíduos susceptíveis, apresenta alterações morfológicas sequenciais importantes que implicam no estado clínico geral e agravamento da doença (LIMA et al., 2014; SANTANA et al., 2008). Como mencionado anteriormente, esplenomegalia é a alteração mais comum do baço e também ocorre na LV (BADARO et al., 1986). É evidenciada por hiperplasia de ambas PB e PV, como uma das alterações mais precoces no curso da infecção quando esta se estabelece no baço. Uma das funções desempenhadas pelo baço é hemocaterese (CESTA, 2006). O aumento do baço exacerba essa função e resulta na diminuição das hemácias na circulação sanguínea. Essas alterações implicam em hiperesplenismo, uma síndrome marcada por anemia, trombocitopenia e baixo número de leucócitos circulantes (DOS-SANTOS et al., 2014).

Hiperplasia de PB é caracterizada por aumento do número de macrófagos e presença de folículos secundários, com grandes CG (KEENAN et al., 1984; VERESS; ABDALLA; HASSAN, 1983). Com a progressão da doença, ocorre ruptura dos folículos linfoides com depósitos hialinos podem ser verificados (VERESS; ABDALLA; HASSAN, 1983). Foi demonstrado que associado a essa ruptura, há perda de células dendríticas foliculares (SILVA et al., 2012; SMELT et al., 1997). Em sequência, o folículo linfóide se difunde pela PV, por consequência de um desaparecimento da zona do manto e perda da delimitação pela ZM (VERESS et al., 1977). Nos estágios mais tardios da doença, associado a um perfil de gravidade de LV, a PB sofre atrofia e CGs desaparecem (SANTANA et al., 2008). A incapacidade de formação de folículos linfoides secundários nesse estágio pode ser explicada pela apoptose de linfócitos T e redução de linfócitos B nos folículos (DE LIMA et al., 2012; SANTANA et al., 2008).

A manutenção da estrutura do baço e sua organização depende de uma complexa rede de sinalização por citocinas e quimiocinas e outras moléculas (VAN DE PAVERT; MEBIUS, 2010). Células dendríticas foliculares e células estromais são a principal fonte da quimiocina CXCL13 (SHI et al., 2001). A

redução da população de células dendríticas nos folículos foi observada em cães que adquiriram LV naturalmente (SILVA et al., 2012). Por consequência dessa diminuição, os níveis de CXCL13 foram menores nesses animais (SILVA et al., 2012). Uma vez que a retenção das células B nos folículos linfoides é dependente dessa quimiocina, essa é uma possível explicação para a redução dessas células no folículo.

As alterações de PV são mais marcantes pela alteração da densidade celular normal. Usualmente composta por linfócitos, macrófagos e leucócitos de circulação sanguínea, essas células são progressivamente substituídas por plasmócitos (SANTANA et al., 2008; SILVA et al., 2012). Plasmócitos são células do estágio final de diferenciação de células B que secretam imunoglobulinas (CERUTTI; PUGA; COLS, 2012). A maioria dos plasmócitos é de vida curta, permanecendo apenas por alguns dias no PB no baço (ELLYARD et al., 2005). A medula óssea por sua vez recebe alguns dos plasmablastos que irão se diferenciar em plasmócitos de vida longa (TANGYE, 2011). Como mencionado, essas funções dependem de fatores estimulatórios. Na verdade, os níveis das citocinas BAFF e APRIL estão aumentados em cães com LV grave e que perderam a organização usual dos compartimentos do baço (SILVA-O'HARE et al., 2016). Esses mesmos animais apresentaram redução de células B no folículo, dado que sugere que ocorra migração anômala dessa célula para a PV e diferenciação em plasmócitos, que associado à expressão aberrante de BAFF e APRIL tem sua retenção e sobrevivência aumentada nessa região, levando ao acúmulo dessa população (SILVA et al., 2012; SILVA-O'HARE et al., 2016).

Assim, essas alterações denotam marcadores de gravidade das lesões teciduais e se associam à progressão da doença. Santana e colaboradores (2008) demonstraram que periesplenite e granulomas foram mais frequentes em animais susceptíveis a LV. Mas, ainda mais relevante, as alterações de PB foram importantes nesse grupo de animais. A frequência de animais com baixa proporção de folículos linfoides foi maior em animais susceptíveis. Esses folículos foram pequenos, com CG e ZM pequenos ou ausentes. Silva e colaboradores refinaram a classificação das alterações de PB e

demonstraram que a desorganização do baço está associada à expressão anômala de CXCL13, BAFF e APRIL (figura 4).

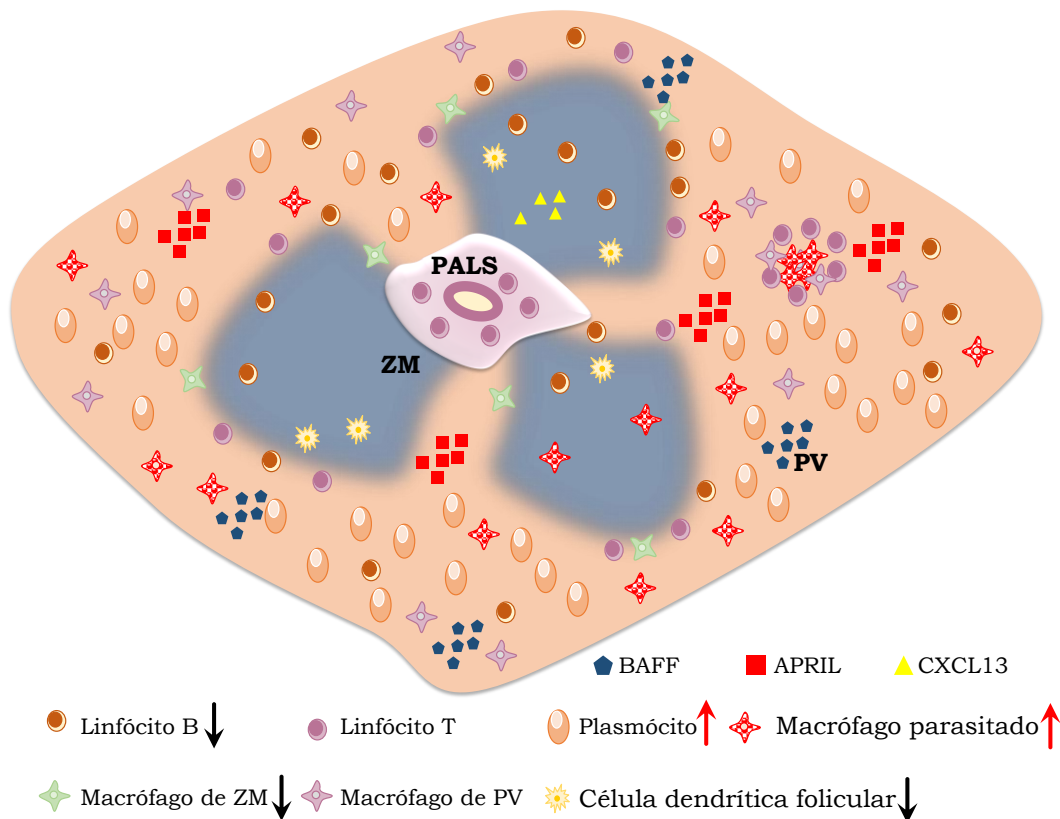


Figura 4: Desenho esquemático das alterações do baço na leishmaniose visceral.

Ilustração das alterações das subpopulações leucitárias esplênicas e citocinas e quimiocinas envolvidas no processo de desorganização estrutural do baço. PALS= bainha linfóide periarteriolar; ZM= zona marginal; PV= polpa vermelha. Setas vermelhas indicam aumento das populações celulares. Setas pretas indicam redução das populações celulares.

Recentemente, esses dados foram revisados por Hermida e colaboradores (2018) com o objetivo de integrar as informações acerca do assunto e propor uma categorização para classificar o grau de desorganização do baço. Esses padrões foram classificados em Tipo 1, quando a PB está bem organizada e as delimitações do centro germinativo, foliculo linfóide, zona do manto, ZM e PALS estão bem definidas; Tipo 3, quando a PB está moderada ou extensivamente desorganizada, com as sub-regiões pouco definidas ou indistintas e a PB se funde com a PV; ou Tipo 2, quando as alterações observadas não se encaixam nas classificações polares Tipo 1 e Tipo 3, comumente devido à celularidade aumentada ou diminuída que leva a uma leve desorganização da PB com algumas das sub-regiões mantendo-se ainda distintas (figura 5).

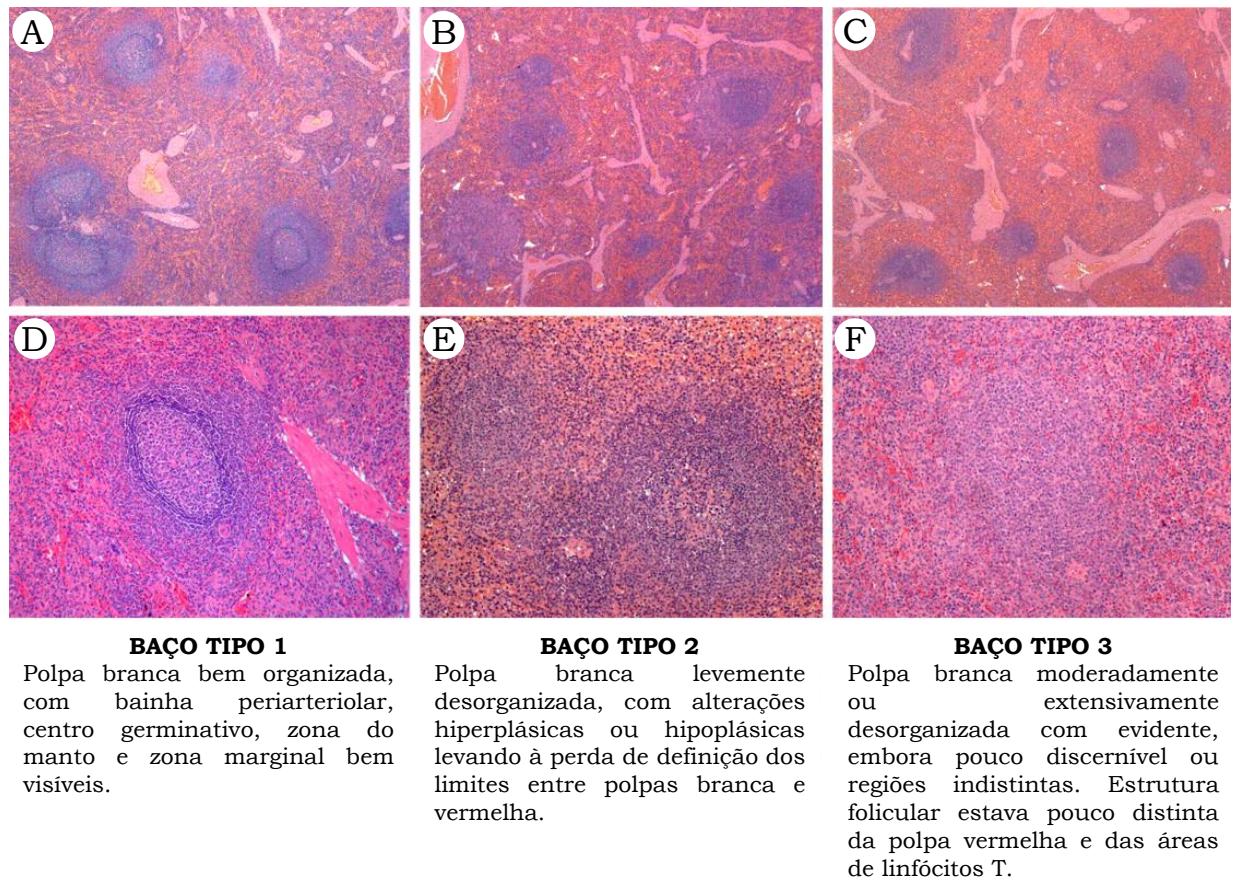


Figura 5: Classificação da desorganização do baço. Descrição das alterações histológicas de ruptura das estruturas de polpa branca e classificação de acordo com o grau. A e D, baço tipo 1; B e E, baço tipo 2; C e F, baço tipo 3. Adaptado de: Hermida et al., 2018.

Alterações na distribuição de células ocorrem em todo o curso da LV; os compartimentos do baço são afetados por essa redistribuição celular; essas alterações morfológicas tem impacto na função apropriada do baço: esse conjunto de dados sugere influência da infecção nas alterações observadas, o que não afasta a possibilidade da disfunção geral do baço em decorrência da LV. Essa inferência é suportada pela associação entre um perfil clínico mais grave e morte associada a infecções bacterianas (ANDRADE; CARVALHO; ROCHA, 1990; COSTA et al., 2010; LIMA et al., 2014). Portanto, uma investigação da sequência de eventos e vias envolvidas na desorganização do baço pode ajudar na melhor compreensão da patogênese da doença. Nesse sentido, um modelo experimental para reproduzir essas alterações poderá contribuir na melhor compreensão desses eventos.

2.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE LEISHMANIOSE VISCERAL

Como reservatório natural da LV, o cão aparece como um excelente modelo para estudo das alterações da doença. Muitas das características do desenvolvimento da LV são compartilhadas entre seres humanos e cães, e a contribuição para o avanço dos estudos em LV nos últimos anos se deve à atenção direcionada ao cão como modelo de estudo em campo (ALVAR et al., 2012). Entretanto, seu uso é limitado por razões onerosas, laboriosas. Nessa perspectiva, os modelos murinos (camundongos) e rodentes (hamsters) aparecem como importantes alternativas (NYLÉN; KUMAR, 2012).

Camundongos tem sido extensivamente utilizados como modelo de infecção por *L. infantum*. A susceptibilidade à infecção tem explicação genética, uma vez que linhagem resistente como CBA expressa o gene *Slc11a1*, que codifica Nrampl e confere a habilidade de controlar a infecção. Camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 com gene *Slc11a1* mutado, permite a rápida replicação do parasito e o estabelecimento da infecção nas primeiras semanas após a inoculação (BLACKWELL et al., 1989; CROCKER; DAVIES; BLACKWELL, 1987). Entretanto, camundongos BALB/c adquirem resposta imune competente e controlam a infecção no estágio crônico da doença (SACKS; MELBY, 2015) (ENGWERDA; ATO; KAYE, 2004). Contudo, devido à ampla disponibilidade de anticorpos e reagentes, constitui um importante modelo para estudo da LV (NYLÉN; KUMAR, 2012).

Hamsters, por outro lado, desenvolvem LV progressiva e fatal, como observado em seres humanos e cães susceptíveis (SACKS; MELBY, 2015; VERESS; ABDALLA; HASSAN, 1983). Essa susceptibilidade está associada a um perfil misto de respostas Th1 e Th2, bem como falha na expressão do gene de óxido nítrico sintase (iNOS) que, mesmo em resposta a IFN- γ , implica na incapacidade de macrófagos controlarem a replicação do parasito intracelular (MEDINA-COLORADO et al., 2017; PEREZ et al., 2006). Apesar de a análise imunológica desses animais ser prejudicada pela falta de anticorpos e reagentes compatíveis, são excelentes modelos para estudos de expressão gênica e tem contribuído com muitas das informações dos mecanismos da resposta imune na LV.

3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A desorganização estrutural do baço é um fenômeno que ocorre não somente na LV, como em outras doenças crônicas. O aumento do tamanho e alterações das populações celulares, associados à manutenção do parasitismo, implicam diretamente no prejuízo das funções do órgão como importante sítio de defesa contra infecções, favorecendo o agravamento da condição e contribuindo para a morte. Adicionalmente, as alterações dos microambientes esplênicos podem ter impacto negativo na resposta dos animais a vacinas e imunoterapias contra a leishmaniose visceral. O acesso a essas informações pode contribuir na melhor compreensão dos eventos associados a essa susceptibilidade e na implementação de novas estratégias terapêuticas.

A combinação de dois modelos (hamster e camundongo) para reprodução da desorganização da PB durante infecção experimental por *L. infantum* pode fornecer importantes informações sobre a patogênese da doença. A desorganização do baço em hamsters e camundongos já foi reproduzida por Veress e colaboradores em 1977, demonstrando que com as ferramentas atuais, é possível realizar o estudo dos mecanismos dessas alterações do ponto de vista imunológico e de expressão gênica associados.

Nossa hipótese é que a desorganização de microambientes linfóides associada a LV interfere com as interações celulares no órgão e contribui para a susceptibilidade à doença. Essas alterações estruturais resultam de um estado inflamatório de longa duração com morte de populações celulares, mudança no perfil de produção de citocinas e migração inadequada de células leucocitárias e estromais. Neste trabalho propomos um estudo sequencial das populações celulares e moléculas potencialmente envolvidas no processo de desestruturação do baço na LV. Para isso estudamos o curso da infecção experimental com *L. infantum* em camundongos e em hamsters.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na desestruturação do tecido linfoide esplênico associada à leishmaniose visceral.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#1 Avaliar sequencialmente o desenvolvimento das alterações esplênicas na leishmaniose visceral em hamsters infectados por *L. infantum*

- a. Avaliar o perfil transcriptômico em baços de hamsters dos grupos controle e no curso da infecção por *L. infantum*.
- b. Correlacionar o perfil de expressão de genes envolvidos com a organização dos diferentes compartimentos esplênicos em baços normais e com a desestruturação do tecido esplênico no curso da infecção por *L. infantum*.

#2 Avaliar sequencialmente as alterações do fenótipo celular e de citocinas associadas ao desenvolvimento da desestruturação do baço em camundongos BALB/c infectados por *L. infantum*.

- a. Avaliar as alterações das subpopulações de linfócitos, células dendríticas, plasmócitos e macrófagos envolvidas com a desestruturação esplênica no curso da infecção por *L. infantum*;
- b. Acompanhar as alterações das citocinas durante o curso da infecção por *L. infantum*.

#3 Comparar as alterações histológicas em órgãos-alvo de animais com e sem o baço, infectados com *Leishmania*.

#4 Comparar as alterações do baço em hamsters e camundongos com as observações realizadas em cães e seres humanos com leishmaniose visceral

5. METODOLOGIA GERAL

5.1 ANIMAIS

Hamsters foram obtidos da colônia do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) – Fiocruz/RJ. Camundongos foram obtidos da colônia do biotério do Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz/BA. O tamanho amostral baseia-se na estimativa de 86% dos hamsters infectados terem baços desorganizados 60 dias pós-infecção (Veress et al. 1983) e perdas de animais por morte da ordem de 20% nos pontos 60 e 120 dias, considerando-se um poder de detecção de 80% e $p < 0,05$. Os animais foram alocados em grupos experimentais homogêneos para sexo, peso e idade. Foram mantidos nas áreas de experimentação do biotério do IGM com ração específica e água *ad libitum* e sob um regime fisiológico controlado de temperatura e períodos de claro e escuro. Foi realizada identificação individual dos animais por marcação com microchip subcutâneo e número reconhecido por leitor compatível (Microchip Partners).

5.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os procedimentos envolvendo animais vivos, realizados nesta tese, não violam as rotinas propostas no manual de vigilância e controle de leishmaniose visceral (BRASIL, 2006). Foram conduzidos de acordo com a Lei No. 11.794, relativa à experimentação com animal (http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm) e com as diretrizes da Fundação Oswaldo Cruz para pesquisa com animais (<https://www.bahia.fiocruz.br/cpqgm/comite-de-etica-no-uso-de-animais/>). Esta proposta faz parte do projeto “Desenvolvimento de testes baseados na resposta imune celular para a identificação de cães infectados com *Leishmania* e para a definição de resistência, susceptibilidade de gravidade na leishmaniose visceral”, aprovado pelo comitê de ética para o uso de animais em pesquisa (CPqGM-FIOCRUZ, CEUA, licenças N.004/2013 e 017/2015).

5.3 CULTURA DE *Leishmania infantum*

Promastigotas de *L. infantum* (cepa MHOM /BR2000 /Merivaldo2) em fase estacionária de cultivo in vitro com meio Schneider completo (Schneider + 20% de soro fetal bovino (SFB), Gibco, EUA) em incubadora B.O.D. a 24°C.

5.4 EXAME CLÍNICO

O exame clínico dos hamsters resume-se à estimativa do peso, pelos e lesões cutâneas e com auxílio de uma médica veterinária colaboradora, seguindo ficha de sinais clínicos de LV (Apêndice A). Hamsters foram anestesiados com solução de cetamina + xilazina (60mg de cetamina + 8mg de xilazina, 0,1 mL/10g) por via intraperitoneal.

5.5 EUTANÁSIA E NECROPSIA

Os animais foram submetidos a anestesia letal com superdose de anestésico cetamina + xilazina. Os animais foram submetidos a necropsia com coleta de fragmentos de diferentes órgãos, indicados nos respectivos capítulos.

5.6 COLETA DE FRAGMENTO PARA ISOLAMENTO DE *L. infantum*

Material macerado de fragmento de baço foram semeados em meio de cultura bifásico (ágar sangue + meio de Schneider completo), mantidos em incubadora B.O.D. a 24°C e examinadas por até 4 semanas para detecção do parasito (Dos-Santos et al. 2008).

5.7 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS TECIDOS

Os fragmentos de tecido recolhidos em necropsia foram fixados em solução de formalina alcóolica ácida de 24-48h à temperatura ambiente (TA). Foram fragmentados em 3-4 mm de espessura e acondicionados em cassetes de processamento histológico em solução de álcool 70%. Foram embebidos em parafina e seccionados a 3-4 µm de espessura e coradas em H&E.

5.8 PARÂMETROS DE ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os tecidos dos animais foram examinados sem conhecimento prévio dos grupos, com orientação de dois médicos patologistas. Foram estimadas intensidade dos infiltrados inflamatórios, parasitismo, fibrose e degeneração celular. O baço foi examinado adicionalmente: (1) Peri-esplenite: espessamento focal da cápsula esplênica com infiltrado inflamatório crônico associado a grau variado de fibrose. (2) Granuloma: agregado focal organizado de quatro ou mais macrófagos epitelioides. (3) Celularidade: estimativa semi-quantitativa da densidade celular feita tomando-se por base a proporção entre PB e PV, consideradas as categorias: reduzida (<30% do parênquima esplênico); normal (entre 30 e 50% do parênquima); aumentada (>50% do parênquima). (4) Tamanho dos folículos linfoides, CG e ZM: foram classificados em escore. Para os CGs foi considerada também a categoria ausente. (5) Grau de organização arquitetural da PB do baço: Tipo 1 ou bem organizado, quando se distingue a bainha periarteriolar de linfócitos, centro germinativo, zona do manto e ZM; Tipo 2 ou moderadamente desorganizado, que apresenta mudanças atróficas ou hiperplásicas levando a uma perda de definição de algumas regiões da PB, com suas regiões pobremente individualizadas e distintas; e Tipo 3 ou extensivamente desorganizado, quando a estrutura folicular está raramente distinta da PV e área de células T.

6. CAPÍTULO I - Avaliação sequencial das alterações no curso da LV – hamster (objetivo específico #1)

Hamsters *Mesocricetus auratus* são susceptíveis à infecção por *L. infantum* e reproduzem características clínico-patológicas da LV humana ativa (MELBY et al., 2001). Veress e colaboradores (1983) realizaram um estudo sequencial da infecção por *L. donovani* e analisaram a morfologia da PB do baço. O relato de hiperplasia dos folículos seguindo para atrofia no último ponto de avaliação sugere um padrão de desorganização do baço como observado pelo nosso grupo em cães naturalmente infectados (SILVA et al., 2012; LIMA et al., 2014).

Nosso objetivo foi reproduzir estes achados em modelo rodente (hamster) utilizando a menor dose de *L. infantum* efetiva que resulte na desorganização da PB esplênica na fase tardia da infecção. Um estudo piloto foi realizado utilizando a via intradérmica, em dois pontos da orelha, com uma dose de 1×10^6 de promastigotas metacíclicas de *L. infantum*/mL e acompanhados por 150 dias (dados não apresentados). Ao fim do experimento, o baço foi caracterizado ainda em fase de hiperplasia e desorganização tecidual não foi observada. Desta forma, os resultados apresentados neste capítulo referem-se a um experimento utilizando formas promastigotas em fase estacionária de cultivo *in vitro* em uma dose de 1×10^7 *L. infantum* por via intraperitoneal.

Este é um estudo sequencial, de acompanhamento por 30, 60, 120 e 150 dias utilizando ferramentas de histopatologia e biologia molecular para investigar os mecanismos da desorganização da PB e potencial contribuição à susceptibilidade e agravamento na LV crônica.

6.1 METODOLOGIA

6.1.1 Animais

Foram utilizados 56 hamsters da linhagem Golden Syrian (*Mesocricetus auratus*), com 6-8 semanas de idade

6.1.2 Injeção

Promastigotas de *L. infantum* foram ressuspensas em uma concentração de 1×10^7 parasitos/mL em solução salina. Hamsters do grupo infectado foram inoculados com 1mL dessa suspensão parasitária. Hamsters do grupo controle foram injetados com 1mL de solução salina. Todos os animais foram injetados por via intraperitoneal, no quadrante abdominal inferior esquerdo.

6.1.3 Abordagem experimental

Os hamsters foram acompanhados semanalmente com referência a parâmetros clínicos. Para examinar o curso das alterações esplênicas nos hamsters, os animais foram eutanasiados a 30, 60, 120 e 150 dias pós-injeção para estudo histológico e transcriptoma do baço (figura 6).

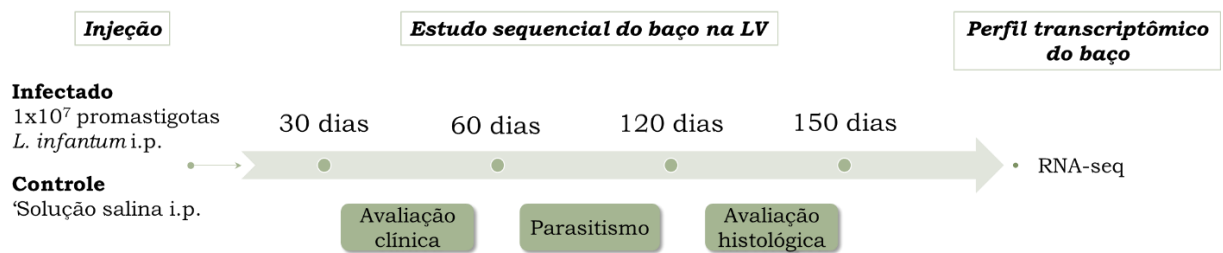


Figura 6: Abordagem experimental do estudo sequencial da leishmaniose visceral em hamsters. Ilustração esquematizando a estratégia de injeção de hamsters dos grupos controle (n=28) e infectado (n=28). Acompanhamento com referência a parâmetros clínicos, parasitismo e histológicos e coleta de baço para avaliação do perfil transcriptômico em 30, 60, 120 e 150 dias após a injeção.

6.1.4 Avaliação histológica

Foram coletados fragmentos do baço, fígado, intestino, linfonodo paratímico, pulmão e rim para análise histológica seguindo parâmetros descritos em 5.6.

6.1.5 Processamento do baço

O baço foi coletado em HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) e medidas de peso e dimensões foram estimadas. Foram realizados três fragmentos com auxílio de bisturi estéril para processamento do sequenciamento do transcriptoma, histologia e cultura para isolamento de *Leishmania* (Figura 7).

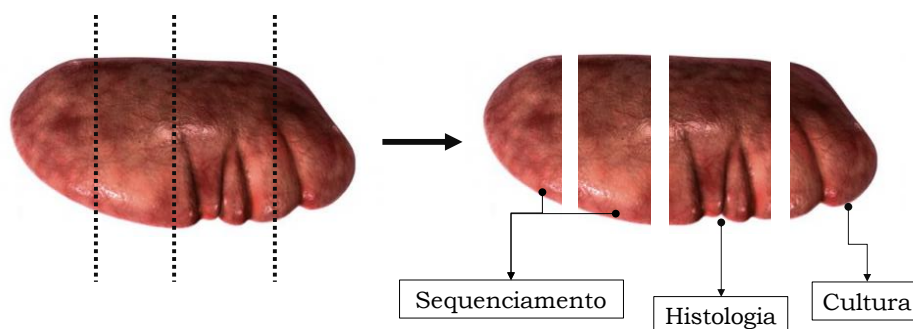


Figura 7: Processamento do baço para estudo sequencial da leishmaniose visceral em hamsters. Desenho esquemático ilustrando quatro fragmentos do baço para as múltiplas análises de sequenciamento do transcriptoma, estudo histológico e cultura para isolamento de *L. infantum*.

- Coleta de fragmento para sequenciamento

Dois fragmentos foram coletados em solução estabilizante RNA Later (Invitrogen) e mantidos a 4°C/24h. Posteriormente, o líquido foi descartado e o fragmento transferido para criotubo e armazenado em nitrogênio líquido.

6.1.6 Extração e seleção de RNA

Amostras de baço armazenadas a -80°C foram maceradas em trizol para dissociação tecidual e processadas para extração de RNA utilizando kit de extração RNAeasy (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante, com adição de etapa para digestão de moléculas de DNA utilizando DNase. A quantidade de RNA foi mensurada por NanoDrop (ThermoFischer) e qualidade avaliada por eletroforese automatizada Agilent Bioanalyzer (Agilent) e considerada exequível se o número RIN (*RNA integrity number*) > 7.

RNA ribossomal (rRNA) foi depletado da amostra para enriquecimento do RNA mensageiro (mRNA).

6.1.7 Avaliação do perfil transcriptômico do baço

Os dados foram obtidos pela técnica de RNA-seq (Illumina HiSeq 2000) por sequenciamento *paired-end* de três animais de cada grupo (réplicas biológicas), nos quatro pontos de avaliação da cinética nas duas condições (controle e infectado).

6.1.7.1 Análise inicial dos dados

A qualidade dos *reads* foi avaliada por software FastQC (v0.10.1) para cada amostra. Foram gerados relatórios de qualidade de todas as amostras para cada ponto de avaliação, utilizando multiqc.

6.1.7.2 Alinhamento dos genes

Foi utilizado um genoma de referência de golden hamster (*Mesocricetus auratus*) ID 11998 disponível em base de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=mesocricetus+auratus>), para alinhamento utilizando software STAR (DOBIN et al., 2013). A contagem das leituras associadas aos atributos foi avaliada por FeatureCounts.

6.1.7.3 Anotação genômica e análise diferencial

A presença e abundância dos genes anotados foi avaliada utilizando os dados do repositório GEO (NCBI). Para identificar transcritos diferencialmente expressos, foi utilizado teste de razão de verossimilhança com o pacote BioConductor R EdgeR e o teste Wald usando DESeq2 (KONG et al., 2017).

6.1.8 Enriquecimento de vias de interações moleculares

Foi utilizado o software Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen Inc.) para avaliar interações e gerar redes entre os transcritos diferencialmente expressos, a partir de bases de dados online e resultados testados experimentalmente. Foi utilizado um *cut-off* de log de fold change (FC) de 2 e False Discovery Ratio (FDR) $qvalue < 0.05$ e z-score de 2. Uma análise não

supervisionada foi realizada para cada ponto para avaliação funcional de vias canônicas, doenças e funções e redes regulatórias. Os resultados foram apresentados em ordem decrescente de consistência, sendo escolhidos as primeiras cinco vias; para a discussão dos dados, foi escolhida a primeira via, portanto, a via mais consistente. Uma análise supervisionada foi realizada enriquecendo interações com os seguintes transcritos associados com morfologia e função de microambientes do baço: CXCL13, CXCR5, LTA, CCR7, CCR6, CCL19, CCL21, CXCL12 e MKI67.

6.2 RESULTADOS

6.2.1 Avaliação clínica e evidência de infecção

Alterações de pelo, pele e mucosas foram categorizadas por número de sinais clínicos. Crostas em focinho, palidez de mucosas, desidratação e caquexia foram os sinais clínicos mais observados, somente nos grupos infectados a 120 (2/7) e 150 dpi, neste último apresentando maior frequência de número de sinais (7/7) que os hamsters do grupo controle (0/7, $p=0,03$) (figura 8). Cultura para *L. infantum* a partir de células de baço foi negativa nos hamsters do grupo controle e positiva nos hamsters do grupo infectado em todos os pontos de avaliação da cinética.

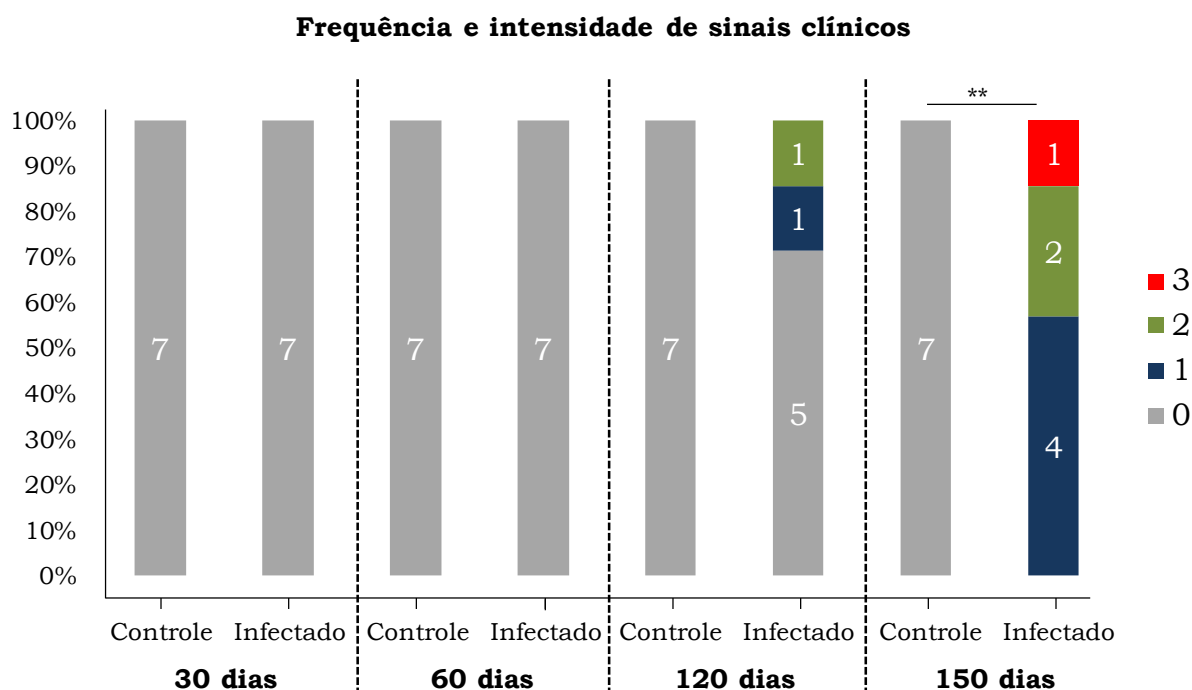


Figura 8: Frequência e intensidade de sinais clínicos de leishmaniose visceral em hamsters. Representação gráfica da avaliação clínica de hamsters dos grupos controle e infectado nos pontos de 30, 60, 120 e 150 dias após a injeção. Classificação de escore de sinais clínicos: 0= ausência, 1= um sinal clínico, 2= dois sinais clínicos, 3= três ou mais sinais clínicos. ***= Kruskal-Wallis post test, $p=0,03$.

Houve maior perda de peso nos hamsters infectados em 30 dpi ($p=0,005$), 120 dpi ($p=0,04$) e 150 dpi ($p=0,001$) quando comparados aos hamsters do grupo controle, calculados pela variação de peso entre a primeira e a última semana (Δ peso, gramas), relacionados na figura 9.

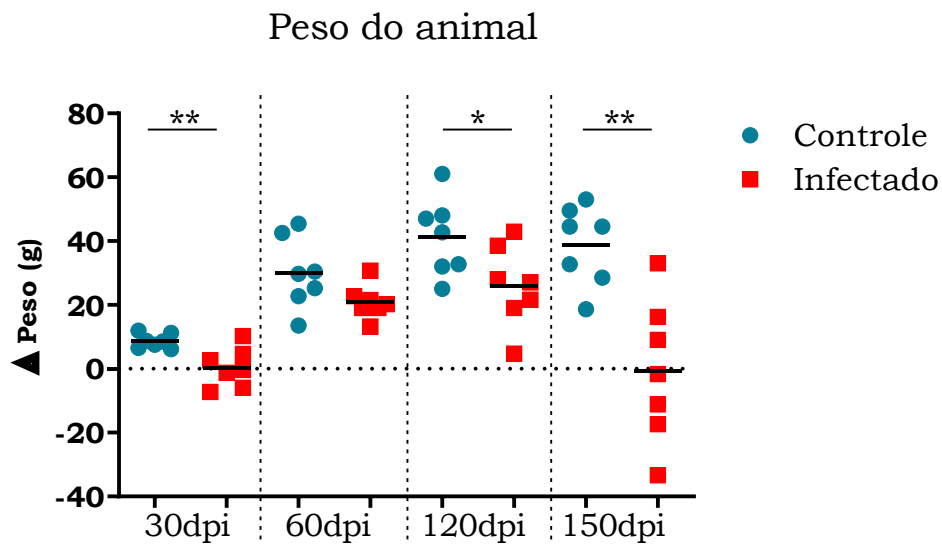


Figura 9: Variação de peso dos hamsters. Representação gráfica da diferença de peso (gramas) inicial e final dos hamsters dos grupos controle e infectado, dos pontos de avaliação de 30, 60, 120 e 150 dias após a injeção. * = $p=0,04$, t test; ** = $p<0,005$, t test.

Esplenomegalia foi observada nos hamsters infectados nos pontos de 120 ($p<0,0001$) e 150 dpi ($p=0,006$), calculada pelo peso relativo do baço ao peso total do hamster (figura 10).

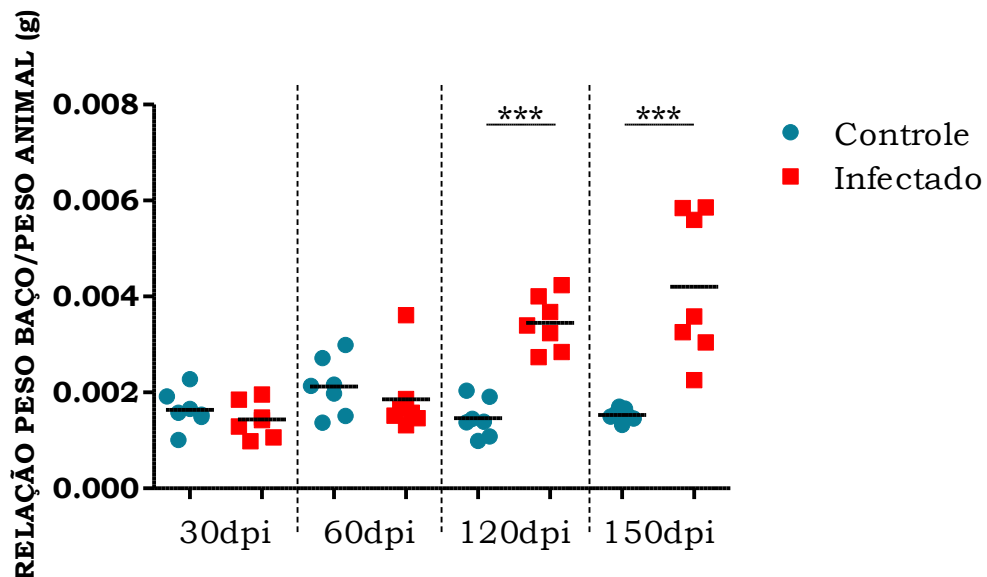


Figura 10: Avaliação de esplenomegalia em hamsters. Variação entre o peso do baço e o peso total do animal, em gramas nos grupos controle e infectado dos pontos de avaliação de 30, 60, 120 e 150 dias após a injeção. *** = $p<0,0001$, t test.

6.2.2 Análise histológica

Baço

A classificação histológica da organização arquitetural da PB de hamsters dos grupos controle e infectado está listada na tabela 1 e fotomicrografias ilustradas na figura 11. Ocorre moderada desorganização do baço a 120 dias da infecção (baço tipo 2) e significativa desorganização do baço a 150 dias da infecção (baço tipo 3, $p=0,03$).

Tabela 1. Classificação histológica da organização arquitetural do baço de hamsters dos grupos controle e infectado nos pontos de avaliação de 30, 60, 120 e 150 dias após a infecção.

GRUPOS	CLASSIFICAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO DO BAÇO		
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
N (%)	7 (100)	7 (100)	7 (100)
30 DIAS			
<i>Controle</i>	7 (100)	0	0
<i>Infectado</i>	7 (100)	0	0
60 DIAS			
<i>Controle</i>	7 (100)	0	0
<i>Infectado</i>	7 (100)	0	0
120 DIAS			
<i>Controle</i>	5 (72)	1 (14)	1 (14)
<i>Infectado</i>	2 (29)	5 (71)	0
150 DIAS			
<i>Controle</i>	6 (86)	1 (14)	0
<i>Infectado</i>	2 (29)	3 (42)	2 (29)*

Nota: Tipo 1= baço organizado; Tipo 2= baço moderadamente desorganizado; Tipo 3= baço desorganizado.* diferença do grau de desorganização arquitetural da polpa branca do baço entre hamsters dos grupos infectado e controle a 150 dias da injeção. $p=0,03$, Mann-Whitney test.

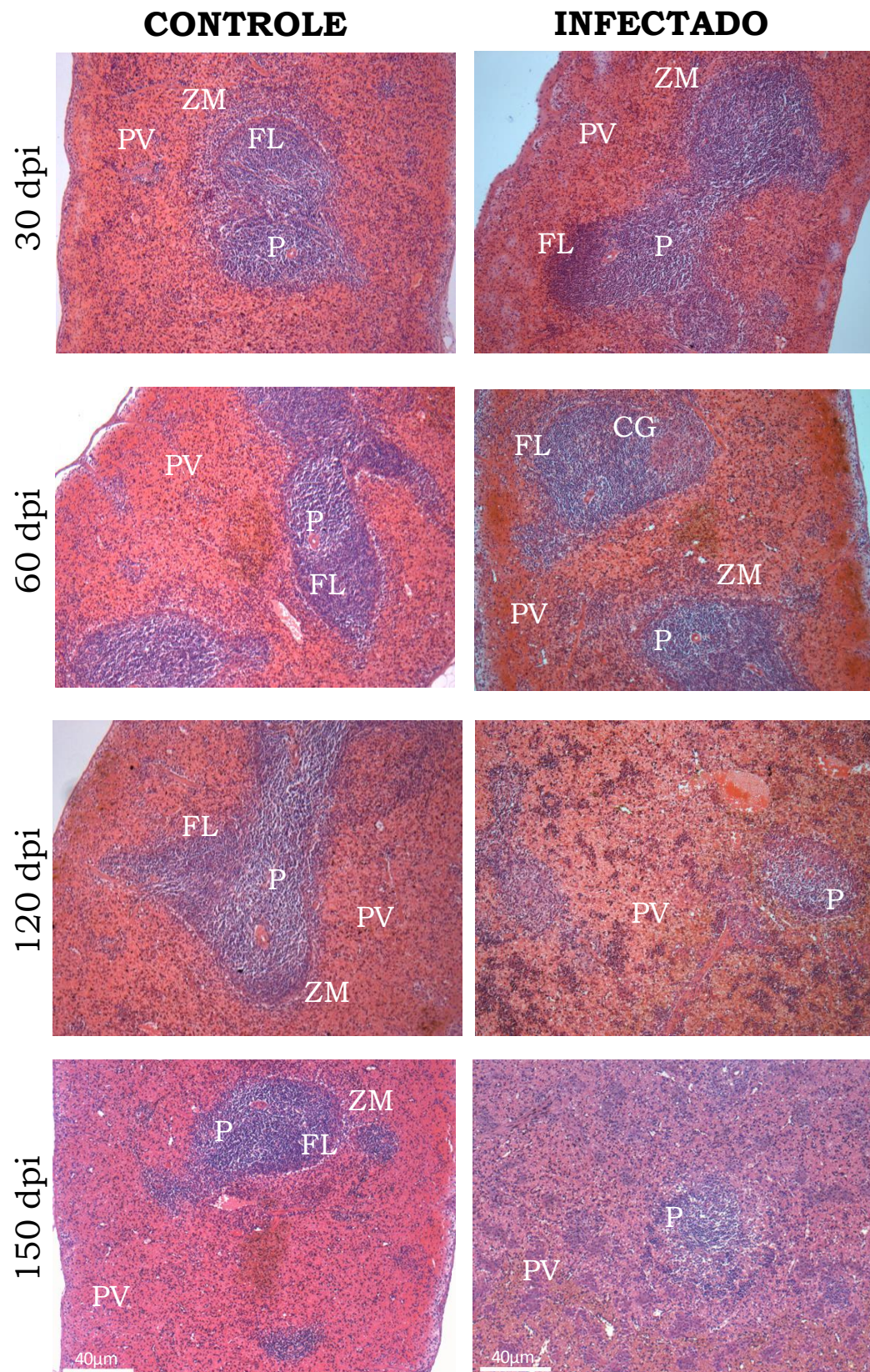


Figura 11: Fotomicrografias de baço dos hamsters. Fotos representativas de baço de hamsters dos grupos controle e infectado, em 30, 60, 120 e 150 dias após a injeção. Coloração H&E, aumento 40x, barra=40µm. Báculos do tipo I são observadas em todas as fotomicrografias, exceto em infectado a 120 dpi (tipo 2) e infectado a 150 dpi (tipo 3). FL=

folículo linfoide, CG= centro germinativo P= zona periarteriolar, ZM= zona marginal, PV= polpa vermelha.

Foi realizada morfometria para medição da área ocupada pela polpa branca do baço em relação à área total (figura 12). Os hamsters infectados do ponto de 120 dpi apresentaram redução da polpa branca (11,4 % ± 3,8) em comparação ao grupo controle (22,5 % ± 8,5, p=0,008).

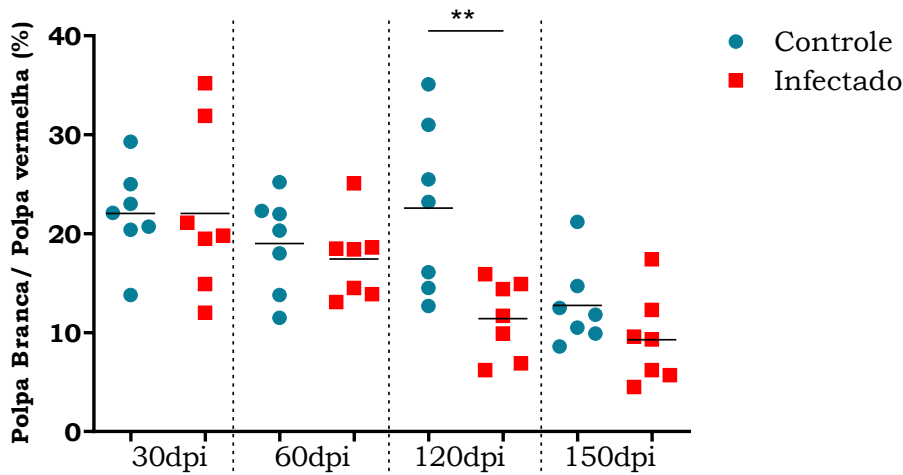


Figura 12: Avaliação morfométrica da área de polpa branca do baço de hamsters. Morfometria da área ocupada pela polpa branca do baço em relação à área total, dos hamsters dos grupos controle e infectado, em 30, 60, 120 e 150 dias após a injeção. **= t test, p=0,008.

Demais parâmetros de análise histológica do baço estão detalhados na tabela 2. Hiperplasia dos folículos foi observada a 120 dias de infecção (2 [1,5 – 2], p<0,05).

Tabela 2. Parâmetros de análise histológica do baço em hamsters a 30, 60, 120 e 150 dias após a injeção.

Parâmetros	30 dias	60 dias	120 dias	150 dias
Tamanho do folículo				
Controle	0	-0,5 [1 – 1,2]	0	0 [-1 – 0]
Infectado	0 [0 – 1]	0 [-0,2 – 1,2]	2 [1,5 – 2]*	-1 [-1 – 1]
Centro germinativo				
Controle	0 [0 – 0]	1 [-0,2 – 1]	0 [0 – 1]	0 [0 – 0]
Infectado	0 [0 – 2]	1 [0 – 1]	0 [0 – 1]	0 [-3 – 2]
Celularidade da PV				
Controle	0 [0 – 0]	0 [0 – 0]	0 [-1 – 0,2]	0 [-1 – 1,5]
Infectado	0 [0 – 0]	0 [0 – 0]	0 [0 – 1,5]	0 [0 – 2]

Nota: *= diferença do score de tamanho do folículo entre hamsters dos grupos infectado e controle a 120 dias da injeção. $p=0,02$, Kruskal-Wallis test. Valores representados em mediana e intervalos interquartis.

Periesplenite discreta foi observada em um hamster do grupo controle a 60 dpi e 4 hamsters do grupo controle a 150 dpi (figura 13, A). Em hamsters infectados, periesplenite foi observada em todos os pontos de avaliação. A 150 dpi, 2/7 hamsters infectados apresentaram intensa periesplenite (figura 13, B), associada com a progressão da doença. A mediana do escore não é estatisticamente diferente entre os grupos.

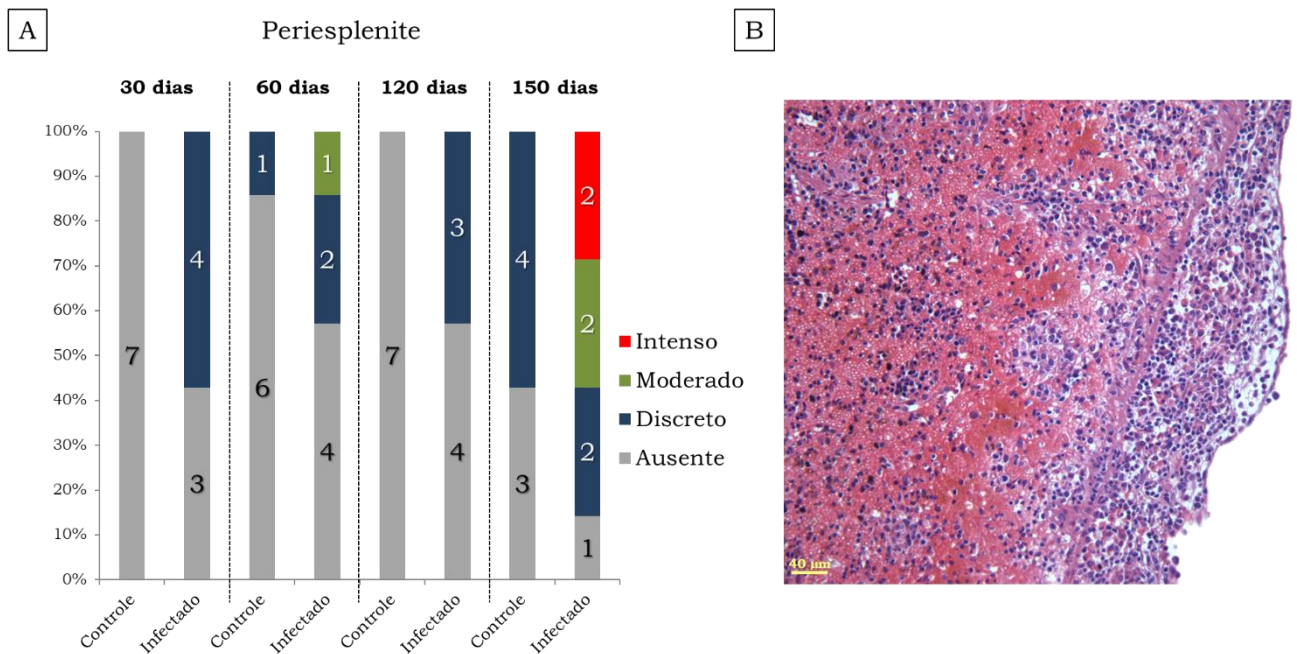


Figura 13: Avaliação de periesplenite em hamsters. (A) frequência e intensidade de periesplenite em hamsters a 30, 60, 120 e 150 dias após a injeção. (B) Fotomicrografia de baço evidenciando área de periesplenite em hamster infectado a 150 dias (Coloração H&E, x200, barra= 40μm).

Granulomas foram observados apenas em hamsters infectados a partir de 60 dias de infecção, aumentando em intensidade com a progressão da LV (figura 14, A). A 150dpi, esta diferença apresenta significância estatística ($p=0,01$). Os granulomas aparecem com pouca organização e em tamanhos pequenos (figura 14, B).

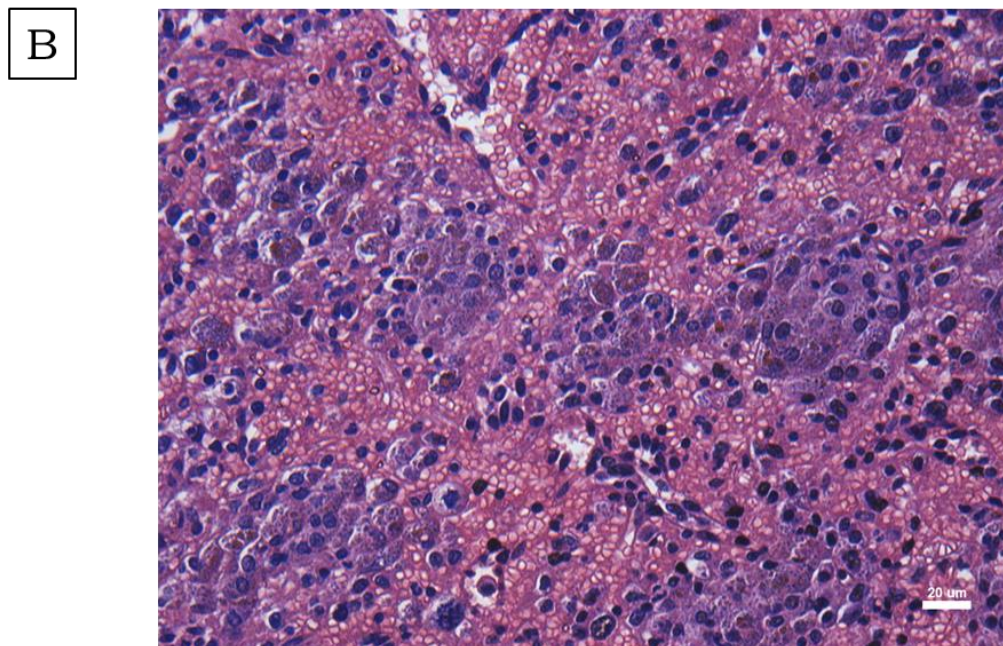
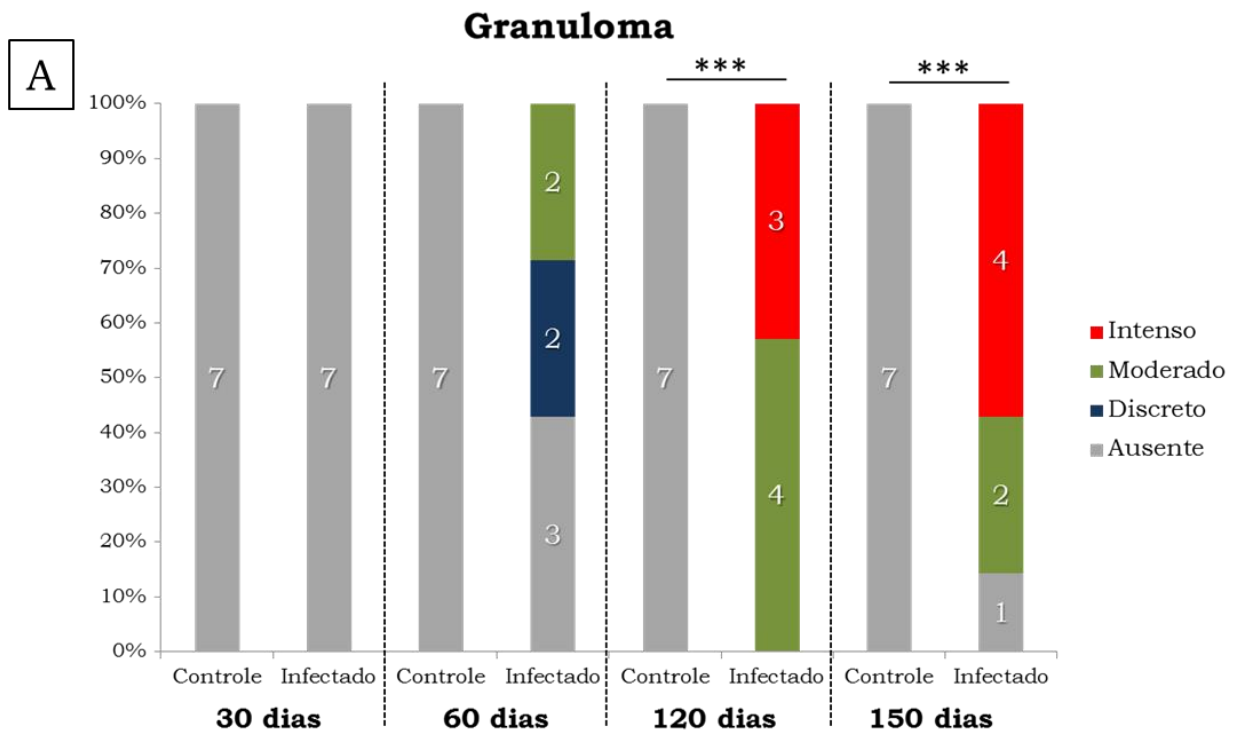


Figura 14. Avaliação de granuloma em baço de hamsters. (A) frequência e intensidade de granulomas em hamsters a 30, 60, 120 e 150 dias após a injeção. ***= Kruskal-Wallis test, $p=0,0001$. (B) Fotomicrografia de baço evidenciando área com granulomas em hamster infectado a 150 dias (Coloração H&E, x400, barra= 20 μ m).

Fígado

As alterações histológicas do fígado estão descritas na tabela 3. Hiperplasia de célula de Kupffer e infiltrado inflamatório no parênquima podem ser observados na figura 15.

Tabela 3. Parâmetros de análise histológica do fígado em hamsters a 30, 60, 120 e 150 dias após a injeção.

Parâmetros	30 dias		60 dias		120 dias		150 dias	
	CT	INF	CT	INF	CT	INF	CT	INF
N (%)	7(100)	7(100)	7(100)	7(100)	7(100)	7(100)	7(100)	7(100)
Leucocitose intrassinusoidal								
<i>Ausente</i>	3(43)	4(57)	4(57)	4(57)	7(100)	5(71)	5(71)	3(43)
<i>Discreto</i>	4(57)	3(43)	3(43)	3(43)	0	2(29)	2(29)	1(14)
<i>Moderado</i>	0	0	0	0	0	0	0	2(29)
<i>Intenso</i>	0	0	0	0	0	0	0	1(14)
Infiltrado inflamatório parênquima								
<i>Ausente</i>	6(86)	3(43)	5(71)	5(71)	7(100)	5(71)	3(43)	3(42)
<i>Discreto</i>	1(14)	3(43)	2(29)	2(29)	0	2(29)	4(57)	2(29)
<i>Moderado</i>	0	1(14)	0	0	0	0	0	2(29)
Hiperplasia de Célula de Kupffer								
<i>Ausente</i>	7(100)	4(57)	7(100)	4(57)	1(14)	1(14)	7(100)	2(29)
<i>Discreto</i>	0	3(43)	0	3	6(86)	4(57)	0	1(14)
<i>Moderado</i>	0	0	0	0	0	2(29)	0	3(43)
<i>Intenso</i>	0	0	0	0	0	0	0	1(14)

Nota: CT= grupo controle; INF= grupo infectado. * diferença da frequência de entre hamsters dos grupos infectado e controle a 120 e 150 dias da injeção. p=0,001, Kruskal-Wallis test.

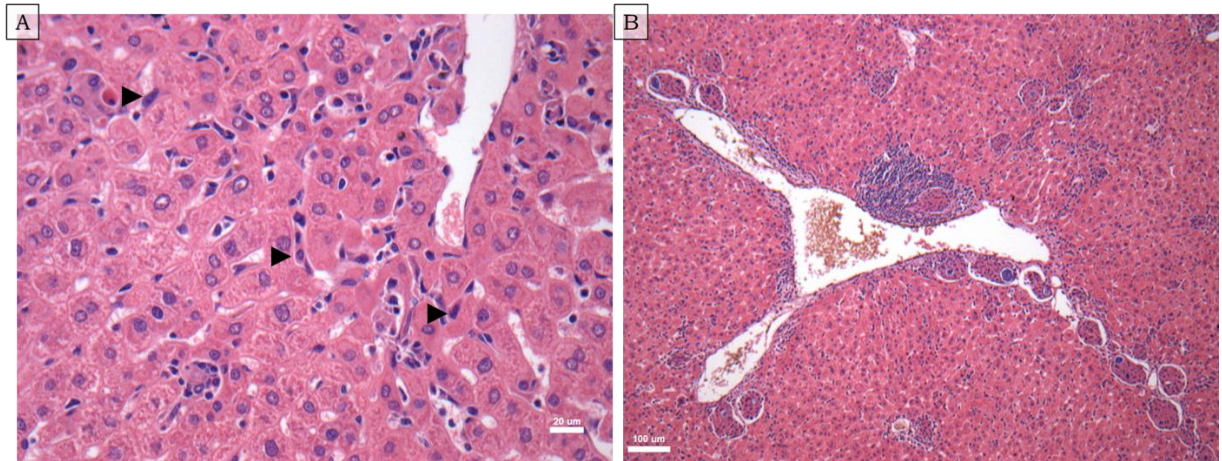


Figura 15: Fotomicrografia de fígado de hamsters. Hiperplasia de células de Kupffer (setas, A) aumento 200x, barra= 20µm; e infiltrado inflamatório pericentral (B) com presença de granulomas, aumento 100x, barra= 100µm. Coloração H&E.

Granulomas pequenos e bem organizados foram encontrados apenas em animais infectados e localizados no espaço porta (figura 16, A e C) e em parênquima (figura 16, B), com aumento em intensidade nos pontos mais tardios da infecção (120 e 150 dpi, $p < 0,01$) (figuras 16, B e D). Schaumann bodies no interior de granulomas no parênquima (figura 16, B, seta) foram observados apenas em hamsters infectados 120 e 150dpi, com aumento de intensidade (figura 16, E, $p = 0,01$).

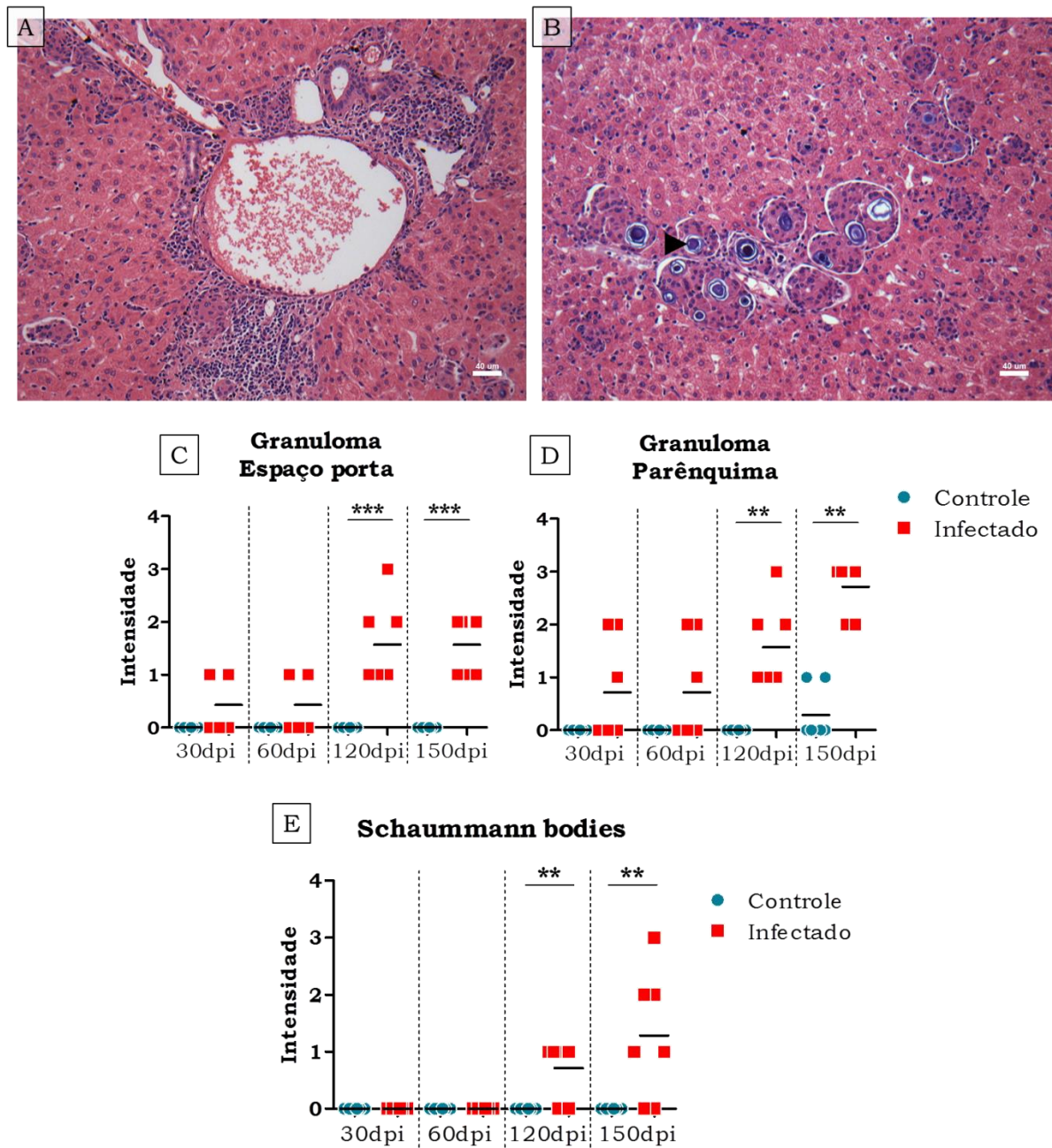


Figura 16: Avaliação de granulomas em fígados de hamsters. Fotomicrografia de granulomas em espaço porta (A) e granulomas com Schaumann bodies em parênquima (B), coloração H&E, aumento 200x, barras= 40µm; representação gráfica de classificação de intensidade em C, D e E em hamsters dos grupos controle (azul) e infectado (vermelho) a 30, 60, 120 e 150 dias após a injeção. **= Kruskal-Wallis test, $p < 0,005$ ***= Kruskal-Wallis test, $p < 0,003$.

Linfonodo

Com frequência as subregiões dos linfonodos apareceram subrepresentadas. Parâmetros de avaliação histológica estão listados na tabela 4. Houve ocorrência de granulomas em apenas hamsters infectados a 120 e 150 dpi (tabela 4, figura 17), porém sem significância estatística.

Tabela 4. Parâmetros de análise histológica do linfonodo em hamsters a 30, 60, 120 e 150 dias após a injeção.

Parâmetros	30 dias		60 dias		120 dias		150 dias	
	CT	INF	CT	INF	CT	INF	CT	INF
N (%)	7(100)	7(100)	7(100)	7(100)	7(100)	7(100)	7(100)	7(100)
Folículos								
<i>Não evidente</i>	6(86)	4(57)	6(86)	4(57)	4(57)	4(57)	4(57)	3(43)
<i>Presente*</i>	2[2-2]	3[2-3]	2[2-2]	3[2-3]	0[-1-0]	0[0-3]	-1[-2-0]	-2[-3-0,5]
Centro germinativo								
<i>Não evidente</i>	6(86)	4(57)	6(86)	4(57)	5(71)	5(71)	5(71)	2(29)
<i>Presente*</i>	1[1-1]	3[2-3]	1[1-1]	3[2-3]	0[0-0]	1,5[0-3]	-1,5[-3-0]	-3[-3-0,5]
Granuloma								
<i>Ausente</i>	7(100)	7(100)	7(100)	7(100)	7(100)	5(71)	7(100)	5(71)
<i>Presente</i>	0	0	0	0	0	2(29)	0	2(29)

Nota: CT= grupo controle; INF= grupo infectado. *Valores de score de intensidade, representados em mediana e intervalos interquartis.

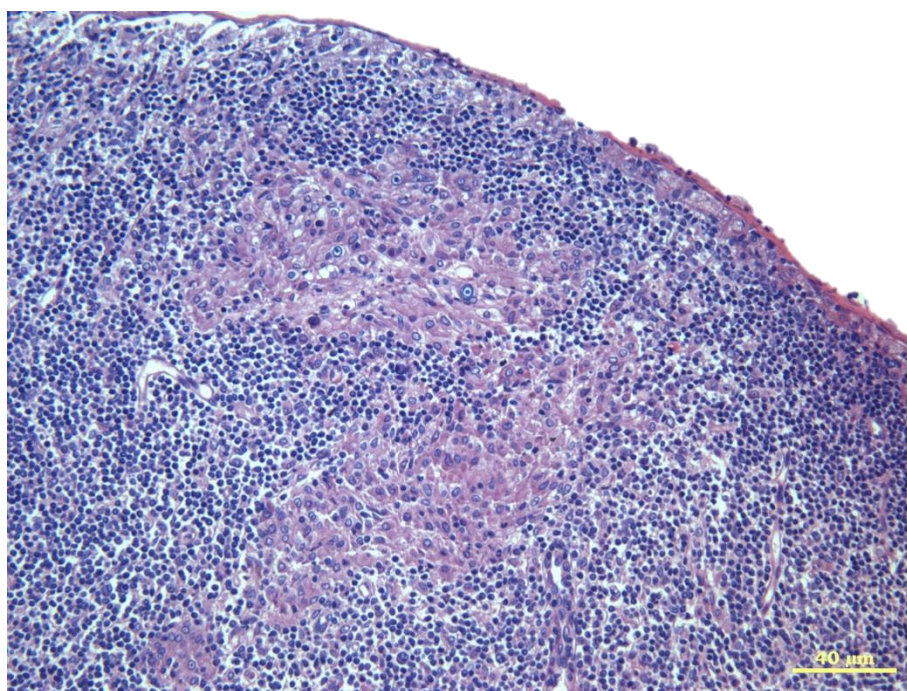


Figura 17: Fotomicrografia de linfonodo de hamster. Granuloma desorganizado em linfonodo de hamster infectado a 150 dias, coloração H&E, aumento 100x, barra= 40μm.

Pulmão

Não foram observados eventos histopatológicos no pulmão a 30 e 60 dpi. A 120 e 150 dpi, as alterações foram raras e discretas. Granulomas foram observados apenas em hamsters infectados a 120dpi (3/7) e 150dpi (3/7) (figura 18).

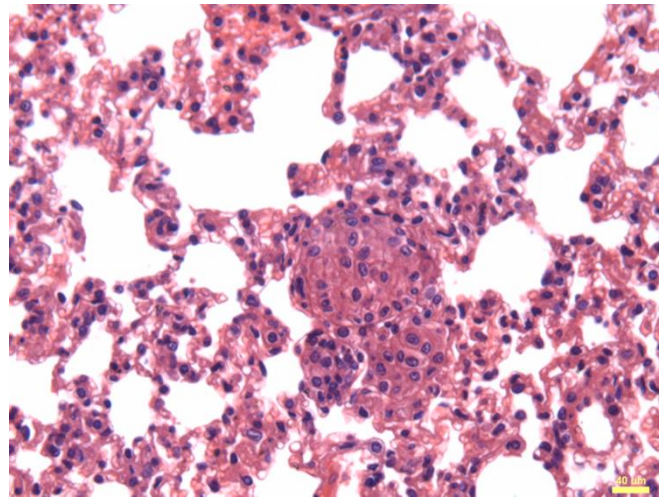


Figura 18: Fotomicrografia de pulmão de hamster. Fotomicrografia evidenciando granuloma em septo do pulmão de hamster infectado a 150 dias, coloração H&E, aumento 200x, barra= 40µm.

Intestino

Não foram observadas alterações histopatológicas no intestino, exceto pela presença de granuloma na serosa em um hamster infectado a 150 dpi (figura 19).

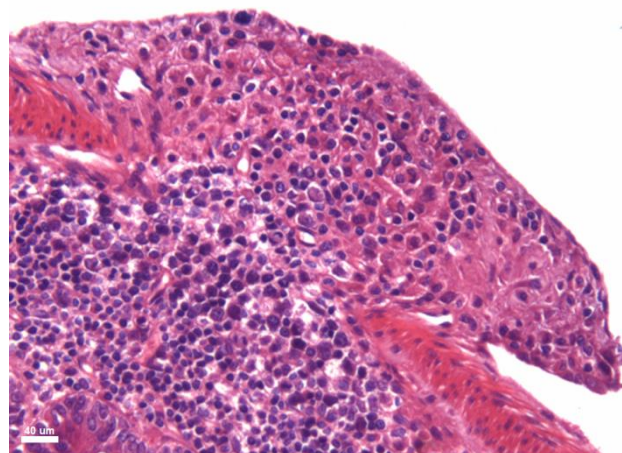


Figura 19: Fotomicrografia de intestino de hamster. Fotomicrografia evidenciando granuloma na serosa em hamster infectado a 150 dias, coloração H&E, aumento 200x, barra= 40µm.

Rim

As alterações encontradas foram de expansão mesangial, fibrose no interstício e infiltrado inflamatório crônico intersticial em hamsters infectados, porém raramente evidenciadas e sem significância estatística.

6.2.3 Análise transcriptômica

6.2.3.1 Seleção de RNA

Com base na análise da desestruturação do baço, foram selecionados 5 hamsters de cada condição (controle e infectado) dos quatro pontos de avaliação, gerando 40 amostras. Foi extraído RNA das amostras de baço e avaliada a qualidade por eletroferograma BioAnalyzer (figura 20), com número de integridade de RNA (RIN - *RNA integrity number*) superior a 8. A partir da análise de qualidade, foram então selecionadas três réplicas biológicas de cada uma das duas condições nos quatro pontos de avaliação para sequenciamento do transcriptoma por RNA-Seq.

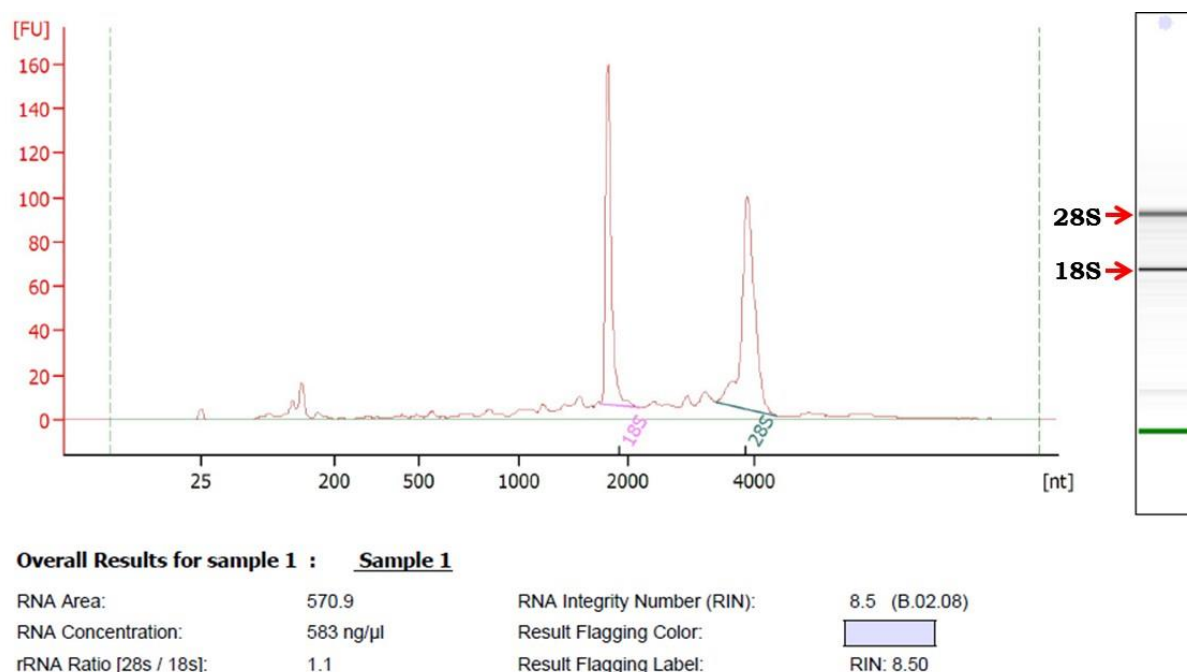


Figura 20: Eletroferograma de uma amostra de RNA extraída de baço de hamster.

Representação gráfica da análise de qualidade do RNA. As setas vermelhas indicam as bandas de unidades ribossomais de RNA, utilizadas como parâmetro para avaliar a integridade do RNA. RNA Integrity Number (RIN) foi de 8,5 e concentração total de RNA foi de 583 ng/μl.

6.2.3.2 Qualidade das sequências

Foi utilizado um *cut-off* de *phred score* 30, que mede a qualidade das sequências. Não foi necessário excluir reads da biblioteca, pois todos apresentaram um *phred score* acima de 30 (figura 21).



Figura 21: Gráfico representando score de qualidade de reads da biblioteca. Linhas representam reads que apresentam um *phred score* acima de 30.

6.2.3.3 Caracterização geral dos transcritos

Após anotação dos transcritos, foi avaliada a distribuição estatística nos diferentes pontos experimentais. Transcritos diferencialmente expressos em hamsters infectados estão representados em vermelho e mostram um aumento progressivo do número durante o período de avaliação ($p < 0,05$): 1.040 (30 dpi); 1.813 (60 dpi); 5.874 (120 dpi) e 6.512 (150 dpi) (figura 22).

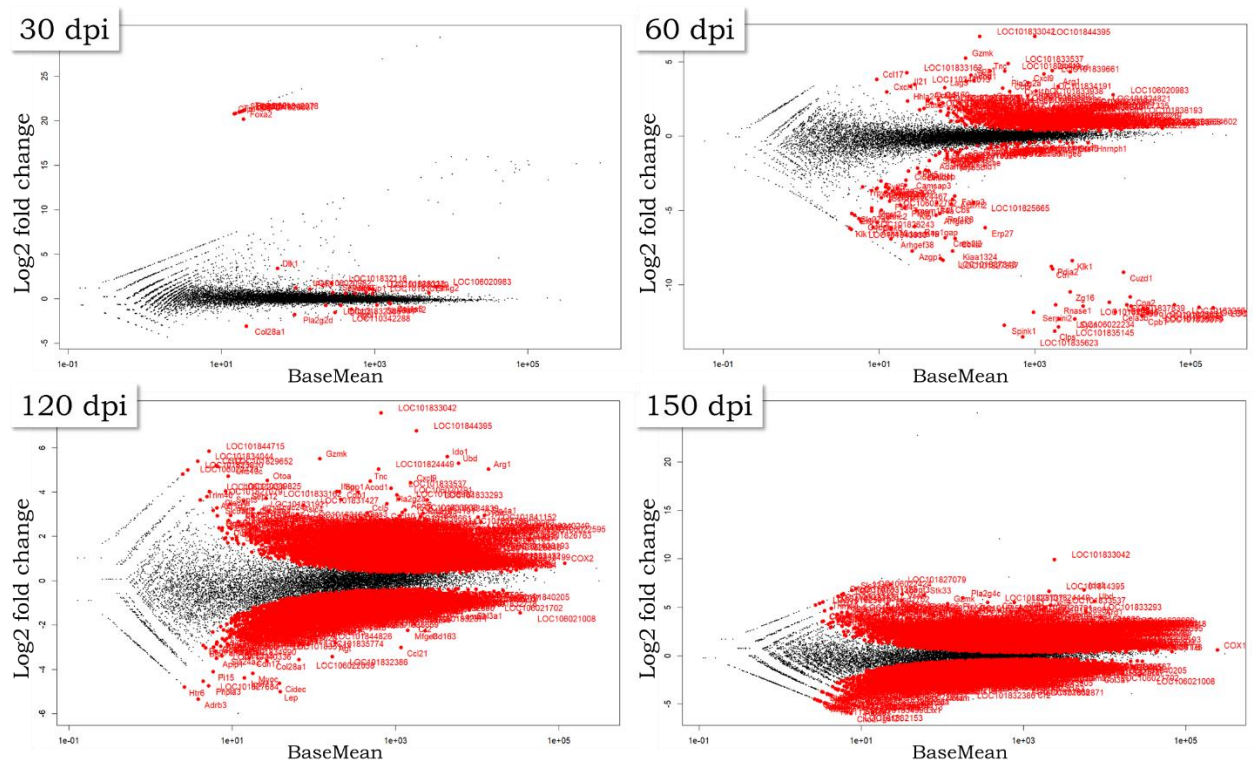


Figura 22: Transcritos diferencialmente expressos na cinética de infecção em hamster. Pontos vermelhos representam log2 de fold change de transcritos diferencialmente expressos (FDR<0,05) em hamsters a 30, 60, 120 e 150 dias após a infecção.

6.2.3.4 Enriquecimento funcional dos transcritos

Com o número elevado de transcritos diferencialmente expressos, foram utilizadas estratégias de análise para designar significados funcionais a grupos menores de genes. Foram construídas redes de interações moleculares para cada ponto de avaliação, incluídas moléculas expressas com pelo menos *fold change* de 2 e FDR<0,05. A 30dpi somente duas moléculas foram incluídas sob esses parâmetros. Os resultados foram representados para as redes mais consistentes de cada uma dessas estratégias.

- Efeitores regulatórios

A análise mais consistente de interação entre as moléculas a 60dpi revelou processos de movimento de leucócitos e resposta inflamatória com papéis centralizados neste ponto da infecção (figura 23).

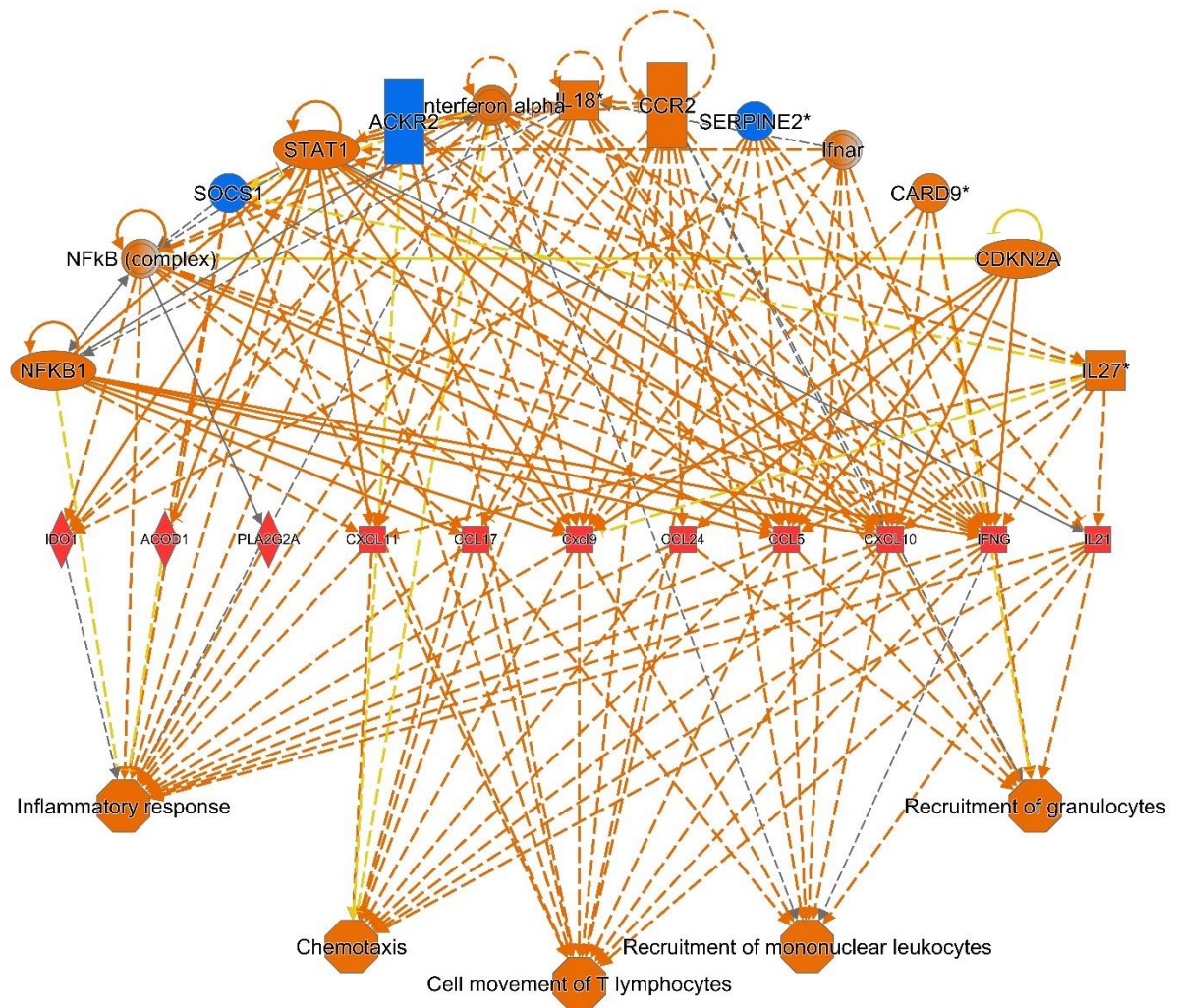


Figura 23: Mapa de interação de moléculas associadas a efetores regulatórios a 60 dias de infecção. Moléculas associadas a processos de resposta inflamatória, quimiotaxia, movimento de linfócitos, recrutamento de leucócitos mononucleares e recrutamento de granulócitos em hamsters 60 dias de infecção. Expressão dos transcritos: verde – baixa expressão; vermelho – alta expressão; interações secundárias de moléculas e processos associados aos transcritos: laranja – predição de ativação; azul – predição de inibição; linhas pontilhadas: interação indireta; linhas contínuas: interação direta; linhas cinzas: efeito não previsto nas bases de dados; linhas amarelas: achados inconsistentes.

A 120 dias de infecção a via de recrutamento de granulócitos permanece ativada (figura 24), sendo regulada pelo maior número de moléculas nesta rede de interação. A este ponto aparece alteração de quantidade de íons de metal sendo estimulada primariamente por SPP1, CCL5, IFN γ , LEP e CXCL10. A alteração de quantidade de íons de metal continua a ser regulada a 150 dias de infecção, no entanto, com maior número de moléculas associadas (figura 25). Alterações sistêmicas como doença hemorrágica e comportamento emocional aparecem associadas ao conjunto de moléculas expressas nesta fase da infecção.

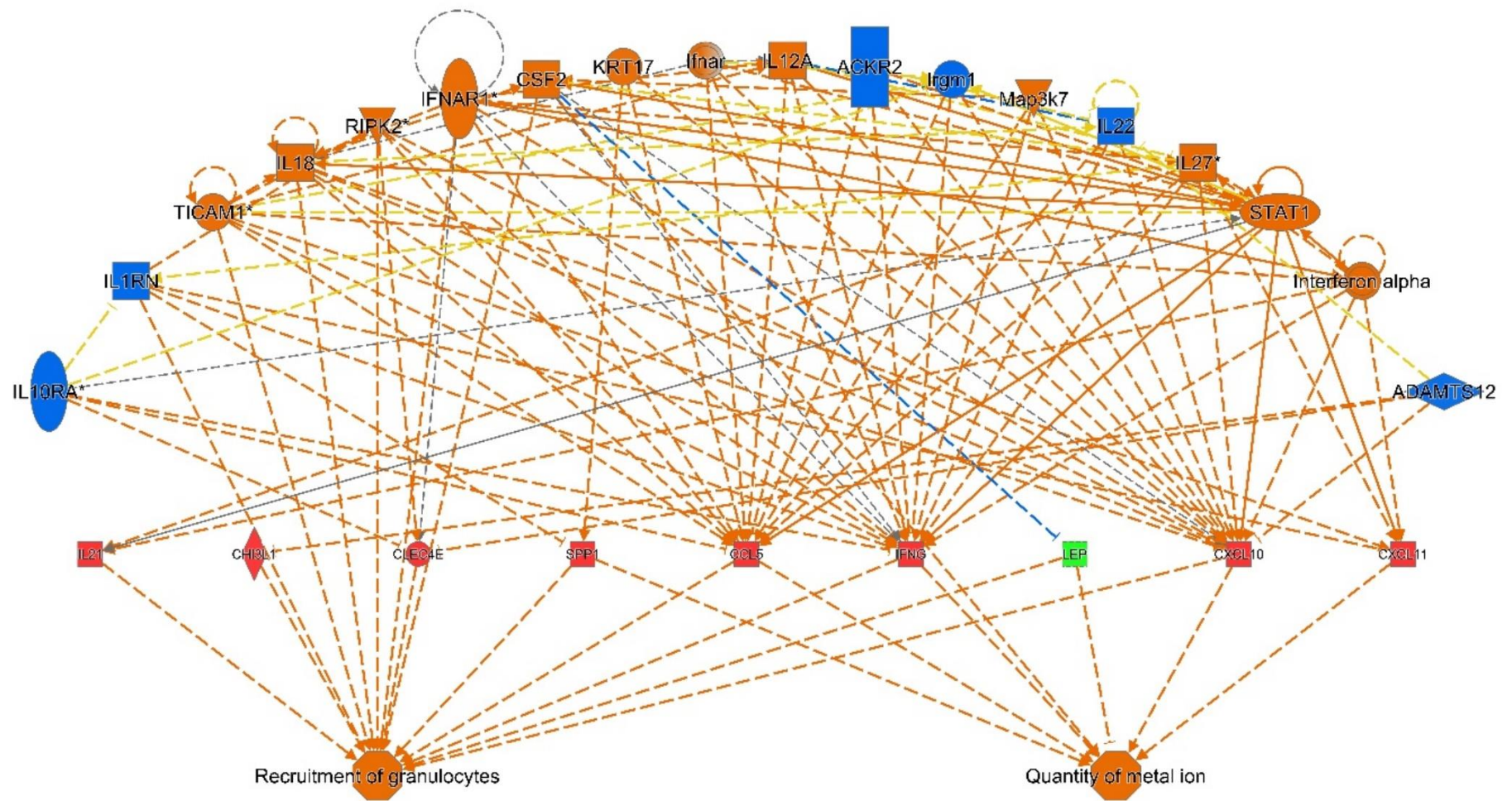


Figura 24: Mapa de interação de moléculas associadas a efetores regulatórios a 120 dias de infecção. Moléculas associadas a funções de recrutamento de granulócitos e alteração de quantidade de íons de metal em hamsters 120 dias de infecção. Expressão dos transcritos: verde – baixa expressão; vermelho – alta expressão; interações secundárias de moléculas e processos associados aos transcritos: laranja – predição de ativação; azul – predição de inibição; linhas pontilhadas: interação indireta; linhas contínuas: interação direta; linhas cinzas: efeito não previsto nas bases de dados; linhas amarelas: achados inconsistentes.

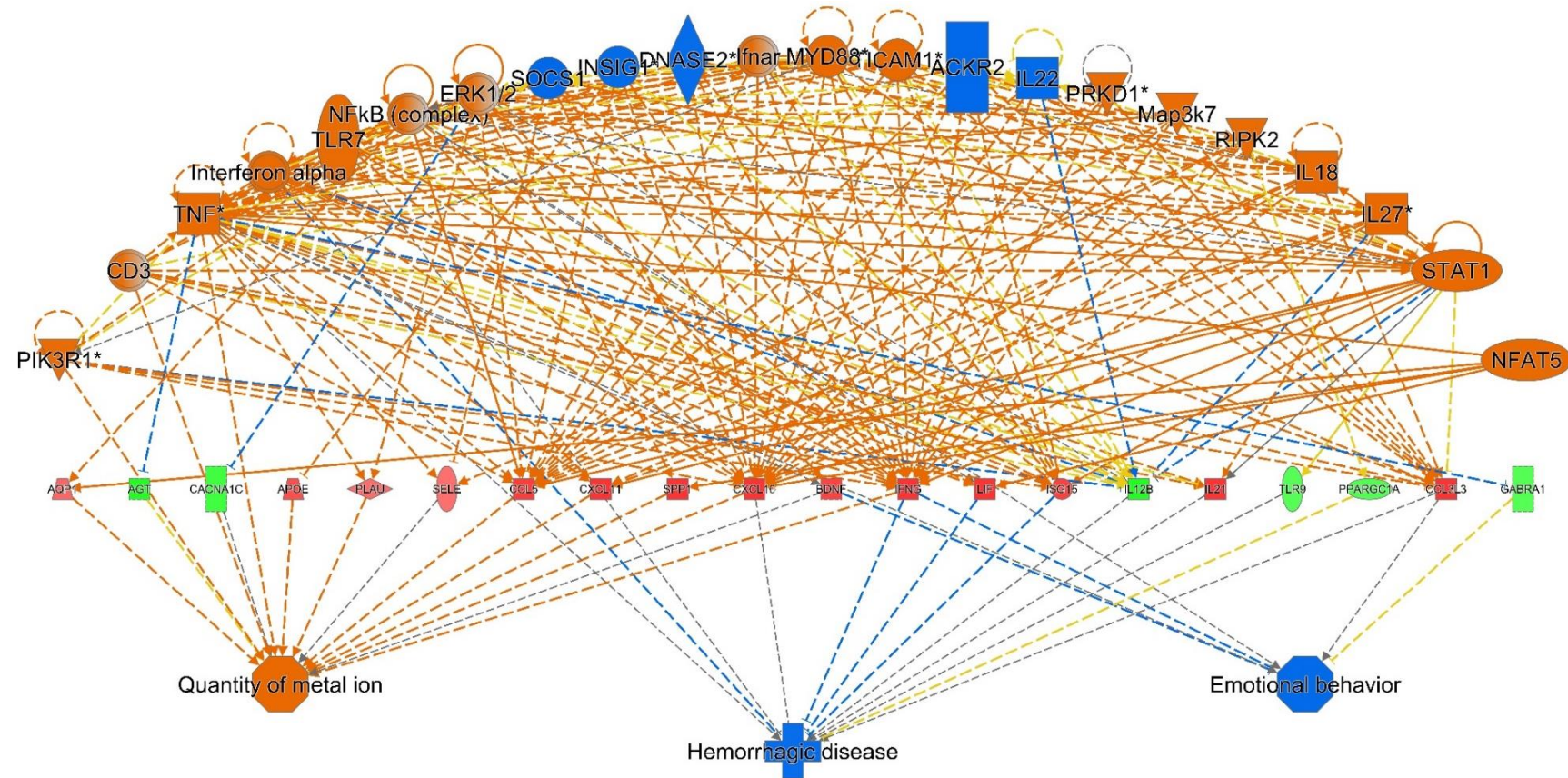


Figura 25: Mapa de interação de moléculas associadas a efetores regulatórios a 150 dias de infecção. Moléculas associadas a alterações de quantidade de íons de metal, doença hemorrágica e comportamento emocional em hamsters 150 dias de infecção. Expressão dos transcritos: verde – baixa expressão; vermelho – alta expressão; interações secundárias de moléculas e processos associados aos transcritos: laranja – predição de ativação; azul – predição de inibição; linhas pontilhadas: interação indireta; linhas contínuas: interação direta; linhas cinzas: efeito não previsto nas bases de dados; linhas amarelas: achados inconsistentes.

- Doenças e funções

Foram alinhados conjuntos de transcritos no dataset que são compatíveis a doenças ou funções já relatadas na literatura ou depositadas em bancos de dados online. As cinco primeiras vias de doenças e funções estão representadas na figura 26, A. Para o primeiro e mais consistente resultado, foi investigada adicionalmente o conjunto de transcritos regulando esta função (figura 26, B). Observa-se que quimiotaxia de linfócitos T está sendo regulada por moléculas que mudam o padrão de expressão durante a cinética. Ocorre principalmente aumento da expressão das moléculas, no entanto chama a atenção IL-12b e CCL21 que aparecem gradualmente com menor expressão até 120 e 150dpi.

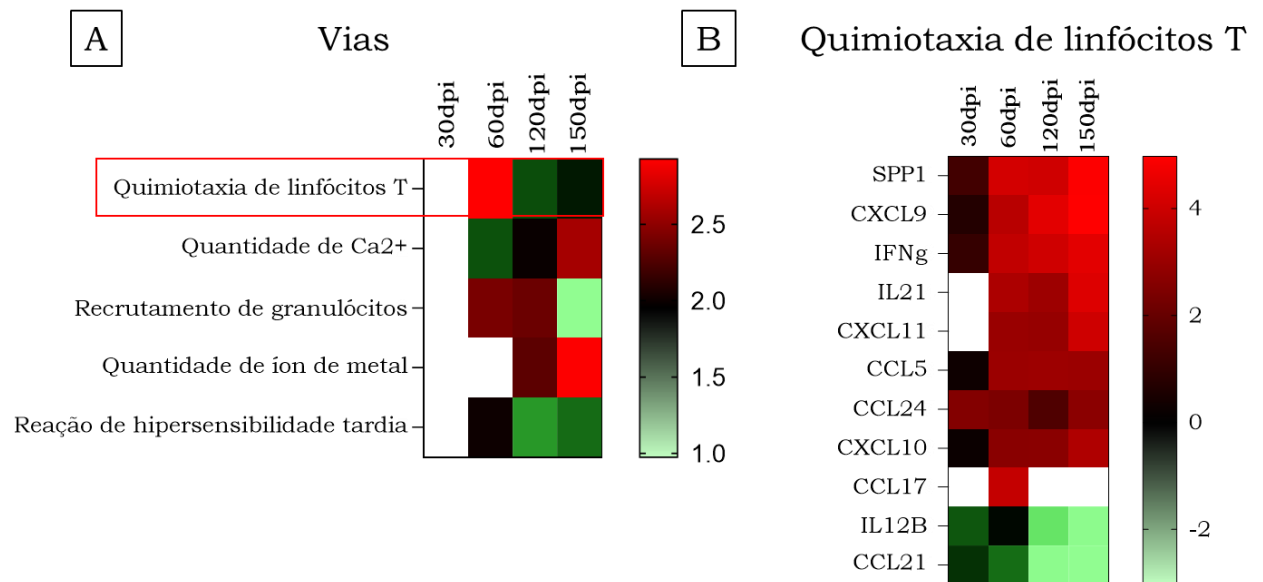


Figura 26: Heatmaps de moléculas associadas a doenças ou funções diferencialmente expressas ao longo da cinética. Vias associadas a doenças ou funções (A) e moléculas relacionadas à via de quimiotaxia de linfócitos T (B) em hamsters a 30, 60, 120 e 150 dias de infecção.

- Redes regulatórias

Uma série de redes sendo reguladas por uma molécula estão representadas na figura 27, A. Dentre elas, o mais consistente resultado destaca-se pela via regulada por Irgm1 (figura 27, B), que a partir de 60dpi apresenta alta expressão das moléculas envolvidas na via.

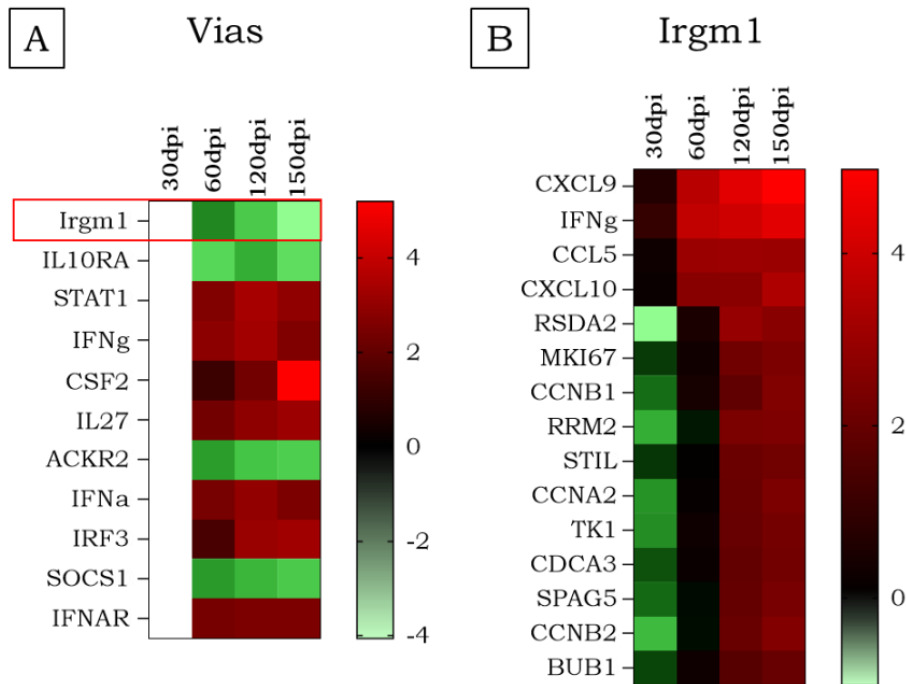


Figura 27: Heatmaps de moléculas associadas a redes regulatórias diferencialmente expressas ao longo da cinética. Vias associadas a redes regulatórias (A) e moléculas relacionadas à via regulada por Irgm1 (B) em hamsters a 30, 60, 120 e 150 dias de infecção.

- Sobreposição de redes

Uma rede de sobreposição de moléculas diferencialmente expressas na cinética da avaliação pode ser observada nas figuras 28, 29, 30 e 31. Algumas dessas moléculas já foram exploradas nos resultados anteriores (figuras 23 a 27). Assim, nesta seção destacam-se algumas moléculas adicionais, com expressão diferencial ao longo da cinética: DLK1, com alta expressão a 30dpi (vermelho, figura 27) e expressão reduzida a 150dpi (verde, figura 31); Arg1 e Idol, com aumento de expressão em 60, 120 e 150dpi.

Figura 28: Rede de interação de moléculas a 30 dias de infecção. Cinza: expressão não diferencial; vermelho: alta expressão; verde: baixa expressão; linha pontilhada: interação indireta; linha contínua: interação direta. Circulado em preto: delta-like-1 (DLK1).

Figura 29: Rede de interação de moléculas a 60 dias de infecção. Cinza: expressão não diferencial; vermelho: alta expressão; verde: baixa expressão; linha pontilhada: interação indireta; linha contínua: interação direta. Circulados em preto: arginase 1 (Arg1) e indoleamine 2,3-deoxygenase (Ido1).

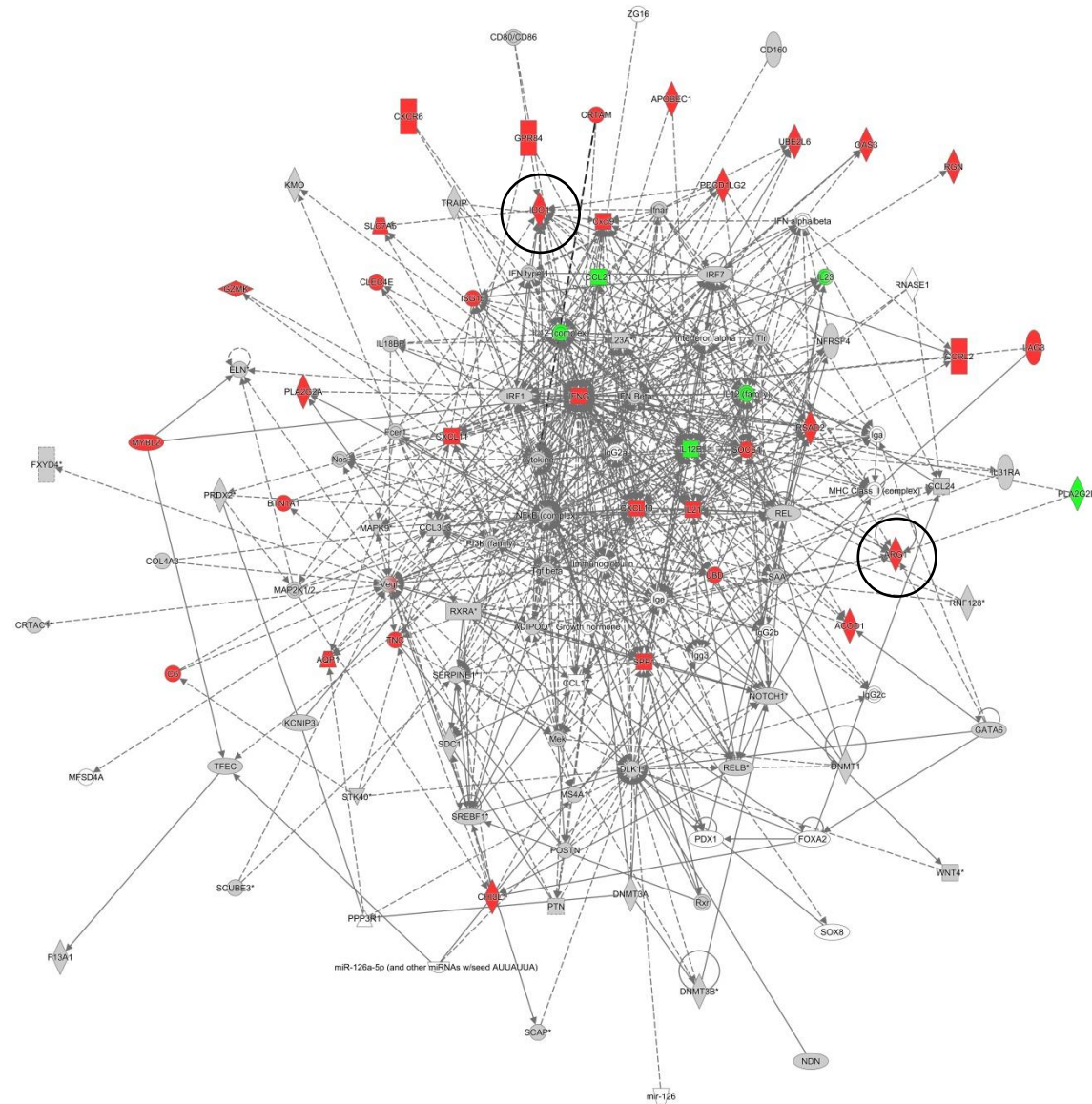


Figura 30: Rede de interação de moléculas a 120 dias de infecção. Cinza: expressão não diferencial; vermelho: alta expressão; verde: baixa expressão; linha pontilhada: interação indireta; linha contínua: interação direta. Circulados em preto: arginase 1 (Arg1) e indoleamine 2,3-deoxygenase (Ido1).

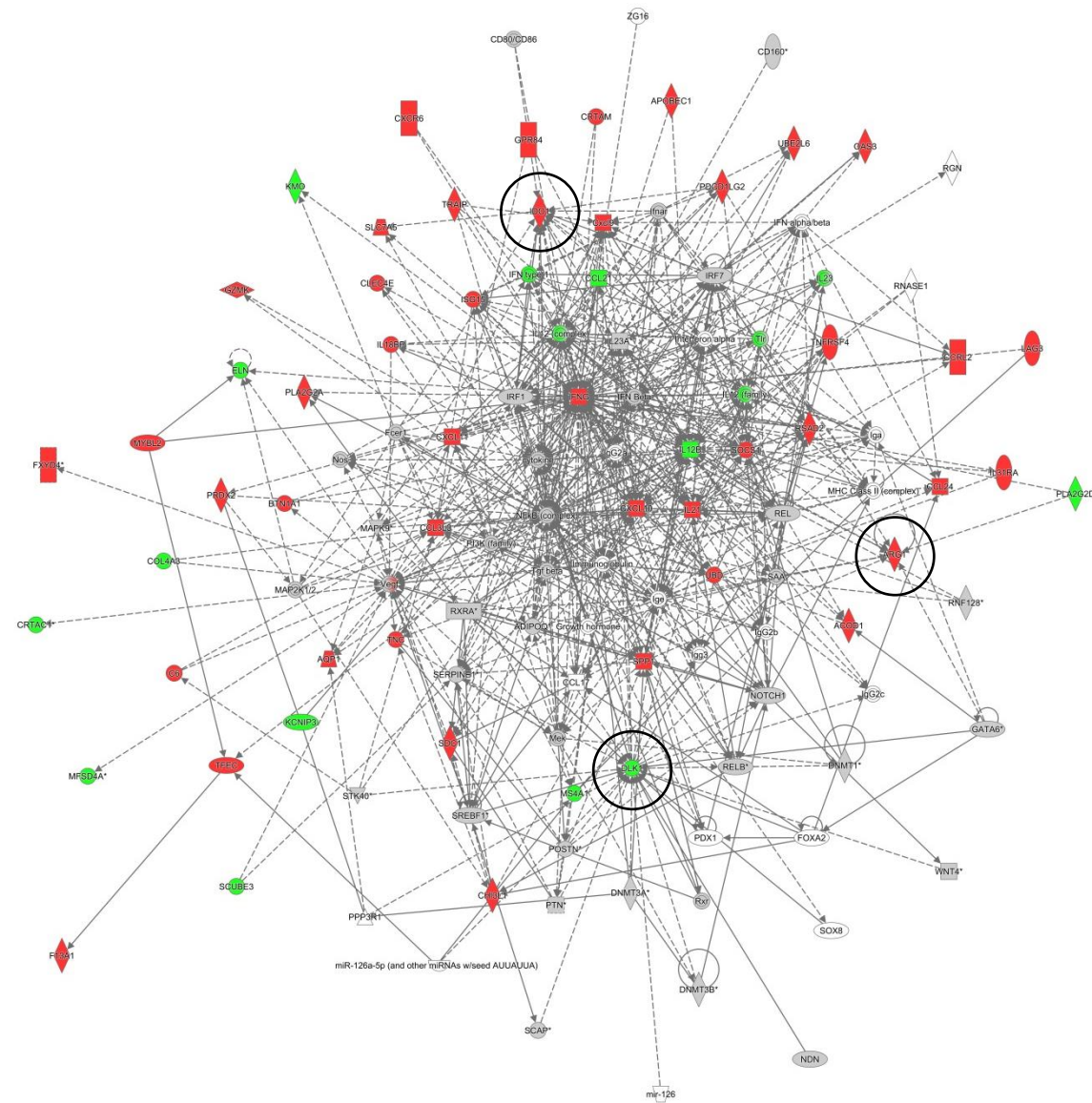


Figura 31: Rede de interação de moléculas a 150 dias de infecção. Cinza: expressão não diferencial; vermelho: alta expressão; verde: baixa expressão; linha pontilhada: interação indireta; linha contínua: interação direta. Circulados em preto: arginase 1 (Arg1), indoleamine 2,3-deoxygenase (Ido1) e delta-like-1 (DLK1).

- Vias canônicas

Dentre as principais vias canônicas encontradas (figura 32, A), regulação de ciclo celular e ciclinas apresenta uma regulação consistente e diferencial de moléculas ao longo da cinética. As moléculas orquestradas nesta via canônica foram exploradas na figura 32, B.

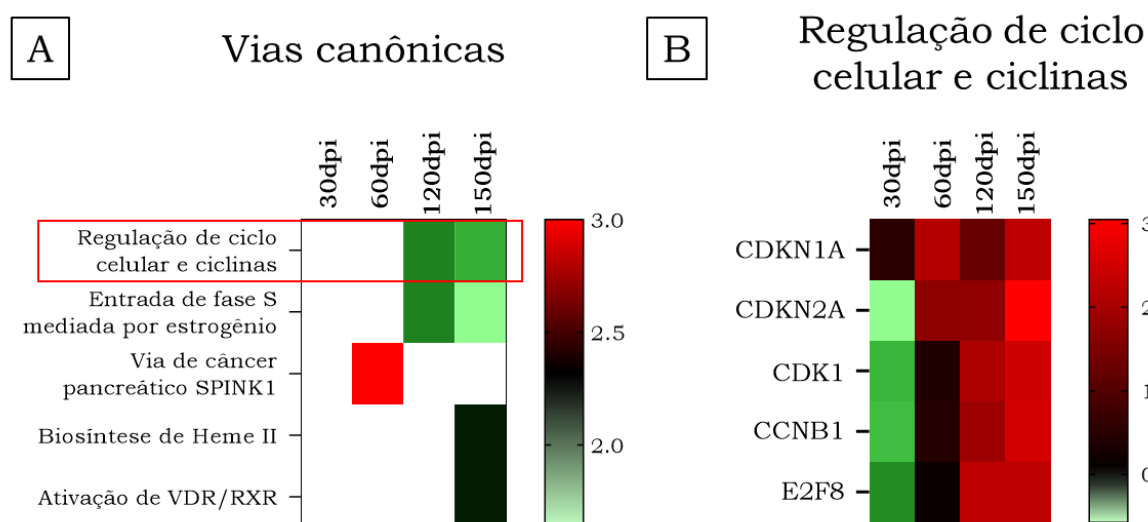


Figura 32: Heatmaps de moléculas associadas a vias canônicas diferencialmente expressas ao longo da cinética. Vias associadas a vias canônicas (A) e moléculas relacionadas à regulação de ciclo celular e ciclinas (B) em hamsters a 30, 60, 120 e 150 dias de infecção.

- Enriquecimento supervisionado de redes

Foi construída uma lista de moléculas previamente associadas à desorganização da PB do baço e estimuladas interações entre essas moléculas. Em seguida, de maneira não supervisionada e baseada em parâmetros estatísticos, foram incluídas 20 moléculas que se comunicam com as moléculas previamente selecionadas (vide 6.1.8). Desta forma, é possível observar nas figuras 33, 34, 35 e 36 a rede de interação entre genes que contribuem com a desorganização. Destaca-se especialmente como CXCL13, CCR5, CCL19, CCR6, CCR7 e LTA estão sendo regulados por CDKN2A. Ocorre aumento gradual de expressão de CDKN2A e concomitante inibição dessas moléculas na progressão da LV. CDKN2A foi identificada previamente através de análise não supervisionada como molécula efetora na via canônica de regulação de ciclinas e ciclo celular (figura 32, B).

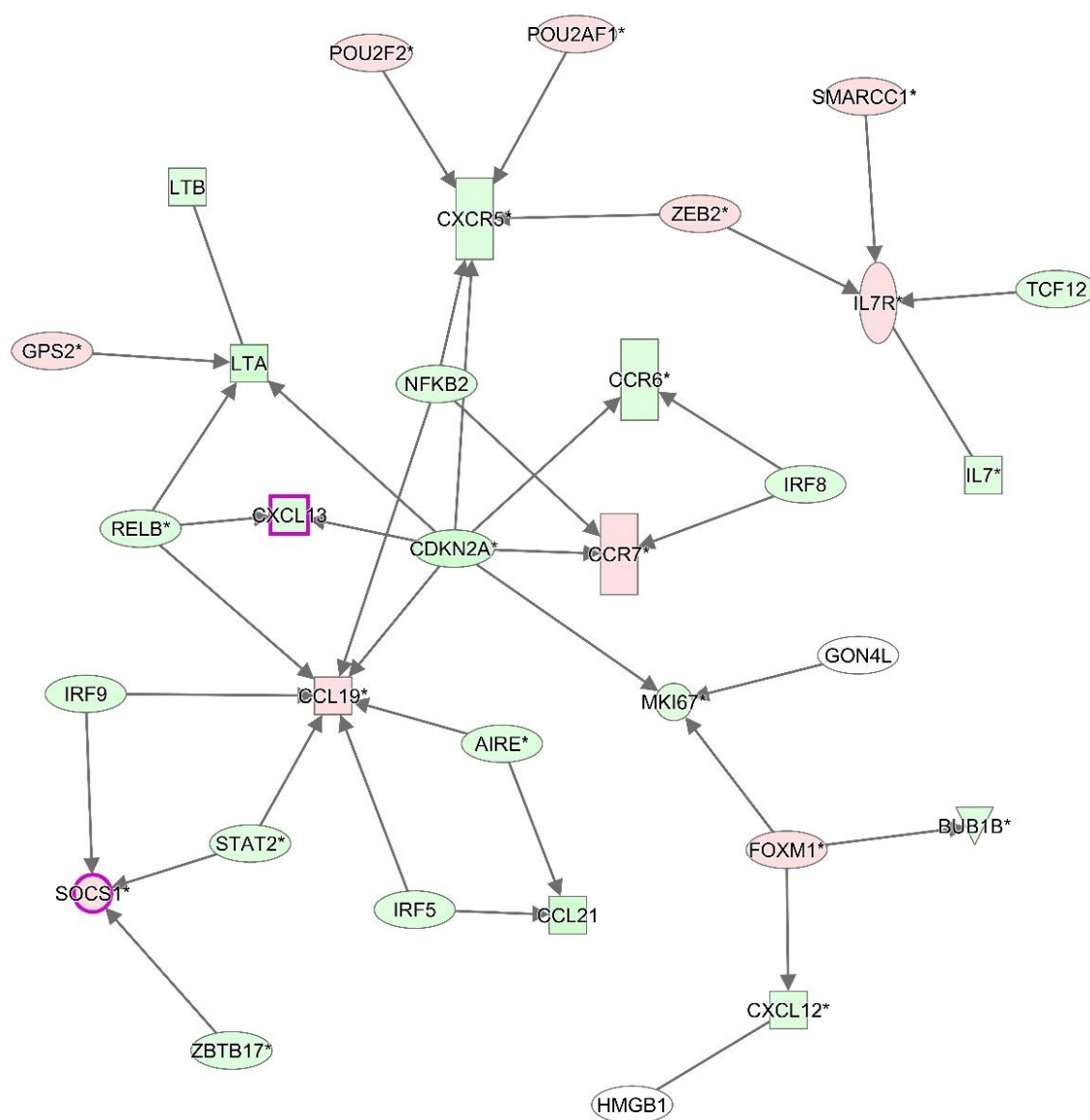


Figura 33: Rede de interação de moléculas associadas à desorganização da polpa branca do baço a 30 dias de infecção. Vermelho: alta expressão; verde: baixa expressão. Aumento da intensidade das cores indica maior diferença de expressão.

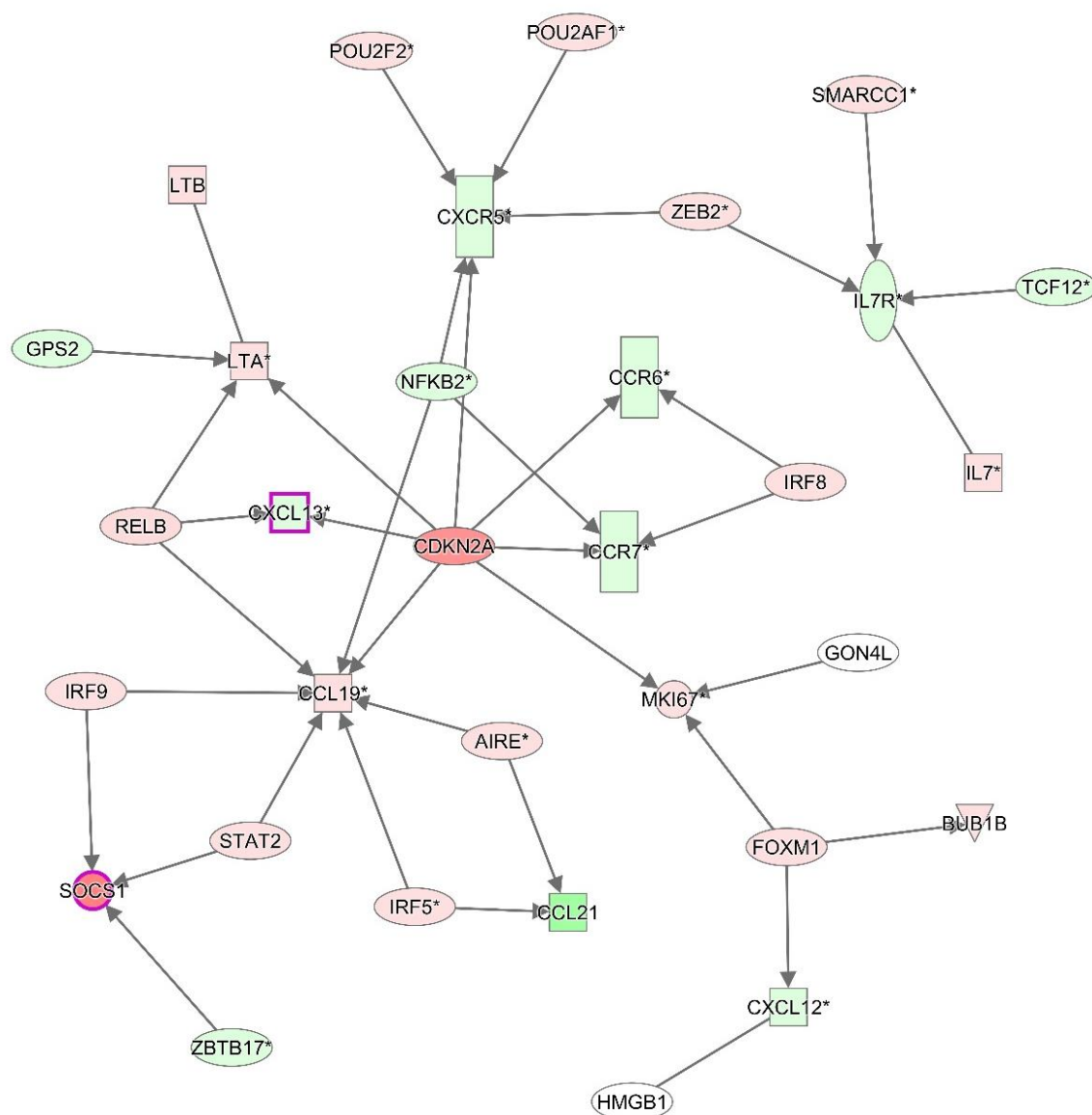


Figura 34: Rede de interação de moléculas associadas à desorganização da polpa branca do baço a 60 dias de infecção. Vermelho: alta expressão; verde: baixa expressão. Aumento da intensidade das cores indica maior diferença de expressão.

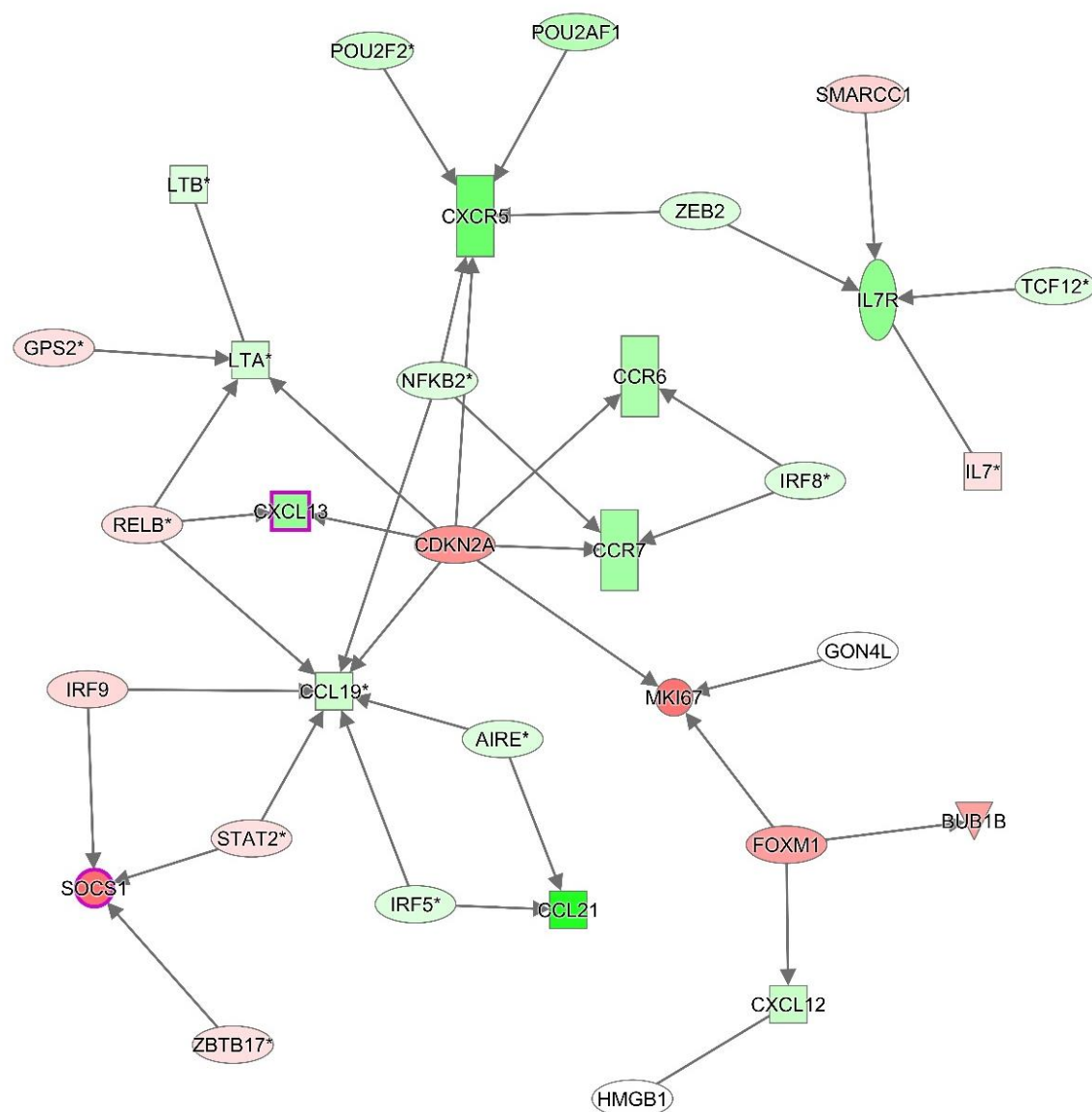


Figura 35: Rede de interação de moléculas associadas à desorganização da polpa branca do baço a 120 dias de infecção. Vermelho: alta expressão; verde: baixa expressão. Aumento da intensidade das cores indica maior diferença de expressão.

6.3 DISCUSSÃO

Neste trabalho utilizamos modelos experimentais para avaliar as alterações sequenciais do baço no curso da LV. Hamsters desenvolvem doença crônica grave, com alterações clinicopatológicas semelhantes à LV descrita em seres humanos e cães, que acompanham uma regulação sequencial por transcritos diferencialmente expressos no baço.

Nosso grupo vem realizando observações acerca do envolvimento do baço na progressão da LV (HERMIDA et al., 2018). Sabemos que o tecido linfóide sofre mudanças conformacionais durante a LV, e que a profunda desorganização da polpa branca do baço está associada à forma clínica mais grave da doença (SANTANA et al., 2008; LIMA et al., 2014). Pouco sabemos, contudo, qual a sequência de eventos e mecanismos potencialmente envolvidos nesse remodelamento tecidual. Nosso primeiro objetivo foi, portanto, definir um modelo de infecção para indução de forma grave da LV com repercussão na organização estrutural esplênica.

Para reproduzir experimentalmente a desorganização do baço como visto na infecção natural, a forma morfológica de *L. infantum*, inóculo e via tem influência no resultado. É sabido que a fase estacionária de crescimento de *Leishmania* em cultura é altamente virulenta com a maior porcentagem da forma metacíclica (infectante) do parasito (DA SILVA, SACKS, 1987). A inoculação intracardíaca compromete a resposta proliferativa de células T tanto a um mitógeno quanto a um antígeno de *Leishmania* (RODRIGUES, SILVA, CAMPOS-NETO, 1992), enquanto a inoculação subcutânea induz uma resposta inflamatória tanto pelo parasito como pelo veículo de injeção (GIFAWESSEN; FARRELL, 1989; STREIT et al., 2001). Um estudo piloto realizado utilizando promastigotas metacíclicas inoculadas por via intradérmica concorda com esses estudos por mostrar uma infecção branda e doença subclínica. A escolha da via intraperitoneal se baseou na estimativa de que 10% dos parasitos inoculados são drenados pelos linfonodos paratímicos e chegam ao baço por via sanguínea ainda vivos (HERMIDA, 2007; 2013). Estima-se que a morte de parasitos injetados por vias cardíaca ou intravenosa libera rapidamente uma grande quantidade de

antígeno em direção ao baço, o que poderia por si só induzir alterações estruturais do órgão (VAN ZANDBERGEN et al. 2006). Com a injeção intraperitoneal em hamster, reproduzimos a desorganização do baço de maneira sequencial e similar como relatado por Veress e colaboradores (1983) (figura 11).

A infecção experimental para estudo da LV é amplamente relatada. Utilizando hamsters, Veress e colaboradores (1977), observaram hiperplasia de folículos linfoides evoluindo para atrofia no ponto mais tardio da evolução da doença. Esta sequência de alterações morfológicas se reproduz no presente trabalho: os folículos linfoides aparecem com tamanho normal nos pontos mais precoces da cinética de avaliação, fase em que todos os hamsters apresentam baço organizado (tabela 2). A 120 dias de infecção, o aumento significativo do tamanho dos folículos caracteriza hiperplasia, evoluindo para atrofia no ponto mais tardio da infecção (150 dpi). A associação de desorganização da PB do baço e infecção por *Leishmania* com as formas graves da doença havia sido descrita por nosso grupo e corroborado por outros (DA SILVA et al., 2018; DE PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015; LIMA et al., 2014; SANTANA et al., 2008). Estes trabalhos mostram que cães naturalmente infectados apresentam redução do tamanho dos folículos linfoides, com alterações na quantidade de subpopulações celulares, expressão de citocinas e metaloproteinases e depósitos de colágeno. Estas observações foram, no entanto, realizadas de maneira circunstancial e em condições que não favorecem uma relação causal. Essas alterações são corroboradas neste trabalho e são elucidadas sob alguns mecanismos envolvidos na desorganização do baço.

Em hamsters, observamos esplenomegalia nos estágios mais avançados da doença, em que uma fração importante apresenta desorganização do tecido linfóide esplênico e infecção ativa (figura 10). Em cães naturalmente infectados, Lima e colaboradores (2014) associaram o perfil clínico mais grave com a presença de infecção ativa, evidenciada por cultura positiva para *L. infantum* no baço, e com a desorganização do tecido linfóide esplênico. De fato, ocorre menor proporção de PB por área total do baço nos dois últimos pontos de avaliação, associados à debilitação do

estado geral dos hamsters. A manifestação clínica de LV foi mais evidente nesse mesmo período, com perda de peso progressiva, esplenomegalia e maior número e intensidade de sinais clínicos (figura 8). Esse conjunto de dados confirma o exposto por Melby e colaboradores (2001) que hamsters desenvolvem LV sistêmica, mimetizando o padrão da doença como observada em seres humanos e cães. Periesplenite esteve presente em todos os hamsters infectados, sendo este também um achado frequente em cães infectados em uma área endêmica para LV (SANTANA et al., 2008). A formação de granulomas pequenos e pouco organizados sugere baixa capacidade de clearance do parasito no baço. Na verdade, a presença de granulomas em baço de hamsters já foi associada a um perfil de susceptibilidade (ENGWERDA; ATO; KAYE, 2004). Apesar de alterações histopatológicas refletirem, em parte, na apresentação clínica, Ashwin e colaboradores (2018) chamam à atenção que demais fatores metabólicos, imunes e fisiológicos ainda precisam ser explorados para melhor compreensão da LV. Nesse sentido, a análise do transcriptoma pode fornecer informações integradas de muitos processos biológicos. É uma ferramenta que permite a observação de um amplo espectro de eventos sistêmicos, de maneira confiável e não enviesada (ASHWIN et al., 2018).

Mostramos que a dinâmica de alterações histológicas no baço acompanha a intensidade de número de interações transcriptômicas ao longo da cinética da infecção (figura 22). O número de transcritos diferencialmente expressos triplica de 30 e 60 para 120 e 150 dias após a infecção. Com o objetivo de reduzir ruído na análise e de identificar redes consistentemente reguladas no conjunto de dados, realizamos uma rigorosa curadoria do transcriptoma baseada em parâmetros estatísticos de consistência, similar ao utilizado por Ashwin e colaboradores (2018) em avaliação do transcriptoma de camundongos com LV. Com esta conduta conservadora, produzimos neste trabalho uma rica base de dados que permite diversas abordagens de análise. As redes de transcritos observadas mostram padrões sequenciais associados à cinética de avaliação a 30, 60, 120 e 150 dias.

Apenas duas moléculas foram consistentemente reguladas a 30 dias da infecção. No entanto, ao realizar a sobreposição de transcritos regulados em comum ao longo da cinética, somente uma dessas moléculas, a DLK1, aparece com expressão significativa, evidenciando sua robustez na sinalização e justificando sua discussão neste trabalho. O gene Delta-like-1 (DLK1) é membro de família de fatores de crescimentos que determinam a diferenciação celular e que está altamente expresso em células hematopoéticas CD34⁺ (SAKAJIRI et al., 2005). DLK1 tem sido relacionado à influência em interações celulares e está envolvido na diferenciação e expansão de linfócitos B. A ausência de expressão de DLK em camudongos DLK1^{-/-} levou à diminuição de células B foliculares, aumento de células B na ZM do baço e maior produção de IgG1 (RAGHUNANDAN et al., 2008). A alta expressão desta molécula a 30 dias da infecção sugere uma modulação em resposta ao estímulo pela infecção por *Leishmania* (figura 28). Essa hipótese se sustenta pela redução de células B foliculares, observada em baços desorganizados de cães com LV (SILVA et al., 2014). Esses cães apresentam maior número de plasmócitos produtores de IgG na PV, associado a hipergamaglobulinemia (SILVA-O'HARE et al., 2016). Essas são alterações compatíveis com a fase tardia da doença, quando neste trabalho observamos DLK1 com expressão reduzida a 150 dias da infecção (figura 31). A regulação sequencial de ativação a 30 dpi e inibição a 150 dpi e as alterações morfológicas relatadas na literatura sugerem uma possível diferenciação anômala de células B em plasmócitos na progressão da doença, caracterizando esta molécula com potencial de estudo de via de sinalização.

Arginase 1 (Arg1) aparece com alta expressão a 60dpi e se mantém na cinética da infecção (figura 29). A expressão de Arg1 é induzida em macrófagos por *Leishmania*, que compete com iNOS por arginina e produz nutrientes que favorecem a sobrevivência dos parasitos, como uréia, bem como diminui a produção de óxido nítrico parasitotóxico (GAUR et al., 2007). Assim, a expressão de Arg1 pode estar relacionada com o sucesso no estabelecimento da infecção e pode ser um mecanismo de progressão da fase da infecção a 30 para 60 dias. A 60 dias da infecção, observamos

mecanismos centralizados na função de movimento de leucócitos e resposta inflamatória (figuras 23 e 26). Kong e colaboradores (2017) mostraram, por estudo transcriptômico, um ambiente altamente inflamatório em baço de hamsters infectados por *L. donovani*. O recrutamento de granulócitos e quimiotaxia de linfócitos corroboram com fase de inflamação a 60 dias (figura 23), que ao aparecer diferencialmente regulada em hamsters infectados, reforça a resposta do baço contra a infecção por *L. infantum*. Este período marca também a fase em que a via regulada por IFN- γ aparece com alta expressão, que se mantém na progressão da doença (figura 27). Esta é uma citocina pró-inflamatória, produzida por linfócitos T e associada ao clearance do parasito através de ativação de macrófagos (ROSSI; FASEL, 2018). Nesta base de dados, mostramos que importantes transcritos que são mediados por IFN- γ aparecem regulados em direção ao favorecimento da infecção por *Leishmania*.

O transcrito indoleamine 2,3-deoxygenase (Ido1) é induzido por IFN- γ e aparece com alta expressão a 60dpi (figura 29). Este gene foi associado à polarização de macrófagos M2 em hamsters com LV (KONG et al., 2017). Em infecção por *Leishmania*, Ido1 mostra ainda função de supressão de imunidade inata por estimulação regulatória de células dendríticas, e adaptativa através de geração de linfócitos T regulatórios (DONOVAN et al., 2012; MAKALA et al., 2011). A função proliferativa de células dendríticas foi restaurada após inibição de Ido1 (DONOVAN et al., 2012). É possível que a expressão de Ido1 ocorra por estímulo de *Leishmania* de modo a favorecer sua sobrevivência, sendo um biomarcador proposto de progressão de LV (GANGNEUX et al., 2013).

Irgm1 (*Immune-related GTPase*) é mediada por IFN- γ e está relacionada à eliminação de infecção por protozoários e bactérias pela regulação de autofagia em macrófagos. No presente estudo, esta foi a via de sinalização regulatória mais consistentemente expressa na base de dados, mostrando-se inibida ao longo da cinética (figura 27). Camundongos Irgm1^{-/-} infectados por *L. donovani* apresentaram maior susceptibilidade à infecção, culminando na falha de recrutamento de células inflamatórias e observação de alto parasitismo no fígado (MURRAY et al., 2015). Neste trabalho, ao explorar as

moléculas orquestradas nesta via, observamos uma assinatura de ativação de genes relacionados principalmente à quimiotaxia de leucócitos, ativação de macrófagos e proliferação de células. No baço, *Irgm1* é requerida para desempenho apropriado de função de macrófagos M1 (XU et al., 2017), mostrando que sua inibição falha em controlar a infecção ainda que ocorra o recrutamento de células competentes.

A migração de leucócitos aparece regulado por ativação de moléculas como IFN- γ , CXCL11, CCL5 e *Ido1* (figura 26). Esses genes foram associados a polarização mista de macrófagos M1 e M2 em hamsters com LV, que sugere disfunção na função efetora de macrófagos e possivelmente favorecendo o estabelecimento da infecção (KONG et al., 2017). Este perfil de ambas as respostas Th1 e Th2 já foi relatado na LV progressiva em hamster (ESPITIA et al., 2014). Pearce e colaboradores (2002) sugerem que este perfil fenotípico misto de macrófagos M1 e M2 e perfil Th2 está presente na transição da fase aguda para a fase crônica.

Com essas considerações, o ponto de 120 dias após a injeção pode estar associado à fase crônica da doença no período avaliado neste trabalho. Esta transição também pode ser observada por avaliação de redes associadas a doenças e funções, quando de maneira não supervisionada, sugere que função de quimiotaxia de linfócitos T é consistentemente regulada. Esta via se torna inibida a partir de 120 dpi, fase em que observamos em nível tecidual que ocorre moderada desorganização do tecido linfóide esplênico. Observamos principalmente assinatura de superexpressão de genes relacionados ao recrutamento de granulócitos, como também pode ser verificado na figura de rede de interações moleculares a 120dpi. No entanto, ocorre menor expressão de moléculas como *IL12b*, que está associada a polarização de resposta Th1 e favorável para resistência contra patógenos no baço (REEME; MILLER; ROBINSON, 2013); e *CCL21*, quimiocina importante na retenção de linfócitos T na zona periarteriolar da PB do baço (MEBIUS; KRAAL, 2005).

Quantidade de íons de metal aparece regulada a 120 dias da infecção, que perdura e inclui maior número de moléculas associadas a este fenômeno a 150 dias da infecção. É sabido que íons de metal desempenham

papel fundamental na homeostase celular por participarem de processos essenciais para crescimento e proliferação celular, respiração celular, regulação transcriptômica, reações enzimáticas e funções imunes adequadas (DEAN; QIN; PALMER, 2012). A esplenomegalia observada nessa fase da doença pode estar associada ao hiperesplenismo, que é uma síndrome caracterizada por anemia, trombocitopenia e leucopenia. Neste contexto, o baço se torna um sítio de retenção de hemácias. Esta pode ser uma possível causa do aumento da quantidade de íons de metal, pelo aumento do estoque de ferro proveniente de hemoglobina acumulada no baço. Essa hipótese se sustenta ainda pela observação de doença hemorrágica na rede regulatória, que ocorre a 150 dias da infecção.

Patógenos intracelulares necessitam de metais de transição para sua sobrevivência, crescimento e atividades metabólicas (SAINI et al., 2017). Como exposto anteriormente, a oferta de ferro no baço pode ser favorável à persistência de *Leishmania*, sendo a ferritina um dos produtos de ferro como elemento requerido para seu metabolismo (BORGES; VANNIER-SANTOS; DE SOUZA, 1998). *Leishmania* é capaz de induzir mecanismos de clivagem oxidativa para obtenção de íon ferroso por heme-oxigenase (LUZ et al., 2012). Zinco é um micronutriente essencial para a sobrevivência da *Leishmania* e consiste de um importante componente de virulência em cepas resistentes ao tratamento (SAINI et al., 2017). Estima-se que o mecanismo de ação leishmanicida de antimoniais pentavalentes ocorra por redução de zinco em células do hospedeiro, pela inibição de gene essencial para sua expressão (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009). Diante do exposto, é possível que o acúmulo de íons de metal na fase crônica da doença esteja portanto relacionado à persistência da *L. infantum* nesse estágio da infecção.

A 150 dias da infecção ocorre desorganização da PB do baço. Os eventos morfológicos associados a este fenômeno foram revisados por Hermida e colaboradores (2018) em que chamam à atenção para alterações de número e distribuição de populações celulares. A PB sofre alterações conformacionais em seus microambientes. Na PALS, há redução de linfócitos T CD3⁺ (SILVA et al., 2012) e apoptose de linfócitos T CD4⁺ (LIMA et al., 2012) em cães que apresentam baço desorganizado. No presente

trabalho, mostramos que a menor expressão de CCL21 atua como mediador químico na desorganização da PALS em hamsters infectados a 150dpi, em uma inibição que inicia no ponto de avaliação anterior (120dpi) quando os hamsters apresentam o baço moderadamente desorganizado. Em uma análise supervisionada, realizamos uma expansão da rede de comunicação informando moléculas previamente conhecidas como participantes na desorganização da PB do baço. Vemos quimiocinas e receptores associados ao recrutamento de células na PALS com expressão reduzida, como CCL19, e CCR7, ligante de ambas CCL19 e CCL21. LT α é produzida por células estromais e é crucial na formação da PB do baço (MEBIUS; KRAAL, 2005), e aparece com redução progressiva em animais infectados. Em folículos linfoides, a redução de densidade de células B foi acompanhada pela redução de CXCL13 em cães com LV e baço desorganizado (SILVA et al., 2012). Observamos expressão reduzida de CXCL13 e seu receptor CXCR5 ao longo da cinética de infecção. Em conjunto, esses transcritos mostram não somente uma regulação gênica na desorganização do baço na fase tardia da doença, mas como regulação por uma molécula em comum.

De maneira não supervisionada, CDKN2A aparece centralmente na regulação através do enriquecimento das vias de interação entre as moléculas adicionadas de maneira supervisionada. Cyclin dependent kinase inibitor 2 A – CDKN2A – transcreve informações para produções de proteínas como p16(INK4A) e p14(ARF), ambas envolvidas na inibição de ciclo celular na fase G1 (CÁNEPA et al., 2007). Ao longo da cinética, a expressão de CDKN2A passa de um estado reduzido (30 dpi) para aumentado a 60, 120 e 150 dpi. Concomitantemente, as quimiocinas e receptores associados com desorganização (CXCL13, CCR5, CCL19, CCR6, CCR7 e LTA) passam de um estado sem expressão diferencialmente significativa a 30dpi para uma redução ainda mais evidente e significativa a 60, 120 e 150 dpi. Essas observações mostram um papel regulatório da CDKN2A. Esta é uma molécula que já vem sendo amplamente investigada como biomarcadora de alguns tipos de câncer (CÁNEPA et al., 2007), sendo uma via com potencial de investigação da progressão da LV na busca por um marcador precoce de desfecho grave.

Em suma, o baço apresenta perfil transcriptômico diverso, associado com as diferentes fases da doença. As alterações observadas em nível de transcrito e tecidual denotam papel central no estabelecimento da infecção e progressão da doença, concordando com observações fenomenológicas prévias que associam o perfil grave da LV com a desorganização do baço. Realizamos adicionalmente um estudo histopatológico de órgãos importantes na patogênese da LV, com o objetivo de contribuir na compreensão do hamster como modelo experimental da doença.

Em fígado de cães naturalmente infectados, marcadores histológicos foram associados a perfis de susceptibilidade ou resistência (LIMA, 2017). A presença de granulomas e inflamação portal esteve associada à maior carga parasitária nesses animais. No presente trabalho, essas alterações foram observadas nas fases mais tardias da infecção. O padrão de apresentação de granulomas no fígado é discordante do observado em baço: granulomas pequenos, porém frequentes e bem organizados, se distribuem pelo parênquima e espaço porta. Ocorrem inclusões lamelares calcificadas em áreas de morte celular, denominadas Schaumann bodies, que são achados comuns em hamsters e já foi reportado na LV (LAURENTI et al., 1990). Adicionalmente, não observamos diferenças estatisticamente significantes na formação de agregados leucocitários intrassinusoidais e hiperplasia ou hipertrofia de célula de Kupffer, como havia sido descrito em cães por Lima (2017) como marcadores de resistência e controle da infecção. Esses achados mostram um perfil de resposta inefetiva em fígado de hamsters, denotando susceptibilidade à doença que refletem no quadro clínico.

Granulomas foram raros em demais órgãos, mas observados em hamsters infectados na região paracortical do linfonodo, no septo pulmonar e na cerosa do intestino. A ocorrência de infiltrado inflamatório no septo e alvéolos pulmonares foram discretas. As alterações histopatológicas nos rins foram discretas e inespecíficas, diferente do observado por Veress e colaboradores (1983) que encontraram depósitos amiloides nos glomérulos. Em suma, as alterações nos órgãos-alvo da LV estudados neste trabalho se concentram principalmente em baço e fígado, sendo os principais órgãos afetados no curso da infecção (BADARÓ et al., 1986).

7. CAPÍTULO II - Avaliação sequencial das alterações de fenótipo celular do baço no curso da LV – camundongo (objetivo específico #2)

Foi demonstrado no Capítulo I desta tese que a infecção com hamsters 1×10^7 *L. infantum*/mL por via intraperitoneal induz desestruturação do tecido linfóide esplênico, associada à LV grave com mudanças significativas no perfil transcriptômico. No entanto, a caracterização imunofenotípica constitui uma limitação do hamster como modelo devido à carência de anticorpos e reagentes disponíveis para a espécie. Para contornar esta limitação, incluímos camundongos BALB/c seguindo as mesmas condições de infecção e acompanhamento: 30, 60, (um ponto adicional de 90 dias) 120 e 150 dias (resultados: Apêndice B).

A linhagem BALB/c de camundongos é susceptível à infecção por *L. infantum* e *L. donovani*, cuja replicação do parasito é observada nas primeiras semanas de inoculação (BLACKWELL et al., 1989). Devido à ampla disponibilidade de anticorpos e reagentes, este tem sido um modelo extensivamente utilizado para estudo da LV. Realizamos nesta parte do trabalho uma caracterização das populações celulares do baço durante a progressão da doença por citometria de fluxo. Após a obtenção dos resultados desse experimento, verificou-se a necessidade de refinar a metodologia de maneira a atender ao objetivo. Assim, foi realizada uma nova estratégia de infecção, dez vezes maior (1×10^8 *L. infantum*/mL). Foram realizados os seguintes ensaios adicionais: histo-citometria, imunofenotipagem de células estromais do baço e pesquisa de citocinas pro e antiinflamatórias.

Esperamos com esta abordagem, realizar um mapeamento das alterações sequenciais do tecido linfóide esplênico nos dois modelos experimentais de LV mais utilizados. A comparação entre os perfis transcriptômico e fenotípico na observação do fenômeno da desorganização do tecido linfóide pode contribuir com a compreensão dos mecanismos de progressão e agravamento da LV.

7.1 METODOLOGIA

7.1.1 Animais

Foram utilizados 80 camundongos da linhagem BALB/c (*Mus musculus*), com 6-8 semanas de idade.

7.1.2 Injeção

Duas estratégias de infecção foram utilizadas para determinados ensaios: foram ressuspensas em uma concentração de **a.** 1×10^7 parasitos/mL (citometria de fluxo) – (Resultados apresentados no Apêndice B); ou **b.** 1×10^8 parasitos/mL (microscopia de fluorescência, histo-citometria, citometria de fluxo e *Cytometry Bead Array* – CBA). Animais do grupo infectado foram inoculados com 1mL dessa suspensão parasitária. Animais do grupo controle foram injetados com 1mL de solução salina. Todos os animais foram injetados por via intraperitoneal, no quadrante abdominal inferior esquerdo.

7.1.3 Abordagem experimental

Os camundongos foram acompanhados semanalmente com referência a parâmetros clínicos. Para examinar o curso das alterações esplênicas, os camundongos foram acompanhados por **a.** 30, 60, 90, 120 e 150 (Apêndice B) e **b.** 30, 60 e 90 dias pós-injeção para estudo histológico e fenotípico de células e citocinas do baço (figura 37).

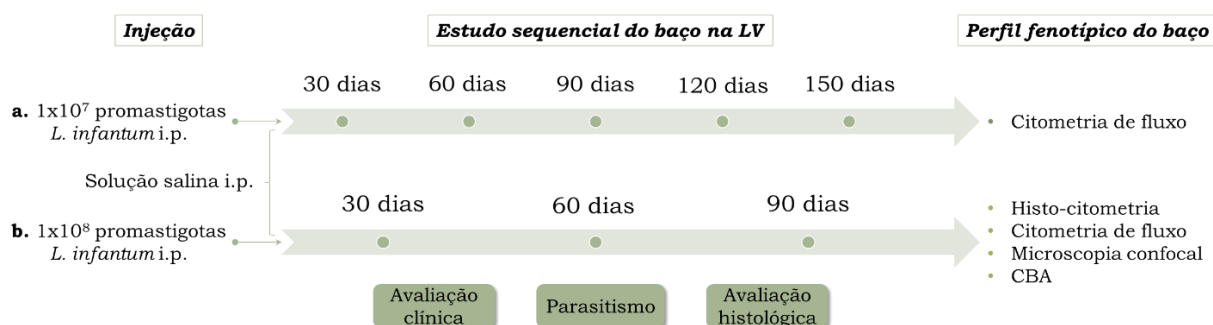


Figura 37: Abordagem experimental do estudo sequencial de leishmaniose visceral em camundongos. Ilustração esquematizando a estratégia de injeção de camundongos dos grupos controle e infectado. Acompanhamento com referência a parâmetros clínicos, parasitismo e histológicos e coleta de baço para avaliação fenotípica de esplenócitos em 30, 60, 90, 120 e 150 dias após a injeção.

7.1.4 Avaliação histológica

Os animais foram submetidos a necropsia com coleta de fragmentos do baço, fígado e linfonodo paratímico e analisados conforme descrito em 5.7.

7.1.5 Processamento do baço

O baço foi coletado em HBSS e medidas de peso e dimensões foram estimadas. Foram realizados quatro fragmentos com auxílio de bisturi estéril para processamento de imunofenotipagem de células do baço, histologia, qPCR e cultura para evidência de infecção por *Leishmania* (figura 38).

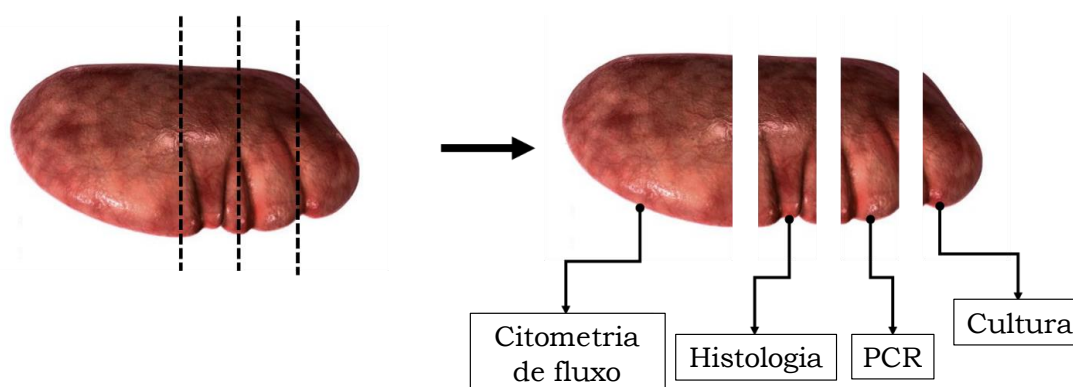


Figura 38: Processamento do baço para estudo sequencial da leishmaniose visceral em camundongos. Desenho esquemático ilustrando quatro fragmentos do baço para as múltiplas análises de citometria de fluxo, estudo histológico, qPCR para evidências de infecção por *L. infantum* e cultura para isolamento de *L. infantum*.

- Coleta de fragmento para citometria de fluxo

Um fragmento de baço macerado utilizando êmbolo de seringa estéril em filtro de células de 70µm (BD Falcon), acoplado em tubo cônico de 50mL contendo 10mL de PBS 1x, para preparação das suspensões de células para imunofenotipagem de esplenócitos por citometria de fluxo.

7.1.6 Teste sorológico para *Leishmania*

Anticorpos anti-*Leishmania* serão detectados por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) conforme procedimento descrito (Dos-Santos et al. 2008). A atividade de anticorpos anti-*Leishmania* foi estimada no soro de camundongo (diluído 1:100) por ELISA utilizando antígeno solúvel de *L. infantum*.

7.1.7 Preparação das células para citometria de fluxo

O sedimento da suspensão de células do baço foi obtido por centrifugação a 1600rpm/5min/4°C e adicionado 2ml de solução de lise de hemácias 1x (BD 555899) pré-aquecida a 37°C e incubada por 2min em banho-maria a 37°C. Imediatamente depois, foi adicionado 30mL de PBS1x e centrifugado a 1600rpm/5min/4°C. O sedimento contendo as células foi ressuspenso em 1mL de PBS contendo 2% de BSA e 0,1% de azida e a viabilidade celular foi avaliada por coloração com trypan blue. Foram incluídas amostras com mortalidade celular inferior a 15%. Foi adicionado 1μl da solução estoque de corante de viabilidade celular (BD 564406) para cada mL de suspensão celular (1:1000) e incubado por 15min/T.A. As células foram lavadas duas vezes em 2mL de tampão FBS (BD 554656) e ressuspenso na concentração de 2×10^6 células/mL.

7.1.8 Imunofenotipagem de células do baço por citometria de fluxo

As suspensões de células foram incubadas em tampão FBS com 5% de soro de camundongo para bloqueio de reações não específicas. As células foram distribuídas 100μl da suspensão/poço na concentração de 2×10^6 células/mL. Os anticorpos foram diluídos em tampão FBS com 5% de soro de camundongo como descrito na tabela 5. Em seguida, as células foram incubadas por 20 minutos com os anticorpos (BD Biosciences) para os marcadores de interesse e seus respectivos isotipos controle. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com tampão FACS. Marcador de viabilidade celular conjugado a BV510 foi utilizado em todas as amostras (BD 564406). A aquisição das células em foi realizada por um citômetro de fluxo LSRFortessa usando o programa DIVA (BD, Becton–Dickinson, EUA), em aproximadamente 100 mil eventos por amostra. Para análise dos dados foi utilizado software FlowJo (Tree Star Inc, Califórnia, EUA).

Tabela 5: Lista de anticorpos conjugados e marcadores fenotípicos.

Tipo celular	Marcador	Fluorocromo	Catálogo	Diluição
Linfócitos	CD3	FITC	553061	1/100
	CD4	PE	553730	1/100
	CD8	APC	553035	1/400
	CD19	AL700	557958	1/200
Macrófagos	CD11b	FITC	01714D	1/100
	CD11c	BV421	565452	1/400
	F4/80	PE-Cy5	123112	1/100
Células dendríticas foliculares	CD11c	BV421	565452	1/400
	CD21/CD35	APC	558658	1/200
	CD23/FDC	BB515	564637	1/200
Plasmócitos	CD138	BV421	562610	1/400
	CD93	BB515	564700	1/200
	B220 (CD45)	PE	561087	1/200
	CD19	AL700	557958	1/200
	MHC-II (I-A/I-E)	BV605	563413	1/100
	CD11c	BV421	565452	1/400
Células dendríticas plasmocitoides	CD11b	FITC	01714D	1/100
	B220 (CD45)	PE	561087	1/200
	GR-1 LY6 C/G	BV605	563299	1/50

7.1.9 Estimulação de esplenócitos para avaliação de citocinas no baço

A obtenção de esplenócitos foi realizada conforme descrito em 4.2.1.10. Foram transferidos 5×10^6 células/poço em placa de 96 poços de fundo U em duplicada. A placa foi centrifugada a 2000xg/10segundos/4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi incubado com 100µl de antígeno solúvel de *L. infantum* (SLA) a 50µg/mL ou concanavalina A (ConA) a 35µl/mL em meio RPMI + 10% SFB. A placa foi incubada em estufa de CO₂ a 37°C por 48h. Em seguida, a placa foi centrifugada a 2000xg/10segundos/25°C e o sobrenadante coletado e armazenado a -20°C até o dia da análise. Ao fim do experimento, todas as amostras dos pontos

de 30, 60 e 90 dias foram adicionadas a uma placa de 96 poços e analisadas na mesma aquisição.

7.1.10 Avaliação de citocinas por citometria de fluxo

Kit inflamatório CBA (BD Biosciences) foi utilizado para mensuração da concentração de citocinas IL-6, IL-10, MCP-1, IFN, TNF, and IL-12p70 seguindo as instruções do fabricante. Utilizando placa de 96 poços, foram plaqueados 25µl de mix e 25µl da curva padrão de concentração (0 – 5000 pg/mL). Foram transferidos 25µl de amostras de esplenócitos estimulados com ConA ou SLA. Incubar por 2 horas T.A. com 25µl de reagente de detecção PE em todos os poços. Lavar e centrifugar a 1500rpm/5min/4°C. Descartar o sobrenadante e ressuspender as beads em 200µl de tampão de lavagem. A aquisição das beads foi feita por citômetro LSRFortessa (BD Biosciences). A análise foi realizada no software FlowJo (Tree Star Inc, Califórnia, EUA) e as concentrações das citocinas estimadas a partir da curva de calibração

7.1.11 Imunofenotipagem de células estromais no tecido esplênico por ensaio de imunofluorescência

Secções de baço de 4µm de espessura foram feitas a partir de fragmento de tecido criopreservado utilizando criostato. Todas as etapas a seguir foram realizadas à T.A. Os fragmentos foram coletados em lâminas negativamente carregadas e fixados em acetona por 10 minutos. Os tecidos foram bloqueados para ligações inespecíficas utilizando 10% de soro normal de camundongo por 15 minutos. As secções foram então incubadas com anticorpo primário de sobrenadante anti-camundongo ER-TR9 para imunofenotipagem de célula estromal marginal (1:10 em PBS + 2% SFB) por 30 minutos. As lâminas foram lavadas duas vezes com PBS 1X e então incubadas com anticorpo secundário anti-rato AlexaFluor 647 (1:400 em PBS + 2% SFB). Após duas lavagens com PBS 1X, as secções foram bloqueadas para reações inespecíficas ao anticorpo anti-rato, utilizando 10% de soro normal de rato por 15 minutos. Foi utilizado anticorpo primário sobrenadante anti-camundongo gp38 para imunofenotipagem de célula estromal fibroblástica reticular por 30 minutos. Após duas lavagens com

PBS 1X, foi realizada incubação com anticorpo secundário anti-syrian hamster AlexaFluor 594 (1:400 em PBS + 2% SFB). As secções foram lavadas duas vezes e então incubadas com coquetel de anticorpos por 30 minutos: Célula B B220/CD45R AlexaFluor 488 (1:800); célula estromal marginal reticular MAdCAM AlexaFluor 555 (1:400); célula dendrítica folicular CD35/8C12 BV510 (1:400). Controles negativos foram adicionados por lâmina e tratados apenas com anticorpos não conjugados e tampão de incubação. As lâminas foram lavadas em PBS 1X e finalizadas com meio de montagem.

7.1.12 Imunofenotipagem de células linfoides inatas no tecido esplênico por histo-citometria

Secções de 4µm de espessura a partir de fragmento de baço criopreservado foram feitas utilizando criostato. Todas as etapas a seguir foram feitas à T.A. As secções foram coletadas em lâminas negativamente carregadas e fixadas em acetona por 10 minutos. Os tecidos foram bloqueados para ligações inespecíficas utilizando 10% de soro normal de camundongo por 15 minutos. Após lavagem com PBS 1X, foi feita incubação com anticorpo primário IL-7R (1:1000 em PBS + 2% SFB) por 45 minutos. As secções foram incubadas com anticorpo secundário anti-rato AlexaFluor 594 (1:400 em PBS + 2% SFB + 10% soro normal de camundongo) por 30 minutos. Ligações inespecíficas para anticorpo de rato foram bloqueadas realizando uma incubação de 15 minutos com 10% de soro normal de rato. Em seguida, as secções foram incubadas por 30 minutos com CD4 AlexaFluor 488 (1:200) e um coquetel de anticorpos: CD11b APC (1:400, CD11c APC (1:400), B220 AlexaFluor 647 (1:100), CD3 AlexaFluor 647 (1:50); este coquetel de anticorpos possuem fluorocromos excitados pelo mesmo laser (594-633), detectados pelo mesmo filtro (Cy5) e emitidos na mesma faixa (660-665). Serão, portanto, a linhagem de seleção negativa. Células linfoides inatas serão avaliadas por dois fenótipos: CD11b/CD11c/B220/CD3(linhagem)-IL-7R⁺CD4⁺ ou Linhagem-IL-7R⁺CD4⁺. Controles negativos foram adicionados por lâmina e tratados apenas com anticorpos não conjugados e tampão de incubação. As lâminas foram

lavadas em PBS 1X, incubadas com corante nuclear DAPI (1:10.000) e finalizadas com meio de montagem.

7.1.13 Aquisição de imagens por microscopia confocal

Microscópio confocal Leica SP8 foi utilizado para aquisição das imagens, utilizando LASX software (Leica Microsystems). Foram adquiridas nove imagens adjacentes em aumento de 400x e feita uma junção (mosaico de nove fotos) para observação de uma maior área. Diferentes estratégias de aquisição foram feitas para os dois painéis de imunofenotipagem.

- Painel de células estromais

As imagens foram adquiridas em resolução de 1024x1024, tamanho de pixel 284 nm e em aproximadamente dez planos de 0,8 micras em cinco sequências (seq): Seq 1 – CD35 BV510 (magenta); Seq 2 – B220 AF488 (verde); Seq 3 – MAdCAM AF555 (amarelo); Seq 4 – gp38 unl + AF594 (vermelho); Seq 5 – ERTR-9 + AF647 (azul).

- Painel de células linfoides inatas

As imagens foram adquiridas em resolução de 2048x2048, tamanho de pixel 90,14 nm em aproximadamente 13 planos de 0,3 micras em quatro sequências: Seq 1 – DAPI (azul); Seq 2 – CD4 AF488 (verde); Seq 3 – IL-7R + Anti-rat 594 (vermelho); Seq 4 – Linhagem (CD11b/ CD11c APC, CD3 AF647, B220 AF647) cinza. Uma etapa adicional de preparação de imagens foi feita utilizando Huygens software (Scientific Volume Imaging), que corrige distorções e melhora a qualidade da imagem, num processo chamado deconvolução.

7.1.14 Análise de imagens de microscopia de fluorescência e histocitometria

Software Imaris (Oxford Instruments) foi utilizado para análise das imagens. A soma dos diferentes planos foi realizada e observada em um plano 3D para mensuração das células de interesse. Diferentes estratégias de análise foram feitas para os painéis de imunofenotipagem de células.

- Microscopia de fluorescência (painel de células estromais)

Foram mensuradas as intensidades absolutas por área representadas por cada marcador através do detalhamento de superfície por seleção automática do software (0,568). Esta seleção é baseada na resolução de aquisição, tamanho de pixel e ampliação da área. Os resultados são exportados em valores de área em pixels².

- Histo-citometria (painel de células linfóides inatas)

As imagens são reconhecidas no software Imaris em quatro canais:

Canal 1 (azul) – DAPI; Canal 2 (verde) – CD4; Canal 3 (vermelho) – IL-7R; Canal 4 (azul) – linhagem (CD11b, CD11c, CD3, B220).

A função de colocalização foi utilizada para selecionar a população duplamente positiva para CD4 AF488 e IL-7R AF597. Foram utilizados os valores mínimos de detecção de sinal para cada fluorocromo como parâmetro de definição de *gating*. Um novo canal (5) é criado a partir da colocalização entre CD4 e IL-7R. Cada canal exibe uma média de intensidade de fluorescência, o que significa que a intensidade do canal 5 será a combinação de dois canais e portanto, o dobro de intensidade de fluorescência. Então, utilizou-se a função aritmética para subtrair duas vezes a linhagem do canal 5. Foi utilizada a seguinte fórmula:

Canal 5 – $(2 \cdot \text{Canal 4})$

Esta estratégia irá criar um novo canal (6) com seleção negativa para a linhagem (canal 4) e dupla positividade para CD4 e IL-7R. Para selecionar células positivas somente para IL-7R, foi utilizada a seguinte fórmula:

Canal 3 – $(2 \cdot \text{Canal 2})$ --- para subtrair duas vezes o sinal CD4 e criar um novo canal (6).

Canal 6 – $(2 \cdot \text{Canal 4})$ --- para subtrair duas vezes o sinal da linhagem.

As células então são contadas manualmente e marcadas artificialmente em verde (Linhagem-CD4⁺IL-7R⁺) ou vermelho (Linhagem-CD4-IL-7R⁺). Uma representação gráfica deste processamento está detalhado na figura 39.

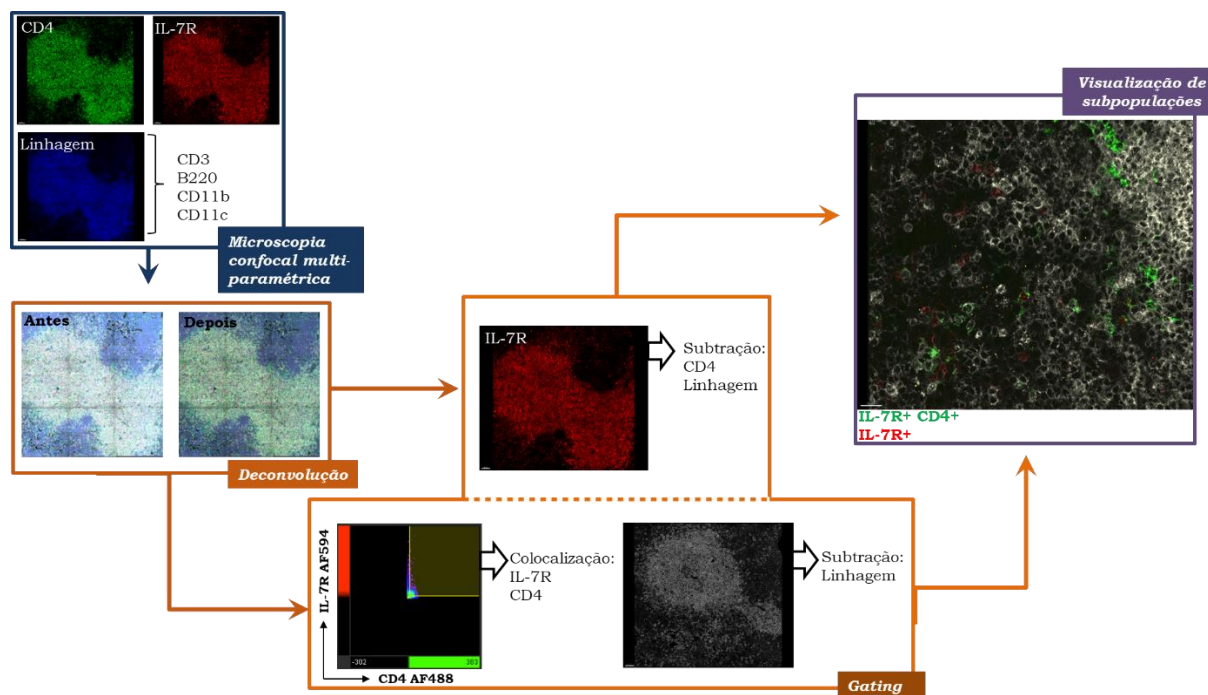


Figura 39. Estratégia de análise de histo-citometria. Desenho esquemático de etapas de análise de técnica de histo-citometria para pesquisa de células linfoides inatas no baço.

7.1.15 Expressão dos resultados da análise fenotípica

Os valores percentuais relativos de cada subpopulação de células foram analisados. Para análise da diferença por ponto de avaliação, os valores foram comparados entre os grupos controle e infectado. Para análise da diferença ao longo da cinética, foi gerado um valor de *fold change* (FC) e comparado entre os pontos de avaliação. Para tanto, foi calculada a mediana dos valores percentuais de cada subtipo celular do grupo controle (A). O valor percentual para cada animal infectado (B) foi submetido a uma fórmula para cálculo do FC: $(B-A)/A$.

7.2 RESULTADOS

Cinética de infecção com 1×10^8 *L. infantum*/mL por 30, 60 e 90 dias

7.2.1 Sinais clínicos e evidências de infecção

Não houve diferença no peso entre camundongos dos grupos controle e infectado. Evidências de infecção por cultura de *L. infantum* e teste sorológico para *Leishmania* estão relacionados na tabela 6. Esplenomegalia foi observada nesta infecção com 1×10^8 *L. infantum*/mL (figura 40).

Tabela 6. Características gerais dos camundongos.

Parâmetros	30 dias		60 dias		90 dias	
	CT	INF	CT	INF	CT	INF
N (%)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	6 (100)
Cultura	0	7 (100)	0	7 (100)	0	6 (100)
ELISA	0	4 (57)	0	7 (100)	0	6 (100)

Nota: CT= grupo controle; INF= grupo infectado.

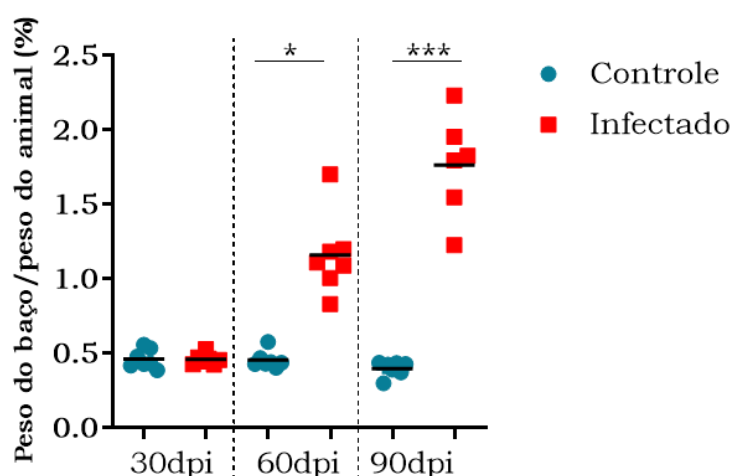


Figura 40: Avaliação de esplenomegalia em camundongos. Variação entre o peso do baço e o peso total do animal, em percentual, nos grupos controle e infectado dos pontos de avaliação de 30, 60 e 90 dias após a injeção. *= Kruskal-Wallis test, $p=0,01$; **= Kruskal-Wallis test, $p=0,0001$.

7.2.2 Análise histológica

Linfonodo

Foram observados principalmente folículos primários em camundongos não infectados ao longo da cinética. Os folículos aparecem aumentados em

camundongos infectados a 30dpi (3 [1,5–3]) em comparação aos camundongos controle (0[-3–0], $p=0,04$) (tabela 7).

Tabela 7. Parâmetros de análise histológica do linfonodo em camundongos a 30, 60 e 90 dias após a injeção.

Parâmetros	30 dias		60 dias		90 dias	
	CT	INF	CT	INF	CT	INF
N (%)	7(100)	7(100)	7(100)	7(100)	7(100)	6(100)
Folículos						
<i>Não evidente</i>	4(57)	2(29)	2(29)	1(14)	3(43)	1(17)
<i>Presente*</i>	0[-3–0]	3[1,5–3]^a	0[0–0]	0,5[0–2]	0[0–0,7]	1[0–1,2]
Centro germinativo						
<i>Não evidente</i>	5(71)	2(29)	6(86)	4(57)	6(86)	3(50)
<i>Presente*</i>	0,5[0–1]	3[1,5–3]	1[1–1]	1[0–2]	0[0–0]	1,5[1–2]

Nota: CT= grupo controle; INF= grupo infectado. *Valores de score representados em mediana e intervalos interquartis. a= diferença estatística entre grupos controle e infectado a 30 dias após a injeção, Kruskal-Wallis test $p=0,04$.

Fígado

Granulomas no parênquima hepático foram somente observados em camundongos infectados (figura 41, A), em maior frequência e intensidade a 30 e 60 dpi ($p=0,001$)(figura 41, B). A 90 dpi, camundongos infectados apresentaram maior intensidade de infiltrado inflamatório crônico no espaço porta ($p=0,04$, figura 41, C e D) e maior intensidade de leucocitose intrassinusoidal ($p=0,02$, figura 41, E e F).

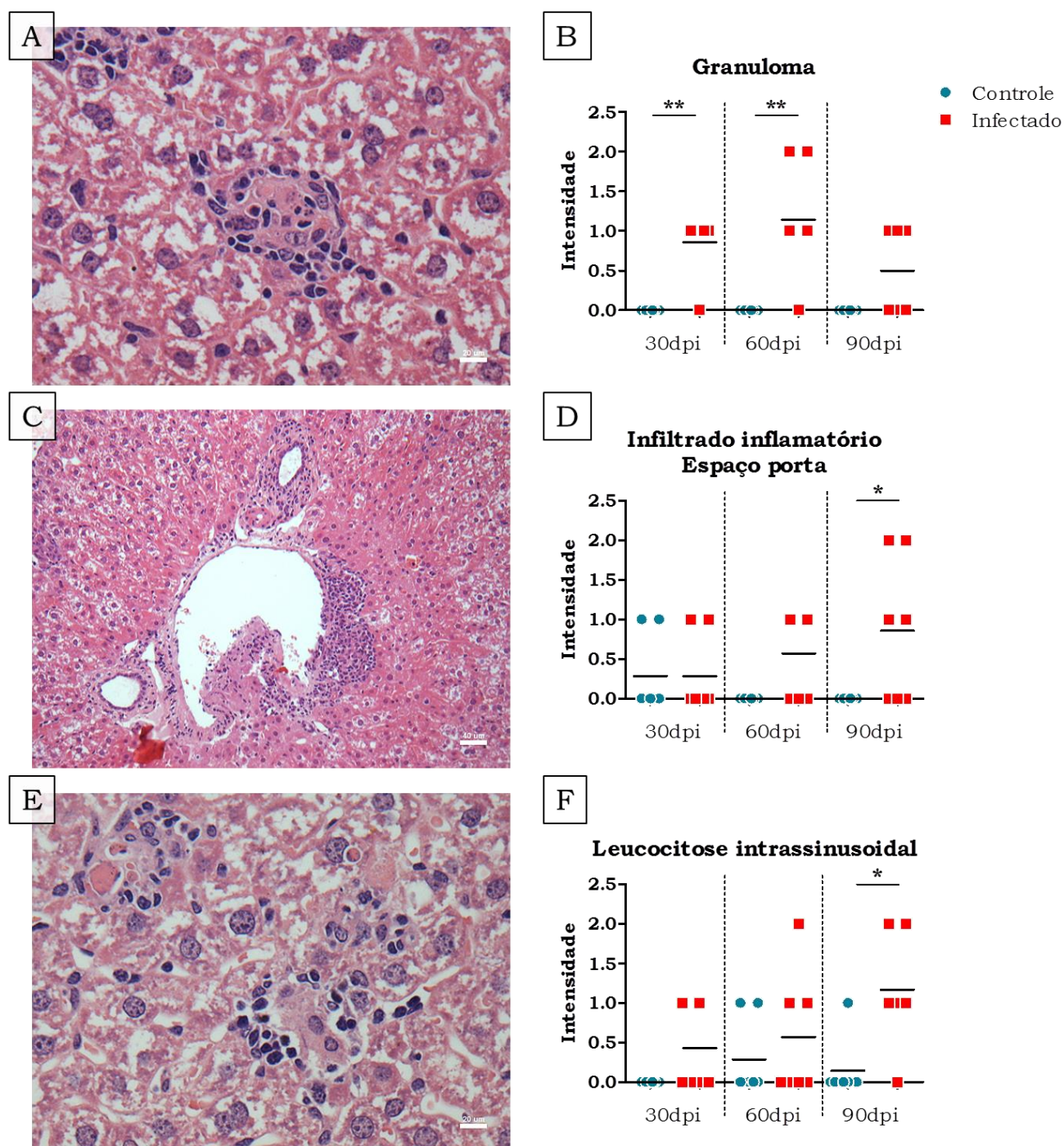


Figura 41: Avaliação de parâmetros histopatológicos no fígado de camundongos. Fotomicrografia de granuloma no parênquima (A, H&E, 400x, barra= 20µm) e gráfico representativo de intensidade de granulomas, **= Kruskal-Wallis test, $p=0,001$ (B); Fotomicrografia de infiltrado inflamatório crônico no espaço porta (C, H&E, 400x, barra= 40µm) e gráfico representativo de intensidade de infiltrado inflamatório, *= Kruskal-Wallis test, $p=0,04$ (D); Fotomicrografia de leucocitose intrassinusoidal (E, H&E, 400x, barra= 20µm) e gráfico representativo de intensidade de leucocitose intrassinusoidal, *= Kruskal-Wallis test, $p=0,02$ (F).

Baço

A organização arquitetural da PB do baço dos camundongos está classificada na tabela 8 e as fotomicrografias ilustradas na figura 42. Baço moderadamente desorganizado ou tipo 2 foi observado em 2/7 camundongos infectados a 30 dpi, 1/7 camundongos do grupo controle a 60 dpi e 1/6 camundongo infectado a 90 dpi, sem diferença estatística.

Tabela 8. Classificação da organização arquitetural do baço de camundongos. Avaliação da organização da polpa branca do baço de camundongos dos grupos controle e infectado, nos pontos de avaliação de 30, 60 e 90 dias após a infecção.

Parâmetros	30 dias		60 dias		90 dias	
	CT	INF	CT	INF	CT	INF
N (%)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	6 (100)
Tipo 1	7 (100)	5 (71)	6 (86)	7 (100)	7 (100)	5 (86)
Tipo 2	0	2 (29)	1 (14)	0	0	1 (17)
Tipo 3	0	0	0	0	0	0

Nota: CT= grupo controle; INF= grupo infectado. Tipo1= baço organizado; Tipo 2= baço moderadamente desorganizado; Tipo 3= baço desorganizado.

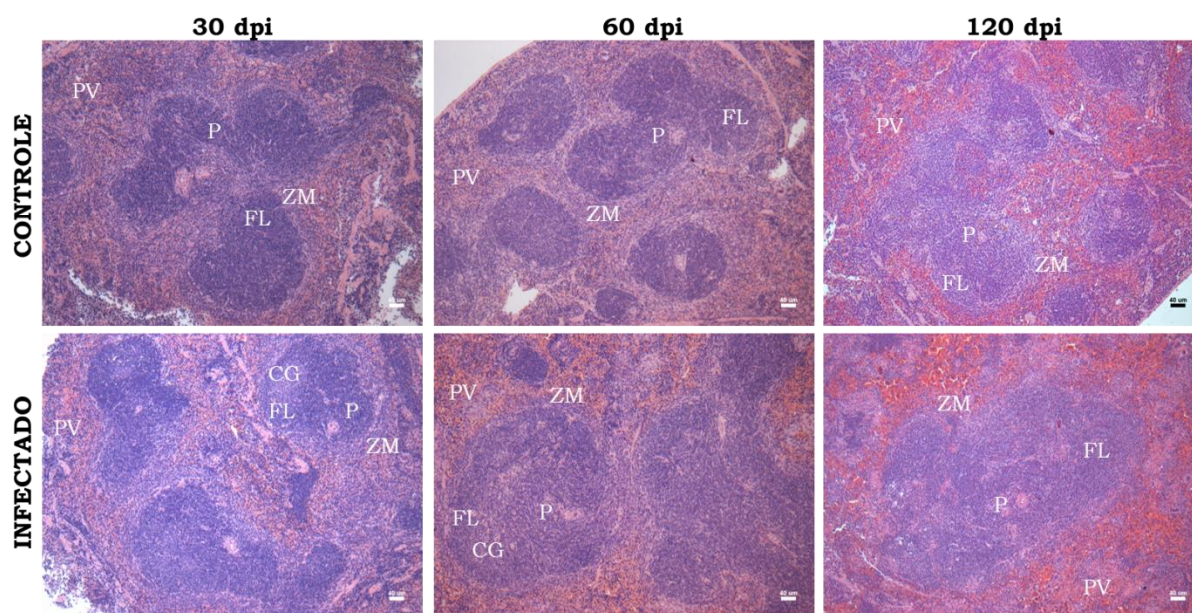


Figura 42: Fotomicrografias de baço dos camundongos. Fotos representativas de baço de hamsters dos grupos controle e infectado, em 30, 60 e 90 dias após a injeção. Coloração H&E, aumento 100x, barras= 40µm.

Camundongos infectados a 30 dpi apresentaram maior área de PB ($44,4\% \pm 5,3$) em comparação aos camundongos do grupo controle ($32,4\% \pm 6,9$, $p=0,01$). A 60 dpi, camundongos infectados apresentam redução da PB ($35\% \pm 5,8$) em comparação ao grupo controle ($41,4\% \pm 4$, $p=0,03$) (figura 43).

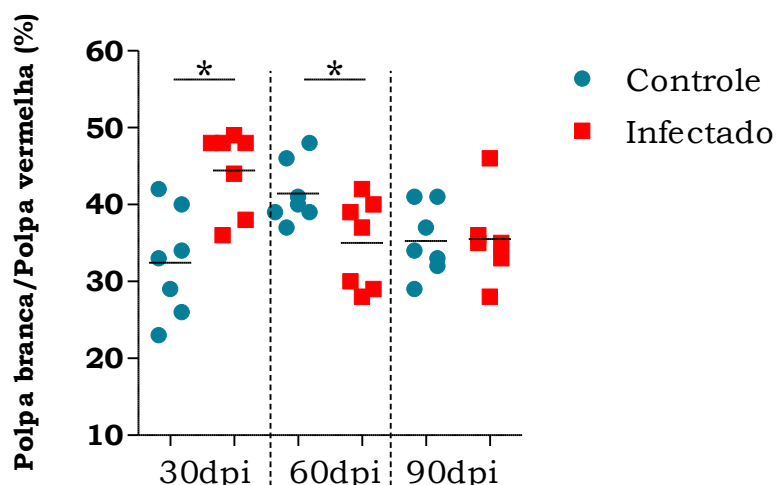


Figura 43: Avaliação morfométrica da área de polpa branca do baço de camundongos. Morfometria da área ocupada pela polpa branca do baço em relação à área total, dos camundongos dos grupos controle e infectado, em 30, 60 e 90 dias após a injeção.*= t test, $p < 0,05$.

Camundongos infectados a 90 dpi apresentaram folículos significativamente maiores com centros germinativos grandes (tabela 9). Houve hiperplasia da polpa vermelha (PV) em camundongos com 90 dias de infecção.

Tabela 9. Parâmetros de análise histológica do baço em camundongos a 30, 60 a 90 dias após a injeção.

Parâmetros	30 dias	60 dias	90 dias
Tamanho do folículo			
<i>Controle</i>	0 [0 – 1]	1 [0 – 2]	0 [0 – 1]
<i>Infectado</i>	0 [0 – 1]	1 [0 – 1]	2 [0,7 – 3]^a
Centro germinativo			
<i>Controle</i>	1 [0 – 1]	0 [-0,5 – 0,5]	0 [-1 – 0]
<i>Infectado</i>	1 [0,7 – 1]	2 [1 – 2]^b	2 [1 – 3]^c
Celularidade da PV			
<i>Controle</i>	0 [0 – 1]	0 [0 – 0]	0 [0 – 0]
<i>Infectado</i>	1 [1 – 1]	0 [0 – 0]	1 [0,7 – 1,2]^d

Nota: Valores representados em mediana e intervalos interquartis.

a= diferença do score de tamanho do folículo entre camundongos dos grupos infectado e controle a 90 dias da injeção, $p=0,07$, Kruskal-Wallis test. b= diferença do score de tamanho de centro germinativo entre camundongos dos grupos controle e infectado a 60 dias da injeção, $p=0,01$, Kruskal-Wallis test. c= diferença do score de tamanho de centro germinativo entre camundongos dos grupos controle e infectado a 90 dias da injeção, $p=0,001$, Kruskal-Wallis test. d= diferença do score de celularidade entre camundongos dos grupos controle e infectado a 90 dias da injeção, $p=0,002$, Kruskal-Wallis test.

Granulomas pequenos e organizados na PV foram observados apenas em camundongos infectados a partir de 60 dpi (1/7) e a 90dpi (6/6), $p=0,001$ (figura 44, A e B).

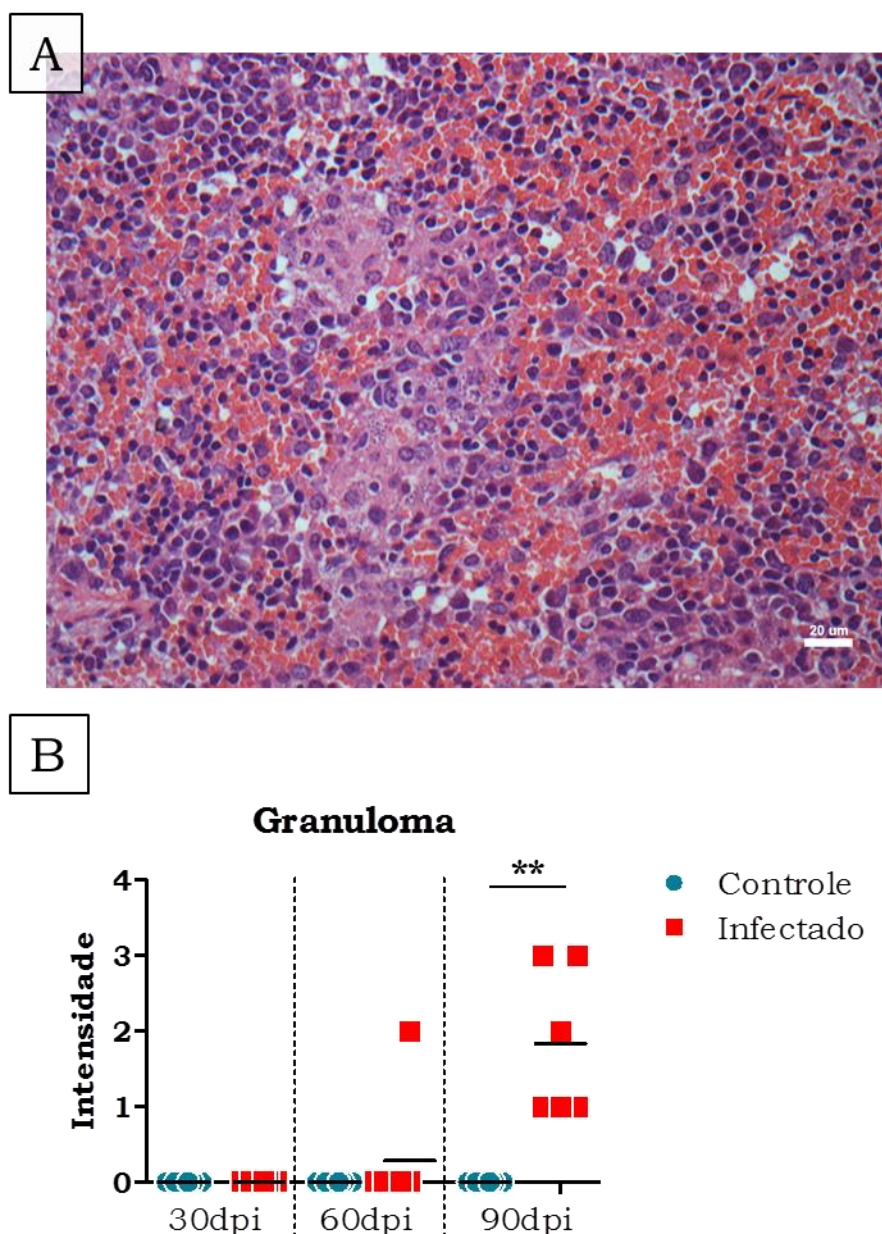


Figura 44: Avaliação de granuloma no baço de camundongos. Fotomicrografia representativa de granulomas na polpa vermelha do baço de camundongo infectado a 90 dias. Coloração H&E, aumentos 400x, barra= 40 μ m (A). Gráfico representativo da classificação de intensidade de granuloma no baço de camundongos a 30, 60 e 90 dias após a injeção, **= Kruskal-Wallis test, $p=0,001$ (B).

7.2.3 Análise fenotípica de esplenócitos por citometria de fluxo

Foram utilizadas as mesmas estratégias de *gating* representadas no Apêndice B para caracterização das subpopulações de linfócitos T e B, macrófagos, plasmócitos, células dendríticas foliculares e plasmocitoides para cada grupo de avaliação. Os valores estão expressos em números absolutos, calculados pela relação do número total de células obtidos após a

lise de hemácias com o peso do fragmento utilizado para obtenção de esplenócitos; ou relativos por análise de *fold-change* (FC).

Linfócitos T

Foram selecionados linfócitos positivos para CD3 e positivos para CD4 ou positivos para CD8. As médias de números absolutos dessas células para cada grupo de avaliação estão representadas na tabela 10.

Tabela 10. Números absolutos de subpopulações de linfócitos T nos grupos controle ou infectado, em 30, 60 e 90 dias após a injeção.

Células	30 dias	60 dias	90 dias
Linfócito T CD4⁺			
<i>Controle</i>	1.224.500 ± 980.856	4.503.000 ± 5.034.719	778.067 ±706.570
<i>Infectado</i>	506.800 ± 518.723	16.968.000 ± 8.386.127	1.408.600 ± 816.724
Linfócito T CD8⁺			
<i>Controle</i>	629.500 ± 572.541	4.722.600 ± 5.574.057	331.567 ± 302.374
<i>Infectado</i>	224.700 ± 229.807	12.636.000 ± 7.881.683	934.600 ± 471.181

Nota: dados absolutos expressos em média ± desvio padrão.

Houve maior número linfócitos T CD4 em camundongos infectados (16.968.000 ± 8.386.127) comparado ao grupo controle (4.503.000 ± 5034719, p=0,02) (figura 45, A), sem diferença estatística para linfócitos T CD8 (figura 45, B). Quando avaliado por FC, observa-se que animais infectados apresentam maior expressão de linfócitos T CD4 a 60 e 90dpi (FC 2) quando comparado a 30dpi (FC -1, p<0,05) (figura 45, C). A 90dpi, animais infectados apresentam maior expressão de linfócitos T CD8 (FC 3) em comparação a 30dpi (FC -1, p=0,004) (figura 45, D).

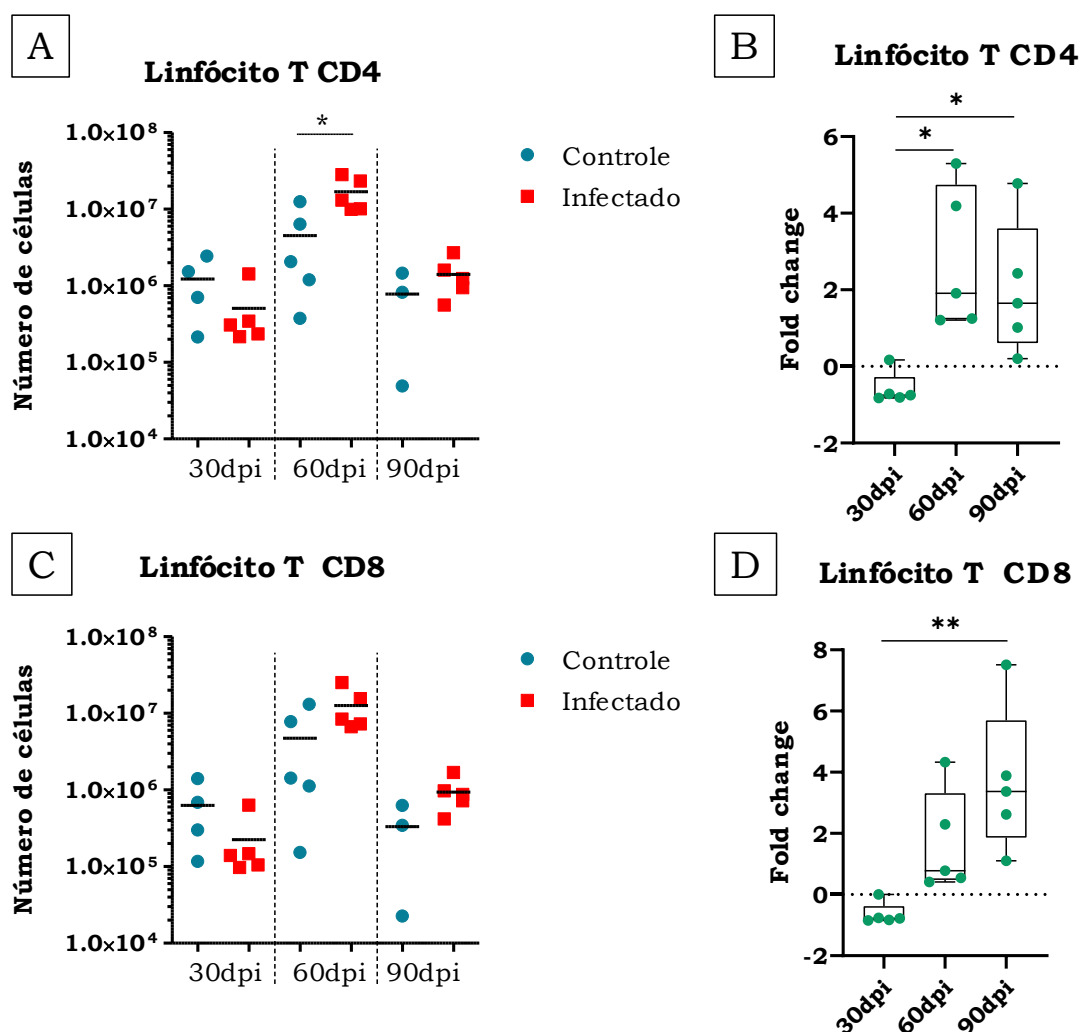


Figura 45: Avaliação do número de linfócitos T no baço de camundongos.

Representação gráfica do número de células positivas para linfócitos T CD4, * = t test, 0,02 (A) e T CD8 (C) nos grupos controle (azul) e infectado (vermelho) nos diferentes pontos de avaliação e por *fold change* ao longo da cinética de avaliação a 30, 60 e 90 dias após a injeção * = ANOVA, Tukey's post test, $p < 0,05$; ** = ANOVA, Tukey's post test, $p = 0,004$ (C e D).

Linfócitos B

Foram selecionadas células negativas para CD3 e positivas para CD19. Os valores em média para cada grupo de avaliação estão dispostos na tabela 11.

Tabela 11. Números absolutos de subpopulações de linfócitos B nos grupos controle ou infectado, em 30, 60 e 90 dias após a injeção.

Linfócito B	30 dias	60 dias	90 dias
Controle	94.850 \pm 71.149	1.037.400 \pm 756.751	438.800 \pm 333.927
Infectado	18.132 \pm 13.719	21.520.000 \pm 5.285.073	2.240.000 \pm 957.993

Nota: dados percentuais expressos em média \pm desvio padrão.

Houve aumento do número de linfócitos B em camundongos infectados ($21.520.000 \pm 5.285.073$) em comparação a camundongos do grupo controle ($1.037.400 \pm 756.751$) a 60 dpi ($p=0,001$, figura 46, A). Este efeito é igualmente observado ao longo da cinética, apresentando maior FC para linfócitos B a 60dpi (FC 20, $p<0,0001$). A 90dpi, observa-se FC 5 vezes o valor para o encontrado a 30dpi (FC 0, $p=0,008$) (figura 46, B).

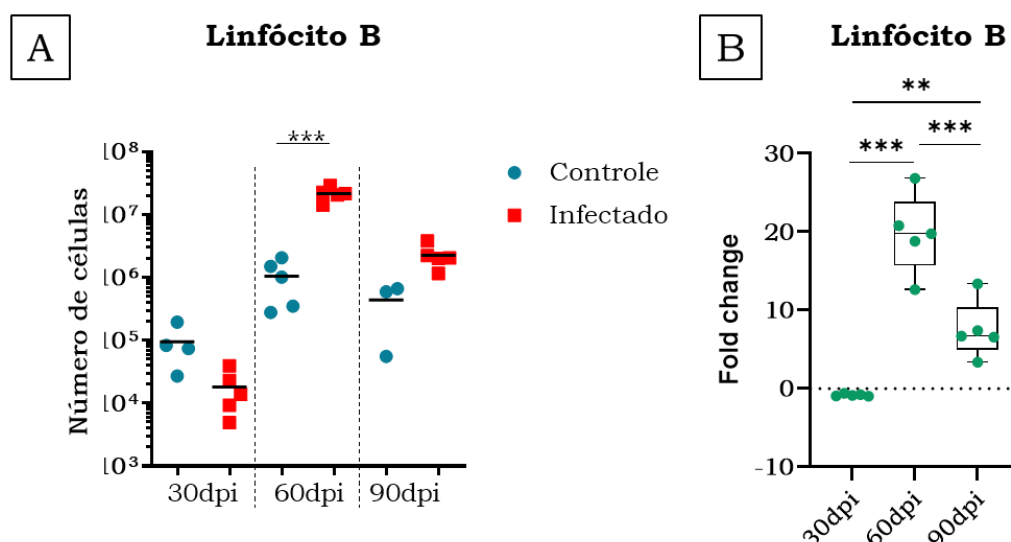


Figura 46: Avaliação do número de linfócitos B no baço de camundongos.

Representação gráfica do número de células positivas para linfócitos B nos grupos controle e infectado nos diferentes pontos de avaliação, ***= Kruskal-Wallis test, $p=0,0002$ (A) em baço de camundongos dos grupos controle (azul) ou infectado (vermelho) e por *fold change* ao longo da cinética de avaliação, **= ANOVA, Tukey's post test, $p=0,008$; ***= ANOVA, Tukey's post test, $p<0,0001$ (B) a 30, 60 e 90 dias após a injeção (dpi).

Linfócitos CD3-CD4⁺

Células sugestivas de células linfoides inatas do grupo 3 foram selecionadas a partir de fração positiva para CD4 e negativa para CD3. Os valores de média de números absolutos estão dispostos na tabela 12.

Tabela 12. Números absolutos de subpopulações de linfócitos T CD3-CD4⁺ nos grupos controle ou infectado, em 30, 60 e 90 dias após a injeção.

Linfócito CD3-CD4 ⁺	30 dias	60 dias	90 dias
Controle	16.198 ± 11.663	106.832 ± 125.489	17.757 ± 14.580
Infectado	3.872 ± 3.256	429.800 ± 121.143	43.440 ± 30.879

Nota: dados percentuais expressos em média ± desvio padrão.

A 60dpi foi observado um maior número de linfócitos CD3-CD4⁺ em camundongos infectados (429.800 ± 121.143) comparado ao número encontrado no grupo controle (106.832 ± 125.489 , $p=0,001$) (figura 47, A). A menor expressão dessa célula durante a cinética de infecção aparece no ponto mais precoce de avaliação (FC -1, $p=0,01$) (figura 47, B).

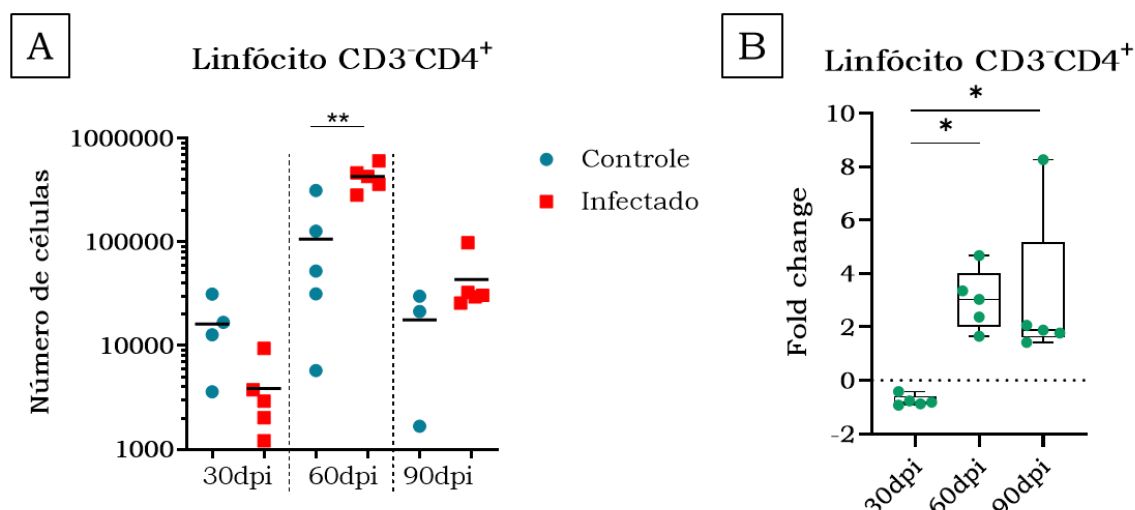


Figura 47: Avaliação do número de linfócitos T CD3-CD4⁺ no baço de camundongos.

Representação gráfica do número de células positivas para linfócitos T CD3-CD4⁺ nos grupos controle e infectado nos diferentes pontos de avaliação, **= Kruskal-Wallis test, $p=0,001$ (A) em baço de camundongos dos grupos controle (azul) ou infectado (vermelho) e por *fold change* ao longo da cinética de avaliação, *= ANOVA, Tukey's post test, $p=0,01$ (B) a 30, 60 e 90 dias após a injeção (dpi).

Macrófagos

Células negativas para CD11c e duplamente positivas para CD11b e F4/80 foram caracterizadas como macrófagos e as populações estão descritas por média e desvio padrão na tabela 13.

Tabela 13. Números absolutos de subpopulações de macrófagos nos grupos controle ou infectado, em 30, 60 e 90 dias após a injeção.

Macrófagos	30 dias	60 dias	90 dias
Controle	85.225 ± 56.382	454.480 ± 743.530	18.028 ± 16.738
Infectado	48.580 ± 29.286	1.013.400 ± 474.787	55.020 ± 41.021

Nota: dados percentuais expressos em média ± desvio padrão.

Não houve diferença estatisticamente significante para o número de macrófagos entre os grupos controle e infectado (figura 48, A). Entretanto, na avaliação durante a cinética, animais infectados apresentam aumento

nas populações de macrófagos a 90dpi em comparação ao início do acompanhamento ($p=0,04$, figura 48, B)

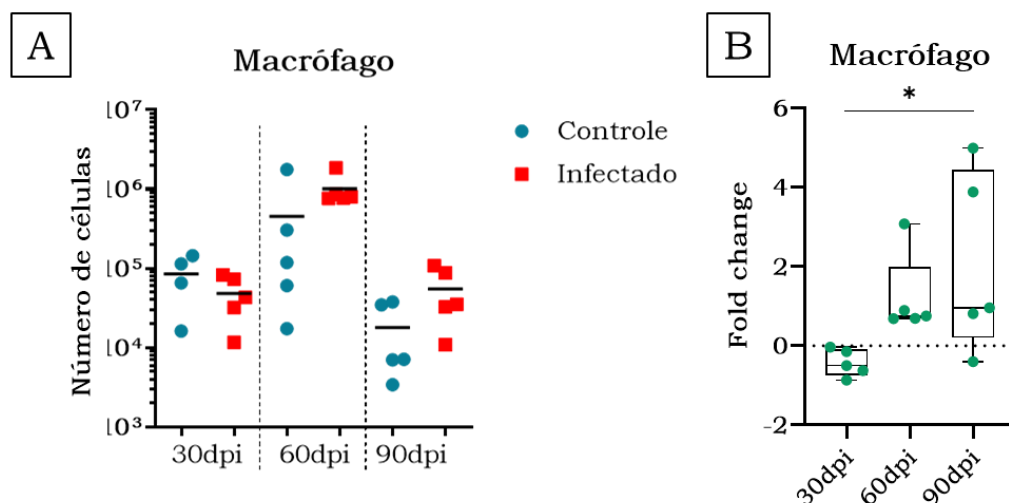


Figura 48: Avaliação do número de macrófagos no baço de camundongos.

Representação gráfica do número de células positivas para macrófagos nos grupos controle e infectado nos diferentes pontos de avaliação (A) em baço de camundongos dos grupos controle (azul) ou infectado (vermelho) e por *fold change* ao longo da cinética de avaliação, *= ANOVA, Tukey's post test, $p=0,04$ (B) a 30, 60 e 90 dias após a injeção (dpi).

Plasmócitos

Para este experimento, a seleção de plasmócitos foi feita inicialmente por CD138 positivo. Frações com baixa ou nenhuma expressão de B220 e CD19 foram selecionadas. Plasmócitos foram por fim caracterizados como CD93 positivo. As populações estimadas estão representadas em números absolutos por média e desvio padrão na tabela 14.

Tabela 14. Números absolutos de subpopulações de plasmócitos nos grupos controle ou infectado, em 30, 60 e 90 dias após a injeção.

Plasmócitos	30 dias	60 dias	90 dias
Controle	830,4 \pm 1.238	5.935 \pm 6.627	2.323 \pm 1.667
Infectado	525,6 \pm 283	35.912 \pm 27.017	53.100 \pm 18.672

Nota: dados percentuais expressos em média \pm desvio padrão.

Camundongos infectados apresentam números mais elevados de plasmócitos a 60 dpi (35.912 \pm 27.017, $p=0,005$) e a 90dpi (53.100 \pm 18.672, $p<0,0001$) que animais dos grupos controle (figura 49, A). Na cinética de

infecção, essa expressão é mais evidente no ponto mais tardio (FC 20, $p < 0,0001$) (figura 49, B).

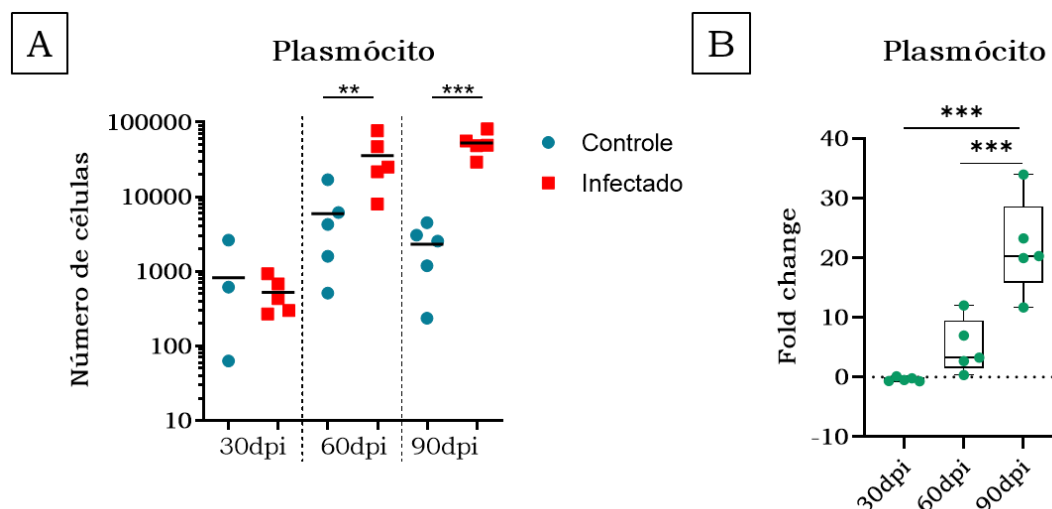


Figura 49: Avaliação do número de plasmócitos no baço de camundongos.

Representação gráfica do número de células positivas para plasmócitos nos grupos controle e infectado nos diferentes pontos de avaliação, **= ANOVA, Sidak's post test, $p = 0,005$; ***= ANOVA, Sidak's post test, $p < 0,0001$ (A) em baço de camundongos dos grupos controle (azul) ou infectado (vermelho) e por *fold change* ao longo da cinética de avaliação, ***= ANOVA, Tukey's post test, $p < 0,0001$ (B) a 30, 60 e 90 dias após a injeção (dpi).

Células dendríticas foliculares

Neste experimento, células dendríticas foliculares foram caracterizadas como CD11c e CD23 positivas. Os valores das populações celulares estão expressos em números absolutos por média e desvio padrão na tabela 15.

Tabela 15. Números absolutos de subpopulações de células dendríticas foliculares nos grupos controle ou infectado, em 30, 60 e 90 dias após a injeção.

Células dendríticas foliculares	30 dias	60 dias	90 dias
<i>Controle</i>	4.704 ± 6.472	18.638 ± 26.083	761,4 ± 469,0
<i>Infectado</i>	1.284 ± 1.187	211.980 ± 278.874	209.160 ± 11.3517

Nota: dados percentuais expressos em média ± desvio padrão.

A 90dpi o número de células dendríticas foliculares aparece mais elevado em camundongos infectados (209.160 ± 11.3517) em comparação aos camundongos controle (761,4 ± 469,0, $p = 0,01$) (figura 50, A), bem como aos demais pontos de avaliação da cinética ($p < 0,001$) (figura 50, B).

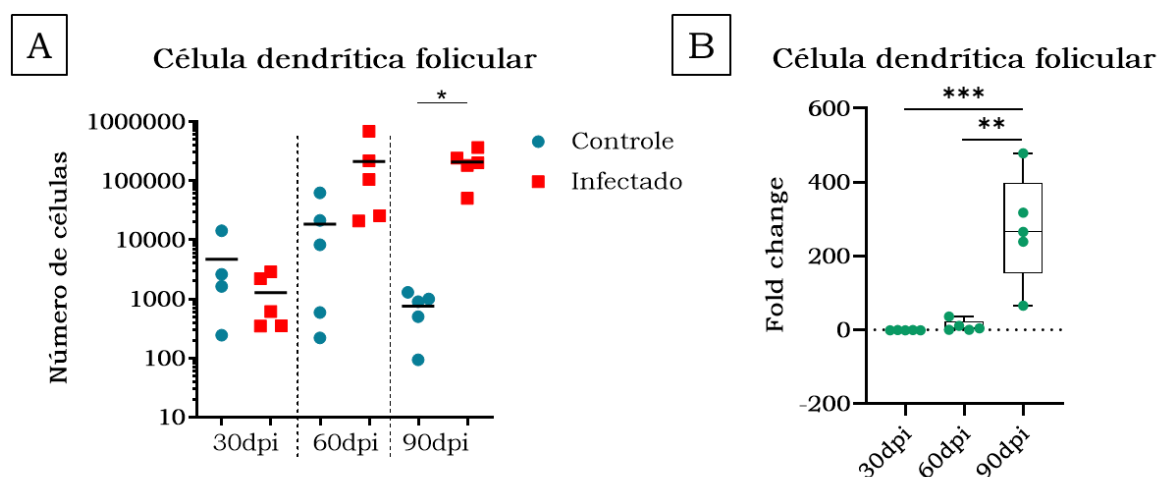


Figura 50: Avaliação do número de células dendríticas foliculares no baço de camundongos. Representação gráfica do número de células positivas para células dendríticas foliculares nos grupos controle e infectado nos diferentes pontos de avaliação, *= ANOVA, $p=0,01$ (A) em baço de camundongos dos grupos controle (azul) ou infectado (vermelho) e por *fold change* ao longo da cinética de avaliação, ***= ANOVA, Tukey's post test, $p=0,0008$; **= ANOVA, Tukey's post test, $p=0,001$ (B) a 30, 60 e 90 dias após a injeção (dpi).

Células dendríticas plasmocitoides

A partir de seleção negativa para CD11b, foram selecionadas células positivas para CD11c, B220 e GR-1. A média e desvio padrão para números absolutos de células estão dispostos na tabela 16.

Tabela 16. Números absolutos de subpopulações de células dendríticas plasmocitoides nos grupos controle ou infectado, em 30, 60 e 90 dias após a injeção.

Células dendríticas plasmocitoides	30 dias	60 dias	90 dias
<i>Controle</i>	42.903 \pm 32.799	393,3 \pm 432,9	2.353 \pm 1.882
<i>Infectado</i>	8.184 \pm 5.771	21.560 \pm 19.059	27.580 \pm 2.036

Nota: dados percentuais expressos em média \pm desvio padrão.

A 30dpi, ocorre redução do número de células dendríticas plasmocitoides em camundongos infectados (8.184 ± 5.771) em comparação aos camundongos controle (42.903 ± 32.799 , $p=0,005$). A 60dpi esse efeito se reverte, com diferença estatisticamente significativa a 90dpi ($p=0,03$) (figura 51, A). Durante a cinética, a diferença é maior expressiva em camundongos com 60 dias de infecção em comparação a 30 dpi ($p=0,02$) (figura 51, B).

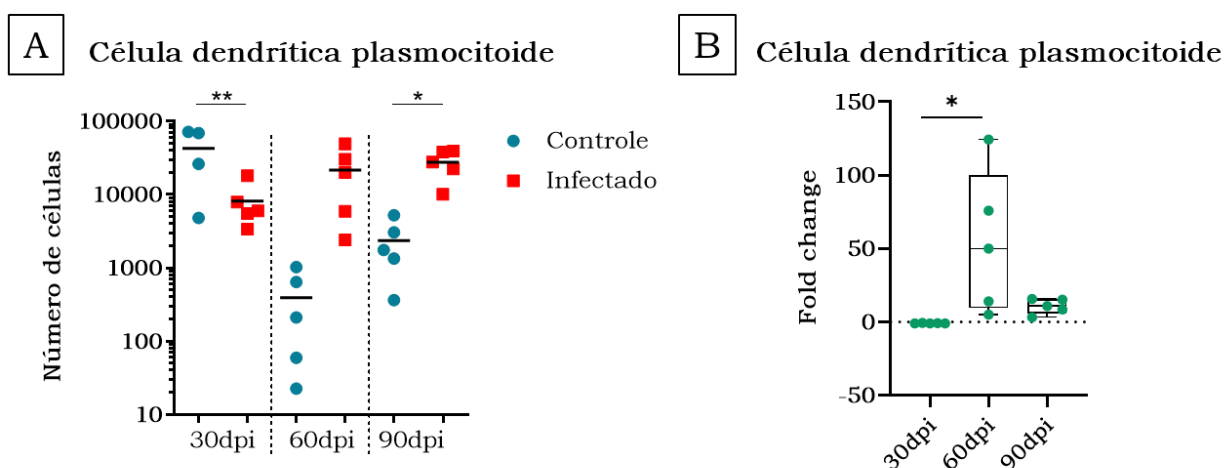


Figura 51: Avaliação do número de células dendríticas plasmocitoides no baço de camundongos. Representação gráfica do número de células positivas para células dendríticas plasmocitoides nos grupos controle e infectado nos diferentes pontos de avaliação, **= ANOVA, Sidak's post test, $p=0,005$; *= ANOVA, Sidak's post test, $p=0,03$; (A) em baço de camundongos dos grupos controle (azul) ou infectado (vermelho) e por *fold change* ao longo da cinética de avaliação, *= ANOVA, Tukey's post test, $p=0,02$ (B) a 30, 60 e 90 dias após a injeção (dpi).

7.2.4 Análise de citocinas no baço por citometria de fluxo

Foram avaliadas citocinas pro e antiinflamatórias por kit CBA. A 60dpi, ocorre tendência a maiores concentrações das citocinas IFN, IL-6, MCP-1, e IL-10 em camundongos infectados (figura 52, A, B, C e D). A 90dpi, as concentrações de IFN e IL-6 estão mais elevadas nos camundongos infectados ($p<0,05$), enquanto MCP-1, TNF, IL-10 e IL-12p70 mostram tendência a aumento (figura 52, C, D, E e F).

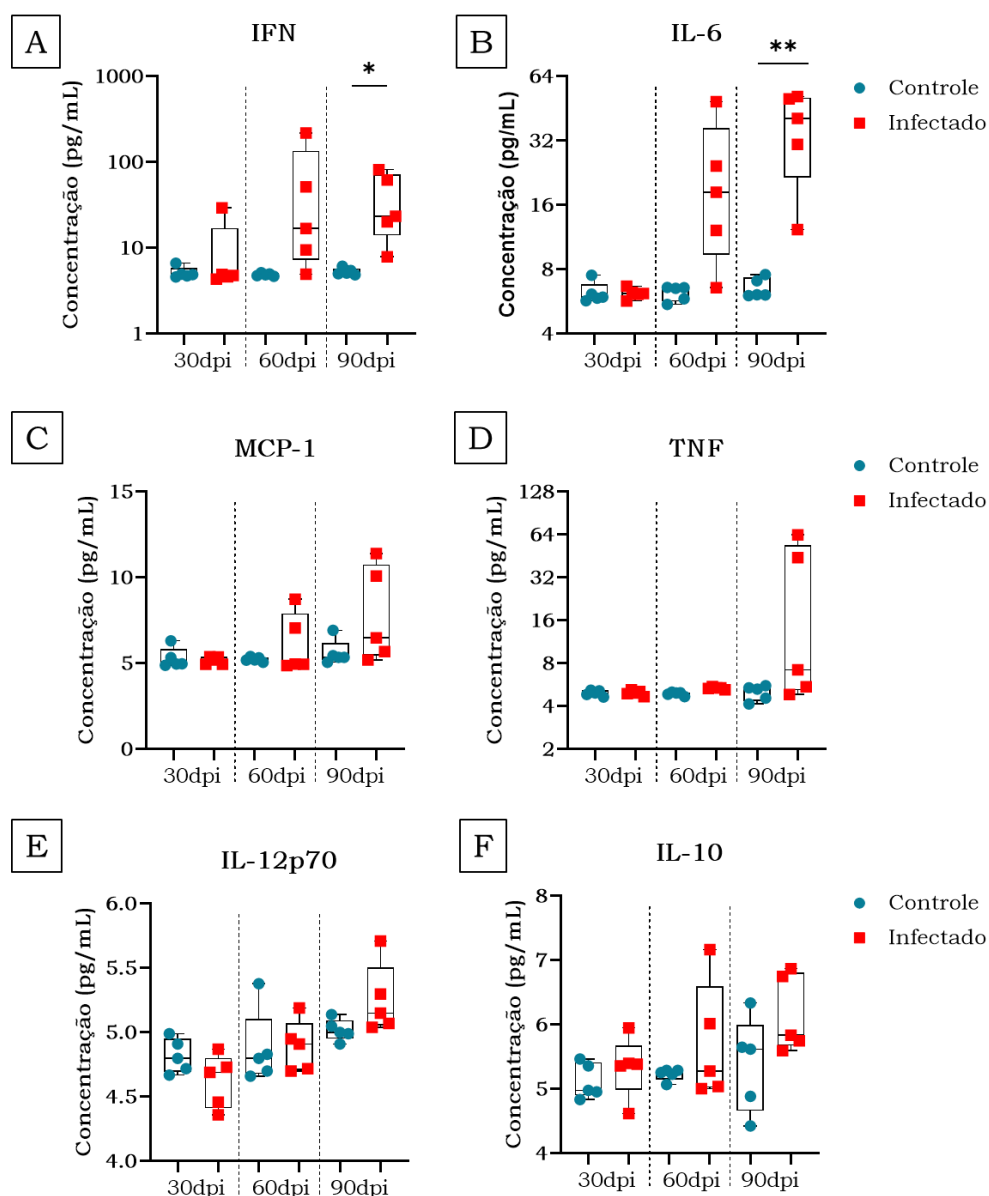


Figura 52: Avaliação de citocinas produzidas por esplenócitos em camundongos.

Representação gráfica das concentrações de citocinas IFN, *=t test, $p=0,04$ (A), IL-6, **= t test, $p=0,003$ (B), MCP-1 (C), TNF (D), IL-12p70 (E) e IL-10 (F) em baço de camundongos dos grupos controle (azul) ou infectado (vermelho) a 30, 60 e 90 dias após a injeção (dpi).

7.2.5 Análise de células estromais do baço por microscopia confocal

Células estromais dos microambientes da PB foram marcadas por MAdCAM (amarelo), gp38 (vermelho), CD35/8C12 (magenta/rosa), ER-TR9 (azul) e adicionalmente, B220 (verde) (figura 53). Foram estimadas as áreas representadas por cada marcador e os resultados estão expressos em área por pixel². As células estão descritas por sua localização nas subregiões da PB esplênica.

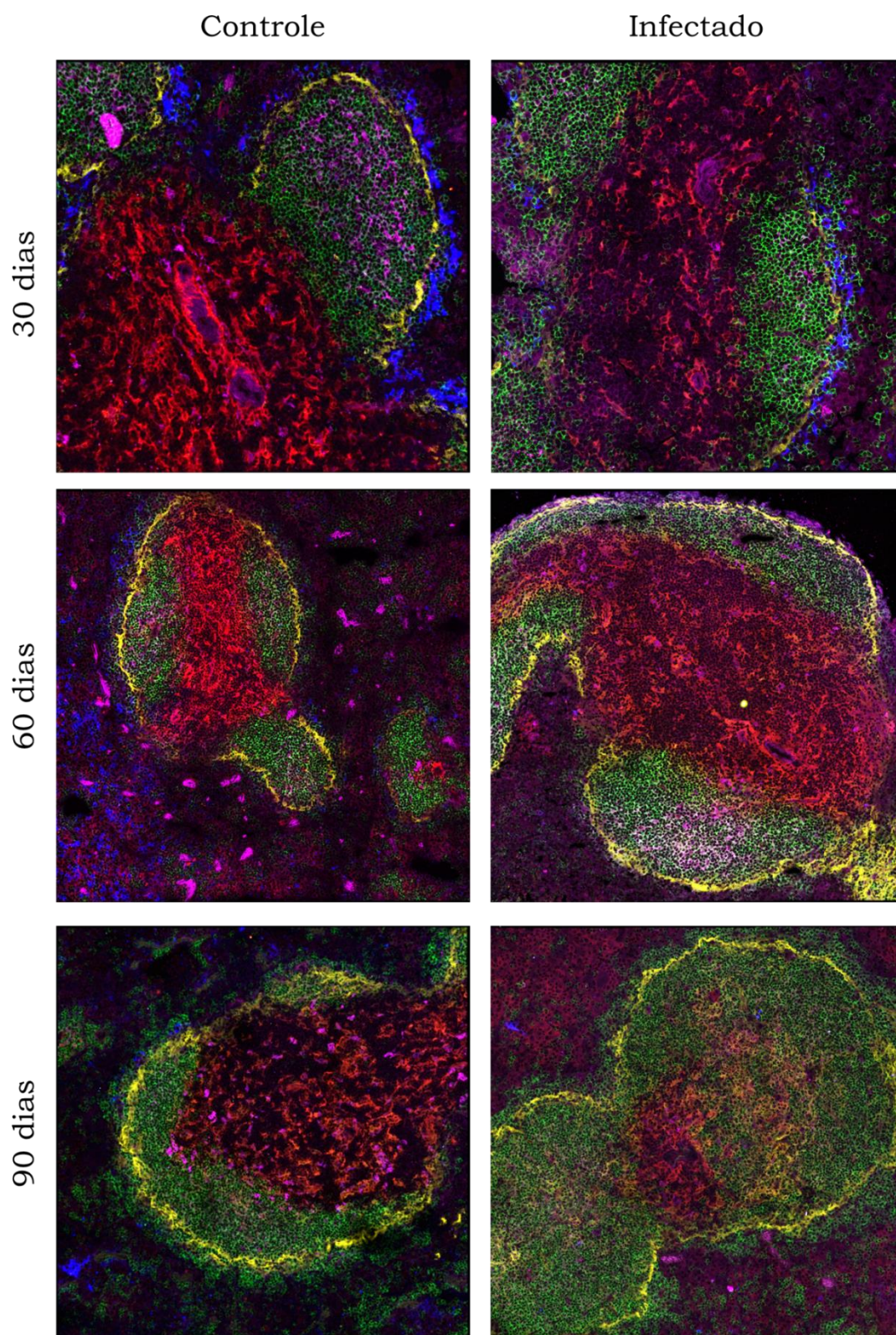


Figura 53: Fotomicrografias de células estromais em baço de camundongos. Mosaico de 9 fotos em aumento de 400x obtidas por microscópio confocal evidenciando as populações de célula B B220/CD45R (verde); célula estromal marginal reticular MAdCAM (amarelo); célula dendrítica folicular CD35/8C12 (rosa) célula estromal marginal reticular ER-TR9 (azul); célula fibroblástica reticular gp38 (vermelho), nos camundongos dos grupos infectado ou controle nos pontos de avaliação a 30, 60 e 90 dias após a injeção.

Células estromais do folículo linfoide

A área representada por marcadores de célula dendrítica folicular (CD35/8C12⁺) e célula B (B220⁺) nas secções de baços de camundongos infectados ou não, aparece similar ao longo da cinética (figura 54, A e B). Devido à interação dessas duas populações celulares no folículo, foi realizada uma delimitação da região folicular e avaliada a representação de área dos dois marcadores nesta região (figura 54, C). Observa-se tendência à menor razão entre área de célula dendrítica folicular e célula B em animais infectados a 90dpi, mas sem diferença estatisticamente significativa (figura 54, D).

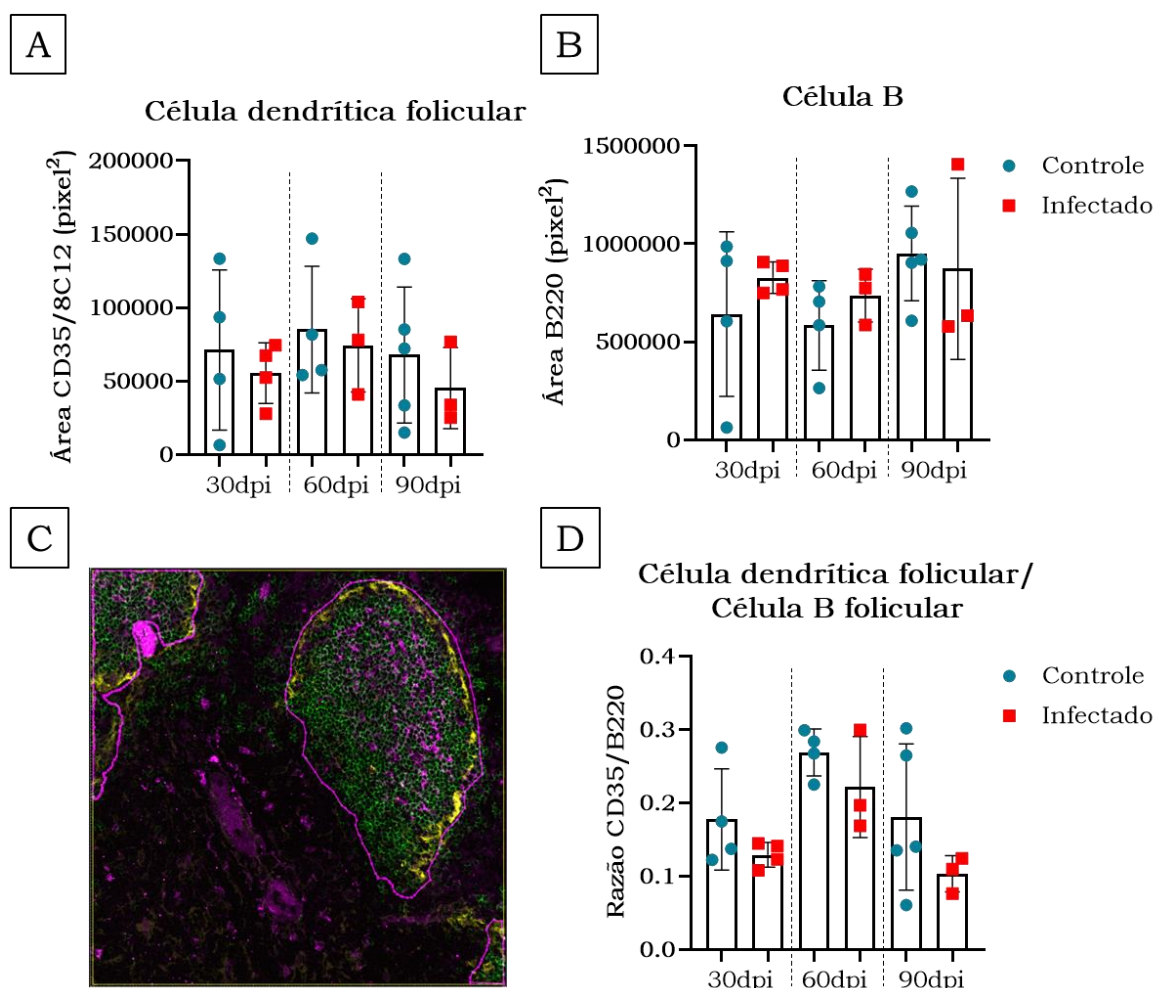


Figura 54: Avaliação de células B e células dendríticas foliculares em baço de camundongos. Representação gráfica da área em pixels² de marcação positiva para células dendríticas CD35/8C12 (A), células B B220 (B). Representação de delimitação de área (C) para mensuração de razão entre célula dendrítica folicular e célula B folicular (D) em baço de camundongos dos grupos controle (azul) ou infectado (vermelho) a 30, 60 e 90 dias após a injeção (dpi).

Células estromais da zona marginal

A área representada por célula marginal reticular MAdCAM⁺ distribui-se de maneira similar, independente de infecção ou tempo de acompanhamento (figura 55, A). Ocorre tendência à menor área representada por célula marginal reticular ER-TR9⁺ em camundongos infectados no primeiro ponto de avaliação; devido à dispersão dos valores no grupo controle do mesmo ponto, no entanto, não há diferença estatisticamente significativa (figura 55, B).

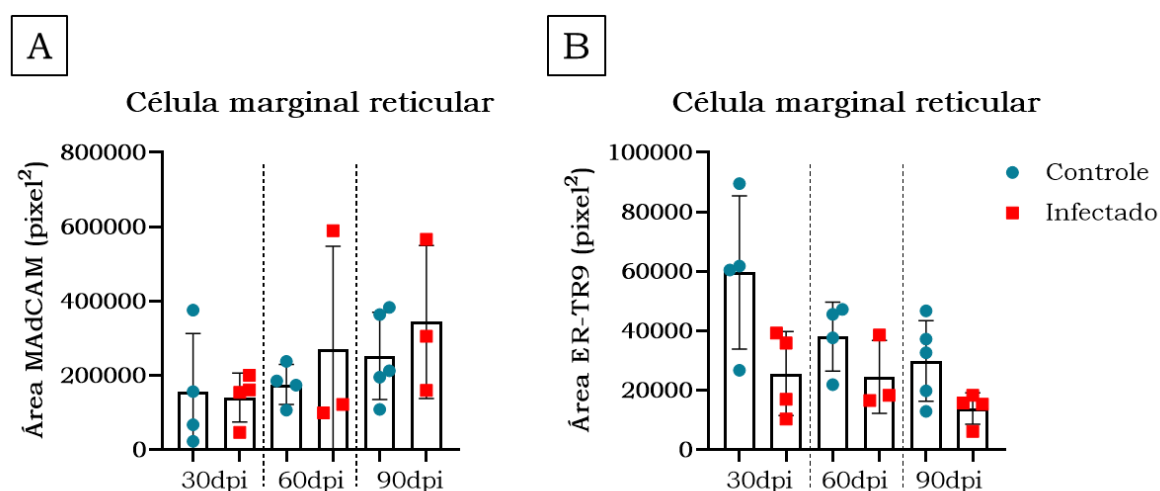


Figura 55: Avaliação de células marginais reticulares MAdCAM ou ER-TR9 em baço de camundongos. Representação gráfica da área em pixels² de marcação positiva para células marginais reticulares MAdCAM (A) e ER-TR9 (B) em baço de camundongos dos grupos controle (azul) ou infectado (vermelho) a 30, 60 e 90 dias após a injeção (dpi).

Células estromais da zona periarteriolar

A 60 dpi, pode ser observada uma expansão da área de célula fibroblástica reticular (gp38) em camundongos infectados (figura anterior, 56), que no entanto, não apresenta diferença estatisticamente significativa (figura 56).

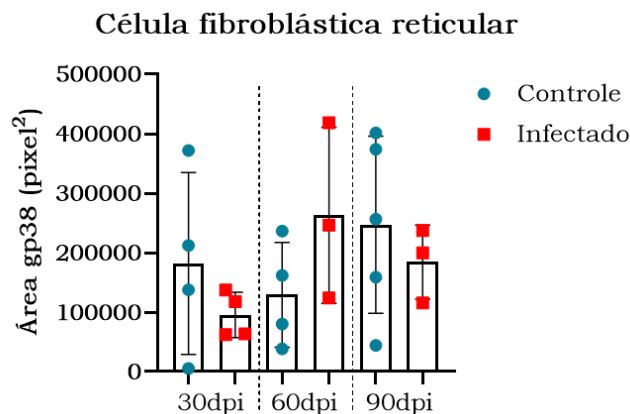


Figura 56: Avaliação de célula fibroblástica reticular em baço de camundongos.

Representação gráfica da área em pixels² de marcação positiva para célula fibroblástica reticular gp38 em baço de camundongos dos grupos controle (azul) ou infectado (vermelho) a 30, 60 e 90 dias após a injeção (dpi).

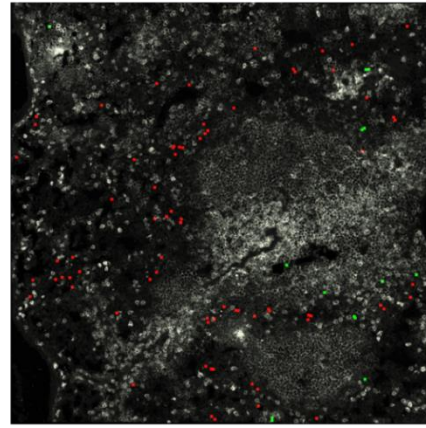
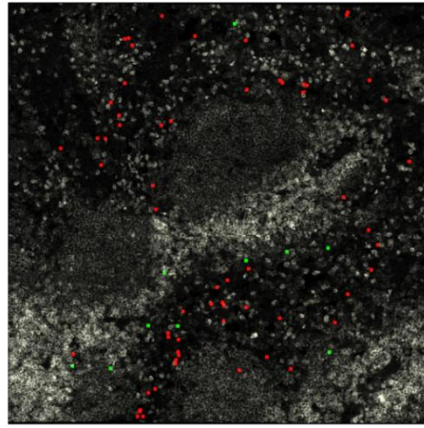
7.2.6 Análise de células linfoides inatas no baço por histo-citometria

Devido ao achado de células que não expressam CD3 e expressam CD4, foi realizada uma fenotipagem mais refinada e observar sua distribuição no tecido. Essas são células sugestivas de células linfoides inatas do tipo 3, com dois fenótipos e funções diferentes: Linhagem⁻ (cinza) CD4⁺IL-7R⁺ (verde) ou Linhagem⁻ (cinza) CD4⁻IL-7R⁺ (vermelho) (figura 57). Foram adicionados pontos artificiais para melhor evidenciar a localização dessas células no tecido, exceto em imagem aproximada em que é possível a observação real das células. Os valores estão expressos em números absolutos por área mensurada.

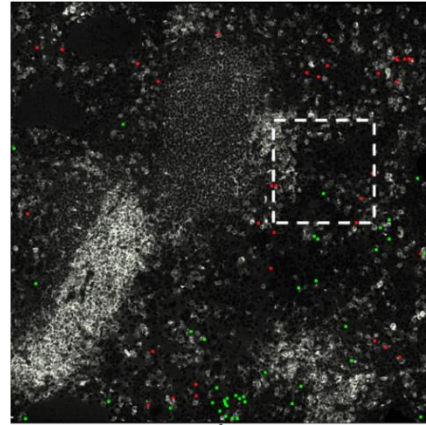
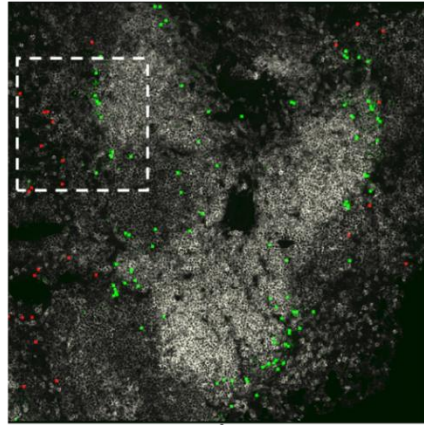
A disposição de células CD4⁺IL-7R⁺ no tecido esplênico do grupo controle pode ser observada circundando a zona periarteriolar (PALS) e passando na zona entre a PALS e o folículo linfoide. Nota-se que a distribuição dessas células ocorre de maneira mais espalhada no baço de camundongos infectados.

Diferente do observado por citometria de fluxo, não ocorreu diferença nos números das células linfoides inatas CD4⁺IL-7R⁺ ou somente IL-7R⁺ entre camundongos controle ou infectado.

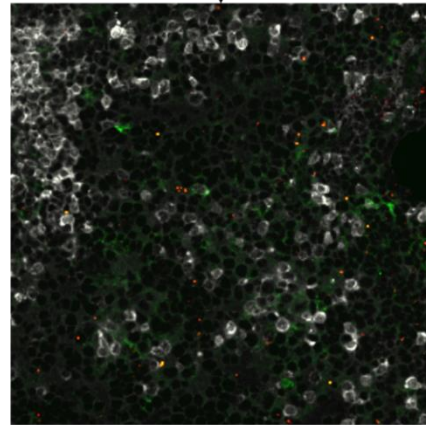
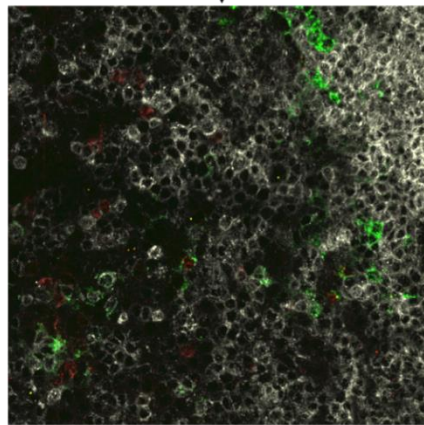
30 dias



60 dias



60 dias



90 dias

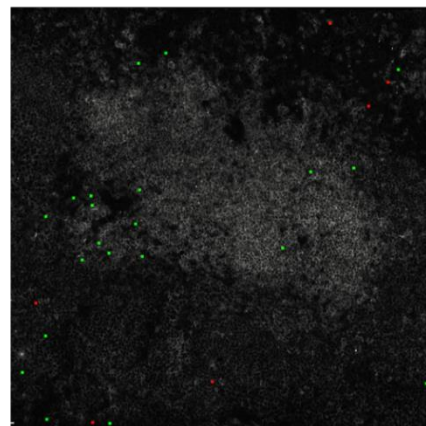
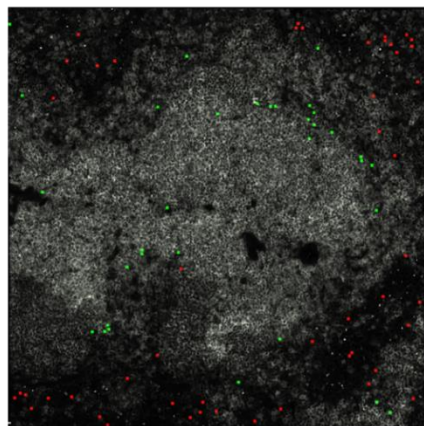


Figura 57: Fotomicrografias de células linfoides inatas em baço de camundongos. Mosaico de 9 fotos em aumento de 400x obtidas por microscópio confocal evidenciando as populações de células Linhagem- (cinza) CD4+IL-7R+ (verde) ou Linhagem- (cinza) CD4-IL-7R+ (vermelho) nos camundongos dos grupos infectado ou controle nos pontos de avaliação a 30, 60 e 90 dias após a injeção.

7.3 DISCUSSÃO

Evidenciamos neste capítulo que camundongos com LV apresentam alterações associadas à infecção, que são brandas e subclínicas, mas com eventos importantes de remodelamento tecidual por células e citocinas. Comparado ao hamster como modelo de LV disseminada, camundongos são, ainda que susceptíveis à infecção, modelos mais adequados para estudo de variáveis subclínicas (KUMAR; NYLÉN, 2012).

Através de infecção com 10^7 *Leishmania*/mL, observamos maior frequência de granulomas e leucocitose intrassinusoidal no fígado de camundongos com 30 dias de infecção (figura 41). Diferente de cães, em que esses aspectos foram associados a um perfil de susceptibilidade, foi demonstrado que o controle da infecção por *L. infantum* (*donovani*) em camundongos ocorre pela formação de granulomas hepáticos (ENGWERDA; ATO; KAYE, 2004; STANLEY; ENGWERDA, 2007). A infecção no fígado em camundongos é auto-resolvida, mediada por uma resposta T dependente e resposta efetiva a IFN- γ . De maneira similar, ocorre formação de granulomas a 30 dpi por infecção com 10^8 *Leishmania*/mL, que aumenta em intensidade no ponto subsequente (60dpi). No entanto, os eventos de leucocitose intrassinusoidal e infiltrado inflamatório no espaço porta perduram por um período maior de tempo, sugerindo que essa infecção leva a um perfil prolongado de inflamação como se espera em uma doença crônica. Folicúlos linfoides no linfonodo aparecem aumentados no experimento com maior dose de infecção (10^8 *Leishmania*/mL, Apêndice B), com resposta na fase inicial da infecção.

Carrión e colaboradores (2006) relataram que diferentes inóculos mostram maior número de características histopatológicas correlacionados à dose de infecção. No presente trabalho, seguindo dose de 10^7 *Leishmania*/mL, os folicúlos linfoides no baço tendem a aumentar nos primeiros meses de infecção (30 a 90 dias), com presença de centro germinativo (tabela 8). Sem desenvolver esplenomegalia, também não foi observada desorganização da PB do baço. Os camundongos infectados com 10^8 *Leishmania*/mL desenvolveram a 30 dias uma expansão da polpa

branca, com posterior redução a 60 dpi, porém sem desorganização dos microambientes linfoides (figura 43). Esplenomegalia foi observada a 60 e 90 dias da infecção. Desorganização do baço foi observada em grau moderado e em raros camundongos (tabela 8). Ocorre, no entanto, dinâmica entre as populações celulares na cinética da infecção, independente da dose de infecção.

Seguindo infecção com 10^7 *Leishmania*/mL, a proporção de macrófagos está diminuída em camundongos infectados 30 dias da infecção (Apêndice B, figura 13). Neste mesmo período, camundongos infectados com 10^8 *Leishmania*/mL mostram menor número de células dendríticas plasmocitoides. As primeiras comunicações celulares em consequência de infecção por *Leishmania* ocorrem entre células dendríticas, linfócitos T e macrófagos na ZM da PB (ENGWERDA; ATO; KAYE, 2004). É possível que esse seja um ponto tardio para observação de fenômenos relacionados ao estabelecimento da infecção. Seguindo infecção com *L. donovani* por via intravenosa com alta dose, esses eventos foram descritos entre 14 e 28 dias após a infecção (ENGWERDA; ATO; KAYE, 2004). Células dendríticas plasmocitoides são importantes produtoras de IFN- α , e sua redução pode estar relacionada à susceptibilidade à infecção nesta fase da doença (figura 51). Engwerda, Ato e Kaye (2004) relatam perda de macrófagos de ZM. Na infecção com 10^7 , a proporção de macrófagos na PV, avaliada em coloração H&E não esteve alterada. Realizamos, porém, imunofenotipagem de células estromais da ZM no experimento com 10^8 pela marcação de ER-TR9, presente exclusivamente em macrófagos da ZM (VAN VLIET; MELIS; VAN EWIJK, 1985). Evidenciamos desorganização da ZM, com tendência a menor área ocupada por essas células (figura 55, B). Esses dados sugerem que a redução de macrófagos observadas no experimento com 10^7 *Leishmania*/mL pode ter origem na ZM.

O maior número de alterações ocorre a 60 dias da infecção com 10^7 *Leishmania*/mL, evidenciado pela redução de células B e aumento de plasmócitos em camundongos infectados (Apêndice B, figuras 9 e 15). Esse achado pode estar relacionado com diferenciação anômala de linfócitos B, como observado na LV em cães (SANTANA et al., 2008; SILVA-O'HARE et al.,

2016). Apesar de plasmocitose estar associada à desorganização do tecido linfoide, esta não foi observada em camundongos. Na infecção com 10^8 *Leishmania*/mL, observamos aumento de plasmócitos e de células B (figuras 46 e 49). A presença de plasmócitos antígeno-específicos depende de uma diferenciação celular por células B naive em células B foliculares, que através de reconhecimento padrão BCR primadas por linfócitos T auxiliares, essas células formam centros germinativos e amadurecem em plasmócitos com alta afinidade para antígenos de *Leishmania* (RODRIGUES et al., 2016). No entanto, evidências mostram que a expansão de plasmócitos na LV ocorre por ativação policlonal, levando a maior concentração de IgG não específico (GHOSE et al., 1980; SILVA-O'HARE et al., 2016). Esses dados reforçam o achado que plasmócitos na LV apresentem funções efetoras diversas e diferenciação inespecífica associada a maior susceptibilidade à LV, visto que uma dose maior de inóculo desenvolveu esplenomegalia em camundongos.

Ainda a 60 dias da infecção, foi observada uma fração de células que não expressam CD3 e expressam CD4. Células com esse fenótipo estão descritas como células indutoras de tecido linfoide, um subtipo de células linfoides inatas do grupo 3 (*Innate lymphoid cells group 3 – ILC3*). Essas células tem participação na organização do tecido linfoide, por estabelecerem comunicação entre linfócitos T da PALS e macrófagos da ZM (CUPEDO; KRAAL; MEBIUS, 2002; LANE; GASPAL; KIM, 2005; MEBIUS, 2007). Seguindo infecção com 10^7 *Leishmania*/mL, linfócitos CD3-CD4⁺ apareceram em maior número a 60 dpi, sucedendo os possíveis eventos de redução da ZM pela diminuição de macrófagos a 30 dpi (Apêndice B, figura 11). Esse achado se mantém em infecção com 10^8 *Leishmania*/mL, experimento em que foi possível realizar imunomarcacão para localização espacial dessas células no tecido.

O maior número de células indutoras de tecido linfoide evidenciado por citometria de fluxo não foi observado em histo-citometria (figura 47), sendo o N um possível fator limitante. Contudo, mostramos que em camundongos do grupo controle, ILC3 estão na PV, e células indutoras de tecido linfoide estão localizadas ao redor da PALS e entre folículos linfoides e

PALS – como descrito na literatura (figura 57) (CUPEDO; KRAAL; MEBIUS, 2002; LANE; GASPAL; KIM, 2005; MEBIUS, 2007). Em camundongos infectados essas células não aparecem restritas à PALS, e sim distribuídas na PV juntamente com ILC3. Essas células são importantes na fase de embriogênese, requeridas para a formação de tecido linfóide. Já foi especulado que em tecidos adultos, desempenham função de reparo tecidual após inflamação local (MELO-GONZALEZ; HEPWORTH, 2017). É possível que o aumento ocorra em resposta ao estímulo causado por *L. infantum* em consequência da inflamação prolongada no baço, e que a distribuição desorganizada reflita as alterações de microambientes linfóides que acontecem pela infecção por *L. infantum*. Do nosso conhecimento, este é o primeiro relato da participação de ILC3 e células indutoras de tecido linfóide na LV.

A 60 dias da infecção com 10^8 *Leishmania*/mL, mostramos mudanças estruturais na área ocupada por células fibroblásticas reticulares gp38⁺ na PALS (figura 53). Por mensuração de área não ocorre diferença em número, mas a distribuição mais espalhada, acompanhada por expansão da PALS em camundongos infectados, pode ser observada qualitativamente. Este fenômeno já foi mostrado por Stanley e Engwerda (2006) que mostra perda da matriz reticular de células estromais gp38⁺ mediadas por TNF. Não observamos, porém, maior concentração de TNF em camundongos infectados nesta fase, aparecendo somente a 90dpi. A produção de TNF ocorre principalmente por macrófagos altamente parasitados (STANLEY; ENGWERDA, 2007). A 60 dias da infecção, não houve aumento de macrófagos em camundongos infectados.

A dinâmica do número de células dendríticas plasmocitoides se reproduz nas duas estratégias de infecção, porém, em tempos diferentes na cinética. A 90 dpi com 10^7 *Leishmania*/mL, essa população aparece reduzida em camundongos infectados, e o efeito se reverte no ponto seguinte, a 120 dpi quando camundongos infectados apresentam maior número dessas células (Apêndice B, figura 20). O mesmo acontece com a maior dose de infecção, porém mais precocemente. A 30 dpi esta população está diminuída e aumenta a 60 dpi, com aumento significativo a 90 dpi

(figura 51). Células dendríticas plasmocitoides estão associadas a proteção a longo prazo na infecção por *L. infantum*, através da produção de citocina IFN do tipo I (FEIJÓ et al., 2016). Na infecção com 10^8 *Leishmania*/mL, houve maior concentração de IFN no baço desses animais. Aliado à maior produção de IL-6, bem como tendência a maiores concentrações de IL-12p70, MCP-1 e TNF, esses resultados são sugestivos de um controle da infecção nesta fase da doença. Ainda que a produção dessas citocinas esteja contrabalanceada por IL-10, essas observações corroboram que a resistência a longo prazo ocorre por uma resposta predominantemente Th1 em camundongos BALB/c (RODRIGUES et al., 2016).

8. CAPÍTULO III - Avaliação sequencial das alterações em órgãos-alvo no curso da LV em modelo de esplenectomia – hamster e camundongo (objetivo específico #3)

Nos capítulos anteriores, esplenomegalia foi observada em hamster e camundongos independente de organização arquitetural do baço. Na verdade, esplenomegalia é comum entre seres humanos que desenvolvem a sintomatologia clássica da doença, em que o baço pode alcançar o quadrante inferior direito do abdome. Esta é uma condição que tem sido associada à hiperesplenismo (Dos-Santos et al., 2014). Nesta síndrome, o baço torna-se um importante sítio de retenção de leucócitos, hemácias e plaquetas, favorecendo leucopenia, anemia e trombocitopenia pela diminuição desses elementos na circulação.

Hiperesplenismo é uma possível explicação para o fato de uma parcela de pacientes não responderem ao tratamento convencional, que visa o controle do parasito, que no entanto não parece contribuir para a recuperação do baço neste estado. Nestes casos de múltiplas recidivas ao tratamento, esplenectomia terapêutica é recomendada. O fato de ocorrer uma melhora no estado geral do paciente sustenta a hipótese de que o baço em estado de exaustão contribui para a susceptibilidade à LV.

Sob esses aspectos, nesta parte do trabalho foi realizada uma investigação da infecção por *L. infantum* em outros órgãos-alvo da doença em modelo de esplenectomia em hamsters e camundongos. Foi realizado um estudo histopatológico, clínico e hematológico em hamsters após 120 dias de infecção intradérmica com 1×10^6 *L. infantum* e em camundongos BALB/c após 100 dias de infecção intraperitoneal com 1×10^7 *L. infantum*.

8.1 METODOLOGIA

8.1.1 Animais

Neste estudo foram utilizados 28 hamsters e 22 camundongos da linhagem BALB/c com 6-8 semanas de idade.

8.1.2 Esplenectomia

Para estudar o efeito da ausência do baço no curso da LV, decidimos infectar animais previamente submetidos a esplenectomia, com auxílio de um médico cirurgião colaborador. Os hamsters e camundongos foram anestesiados com uma dose de 0,1 mL/10g de solução com cetamina + xilazina (60mg de cetamina + 8mg de xilazina), por via intraperitoneal, ao nível da região inguinal direita, e anestésico inalatório isoflurano. Em seguida foi posicionado em decúbito dorsal na mesa operatória onde foi feita a imobilização dos membros. Foi realizada antissepsia com clorexidine degermante e logo em seguida clorexidine tópico em toda parede abdominal anterior. Foram colocados campos fenestrados e posteriormente realizada uma incisão mediana supraumbilical até o peritônio com bisturi número 3 e lâmina 15. Em seguida, utilizando pinças de reparo no peritônio, foi feita uma incisão no mesmo com uma tesoura de ponta romba. Utilizando de afastadores de Farabeuf pequeno, expusemos o baço ao nível do quadrante superior esquerdo. Afastamos o baço para visualização do pedículo vascular, individualizamos através de dissecação este pedículo e logo em seguida fizemos um pinçamento proximal e distal do mesmo com pinças de Kelly curvas pequenas. Foi realizada ligadura com fios de mononylon ancorado em três posições entre as pinças, para maior segurança da ligadura, para realizar em seguida uma incisão rente à pinça proximal do baço, retirando o órgão. Retiramos a outra pinça distal ao órgão, observamos se apresenta sangramento e logo em seguida fechamos a cavidade em planos individualizados. No peritônio utilizamos síntese contínua com monocril 4-0, na musculatura utilizamos síntese contínua com mononylon 4-0 e na pele utilizamos síntese com pontos simples utilizando fio mononylon 5-0. Observamos os animais diariamente por 30 dias avaliando possíveis

sangramentos e realizando limpeza da ferida operatória com solução fisiológica e clorexidine tópico.

8.1.3 Injeção

Camundongos: Promastigotas de *L. infantum* foram ressuspensas em uma concentração de 1×10^7 parasitos/mL em solução salina. Animais do grupo infectado foram inoculados com 1mL dessa suspensão parasitária. Animais do grupo controle foram injetados com 1mL de solução salina apenas. Todos os animais foram injetados por via intraperitoneal, no quadrante inferior esquerdo.

Hamsters: Promastigotas metacíclicas de *L. infantum* (cepa MHOM /BR2000 /Merivaldo2) de fase estacionária de cultivo in vitro foram isoladas por gradiente de ficoll e ressuspensas em uma concentração de 1×10^6 parasitos/20 μ l em solução salina. Animais do grupo infectado foram inoculados com 20 μ l dessa suspensão parasitária. Animais do grupo controle foram injetados com 20 μ l de solução salina. Todos os animais foram injetados por via intradérmica, em dois pontos da orelha esquerda.

8.1.4 Abordagem experimental

Para comparar as alterações dos órgãos-alvo de LV em animais sem o baço (esplenectomizados), incluímos um grupo de animais submetidos aos mesmos procedimentos de infecção, mas que não foram submetidos à esplenectomia (não-esplenectomizados). Os animais foram acompanhados semanalmente com referência a parâmetros clínicos. Para examinar as alterações histológicas, os camundongos foram eutanasiados a 100 dias pós-injeção e hamsters foram eutanasiados a 120 dias pós-injeção (figura 58).

Modelo experimental	Injeção		Acompanhamento
	Controle (N)	Infectado (N)	
Hamster			
Esplenectomizado	Solução salina 20µl i.d. (7)	10 ⁶ L. infantum i.d. (7)	120 dias
Não-esplenectomizado	Solução salina 20µl i.d. (6)	10 ⁶ L. infantum i.d. (8)	
Camundongo			
Esplenectomizado	Solução salina 1mL i.p. (6)	10 ⁷ L. infantum i.p. (6)	100 dias
Não-esplenectomizado	Solução salina 1mL i.p. (5)	10 ⁷ L. infantum i.p. (5)	

Figura 58: Abordagem experimental do estudo sequencial de leishmaniose visceral em modelo de esplenectomia de hamsters e camundongos. Ilustração esquematizando a estratégia de injeção de hamsters e camundongos dos grupos controle e infectado, esplenectomizados e não-esplenectomizados. Acompanhamento com referência a parâmetros clínicos e histológicos por 120 dias com hamsters e 100 dias com camundongos.

8.1.5 Exame bioquímico e hematológico

Os animais foram anestesiados com solução de cetamina + xilazina (60mg de cetamina + 8mg de xilazina, 0,1 mL/10g) por via intraperitoneal. Foram então colhidos 1 mL de sangue por punção cardíaca e fracionado em tubos com ou sem anticoagulante. As amostras de sangue e soro foram submetidas à contagem de leucograma e eritograma e às seguintes provas bioquímicas: proteínas totais e frações, creatinina, TGO e TGP séricos.

8.1.6 Eutanásia e necropsia

Os camundongos foram submetidos à necropsia com coleta de fragmentos de fígado e linfonodo paratímico. Os hamsters foram submetidos a necropsia com coleta de fragmentos de fígado, intestino, linfonodo retroauricular, pele, pulmão e rim.

8.1.7 Parâmetros de análise histológica

As secções de fragmentos de tecidos dos animais foram examinadas com auxílio de dois médicos patologistas e de acordo com os parâmetros de avaliação histológica mencionados em metodologia geral (5.8).

8.2 RESULTADOS

8.2.1 Avaliação clínica

As principais alterações clínicas foram lesões cutâneas, caracterizadas por crostas e arranhões em tórax, abdômen, focinho e patas, porém sem diferença entre os grupos (figura 59, A). Não houve diferença de peso entre os grupos. Em camundongos não foi observado nenhum sinal clínico de LV (figura 59, B) ou diferença de peso entre os animais controle e infectado.

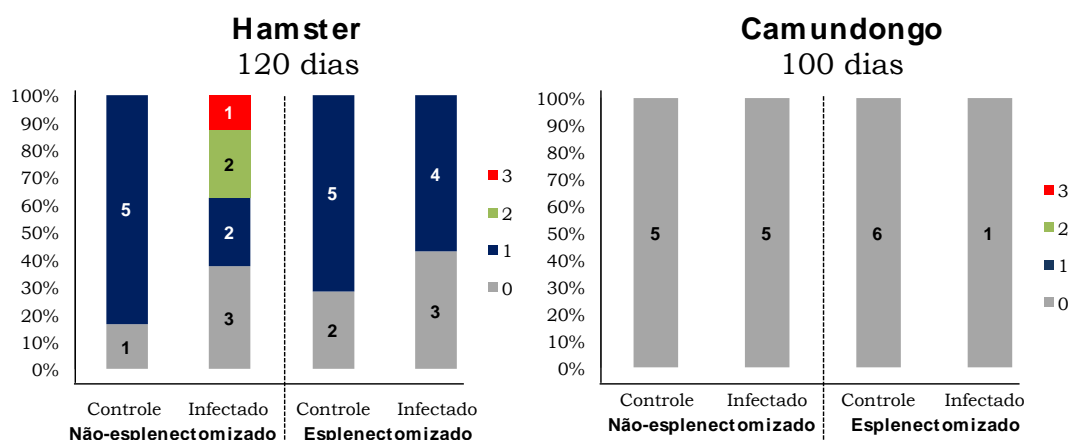


Figura 59: Frequência e intensidade de sinais clínicos de leishmaniose visceral em hamsters e camundongos. Representação gráfica da avaliação clínica de hamsters e camundongos, esplenectomizados ou não-esplenectomizados, dos grupos controle e infectado. Classificação de escore de sinais clínicos: 0= ausência, 1= um sinal clínico, 2= dois sinais clínicos, 3= três ou mais sinais clínicos.

Houve elevada perda de camundongos infectados esplenectomizados (5/6), com percentual de sobrevivência menor que os camundongos esplenectomizados não infectados (1/6, $p=0,002$) (figura 60).

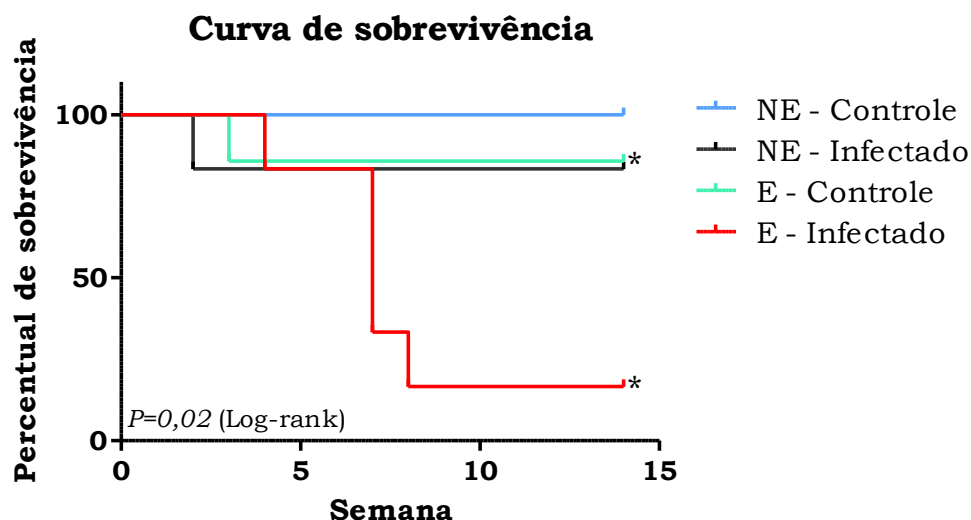


Figura 60: Curva de sobrevivência de camundongos. Animais controle e infectados, esplenectomizados (E) ou não-esplenectomizados (NE), acompanhados por 100 dias.

*Diferença entre camundongos esplenectomizados ($p=0,02$).

8.2.2 Avaliação hematológica e bioquímica - Hamster

Devido à insuficiência de amostra, somente foi realizada análise bioquímica e hematológica em hamsters (tabela 17). Em hamsters esplenectomizados, a média de contagem de eosinófilos foi menor em hamsters infectados ($57,2 \pm 23,3$, $p=0,04$). Em hamsters não-esplenectomizados, houve menor média percentual de CHGM em hamsters infectados ($35,6 \pm 0,9$, $p=0,04$). A média contagem de plaquetas foi inferior em hamsters infectados (511600 ± 70095 , $p=0,008$).

Tabela 17. Avaliação bioquímica sérica e hematológica de hamsters esplenectomizados ou não-esplenectomizados, dos grupos controle ou infectados.

Parâmetros	Esplenectomizado		Não-esplenectomizado	
	Controle	Infectado	Controle	Infectado
Proteínas totais ^a	4,6 [4,6–7]	5,2 [4,3–6,7]	4,8 [4,2–4,8]	4,8 [3,7–5,9]
Albumina ^a	2,4 [2,2–3,4]	2,9 [2,2–3,7]	2,5 [2,2–2,6]	2,7 [1,8–2,9]
Globulina ^a	2,6 [2,2–3,5]	2,2 [2–3,2]	2,5 [2,2–2,6]	2,5 [1,7–2,8]
Creatinina ^a	0,4 [0,3–0,4]	0,3 [0,3–0,4]	0,4 [0,3–0,4]	0,4 [0,3–0,5]
TGO ^b	116 [46–345]	119 [67–149]	95,5 [39–188]	188,5 [57–334,5]
TGP ^b	80 [51–223]	87 [60–131]	69 [39,2–117]	125 [38,5–318]
Hemácias	6,2x10 ⁶ ±704 154	6,8x10 ⁶ ±49232 2	6,7x10 ⁶ ±47504 4	6,7x10 ⁶ ±506952
Hemoglobina ^c	14 [11,8–14]	14,3 [13–14,4]	14,1 [13–14,7]	13,5 [13,3–14,5]
Hematócrito ^c	38,5 [32–39]	38 [36–39]	38 [36 – 4,2]	38 [37 – 41,5]
VGM ^c	56 [55–56]	55 [54–57]	56 [56–57,7]	58 [56,5–59]
HGM ^c	20 [20–20,7]	20 [20–21]	21 [21 – 21]	20 [20–21,5]
CHGM ^c	36,5±0,5	36,7±0,9	36,8±0,5	35,6±0,9*
Leucócitos	3800±1846	4571±1352	4867±1250	4520±1831
Neutrófilos	1779±876,9	2113±635,8	2875±689,8	2258±1019
Linfócitos	1766±867	2309±688,7	2054±514,2	1983±716,4
Monócitos	142,3±72	91,8±32	130,3±6,08	189,4±75,7
Eosinófilos	118,8±86	57,2±23,3*	104,7±84,8	90,4±36,6
Plaquetas	565000±961 42	602143±88879	683500±87074	511600±70095 **

Nota: a= mg/dl; b= U/L; c= percentual; *= Kruskal-Wallis test, p=0,04, diferença entre controle e infectado; **= Kruskal-Wallis test, p=0,008.

8.2.3 Análise histológica - Hamster

Pele

Infiltrado inflamatório foi observado em hamsters infectados, independente de esplenectomia. Os animais não esplenectomizados apresentaram infiltrado inflamatório com a presença de Schaumann Bodies (4/8 infectados), sem significância estatística.

Linfonodo

Os animais esplenectomizados infectados granulomas na zona paracortical (6/7, $p=0,02$) (figura 61). Não ocorreram alterações significantes no linfonodo de animais não esplenectomizados infectados, além de acúmulo de células epitelioides e gigantes (5/8 infectados) e presença de Schaumann Bodies (2/8 infectados).

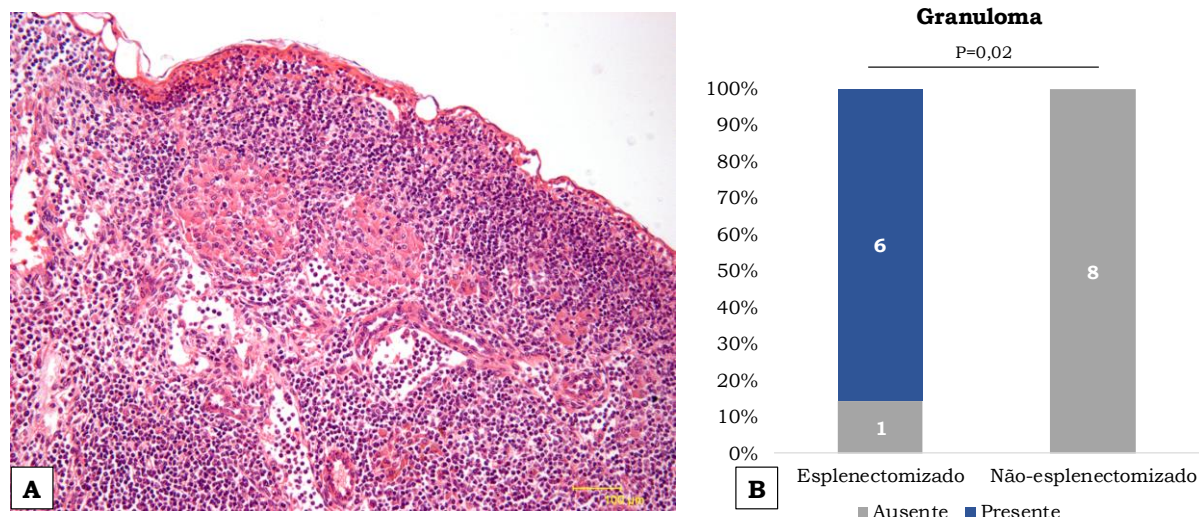


Figura 61: Fotomicrografia de linfonodo de hamster esplenectomizado. (A) granulomas na paracortical e quantificação de granulomas por frequência (B) entre hamsters infectados esplenectomizados ou não-esplenectomizados. H&E, x200.

Rim

Cilindros e focos de calcificação foram observados nos animais independente de infecção ou de esplenectomia. As alterações de expansão de matriz mesangial foram discretas e similares entre os grupos.

Fígado

Granulomas foram observados parênquima e espaço porta em 6/7 hamsters esplenectomizados infectados (figura 62, A) e infiltrado portal com predomínio de macrófagos em todos os animais infectados (figura 62, B).

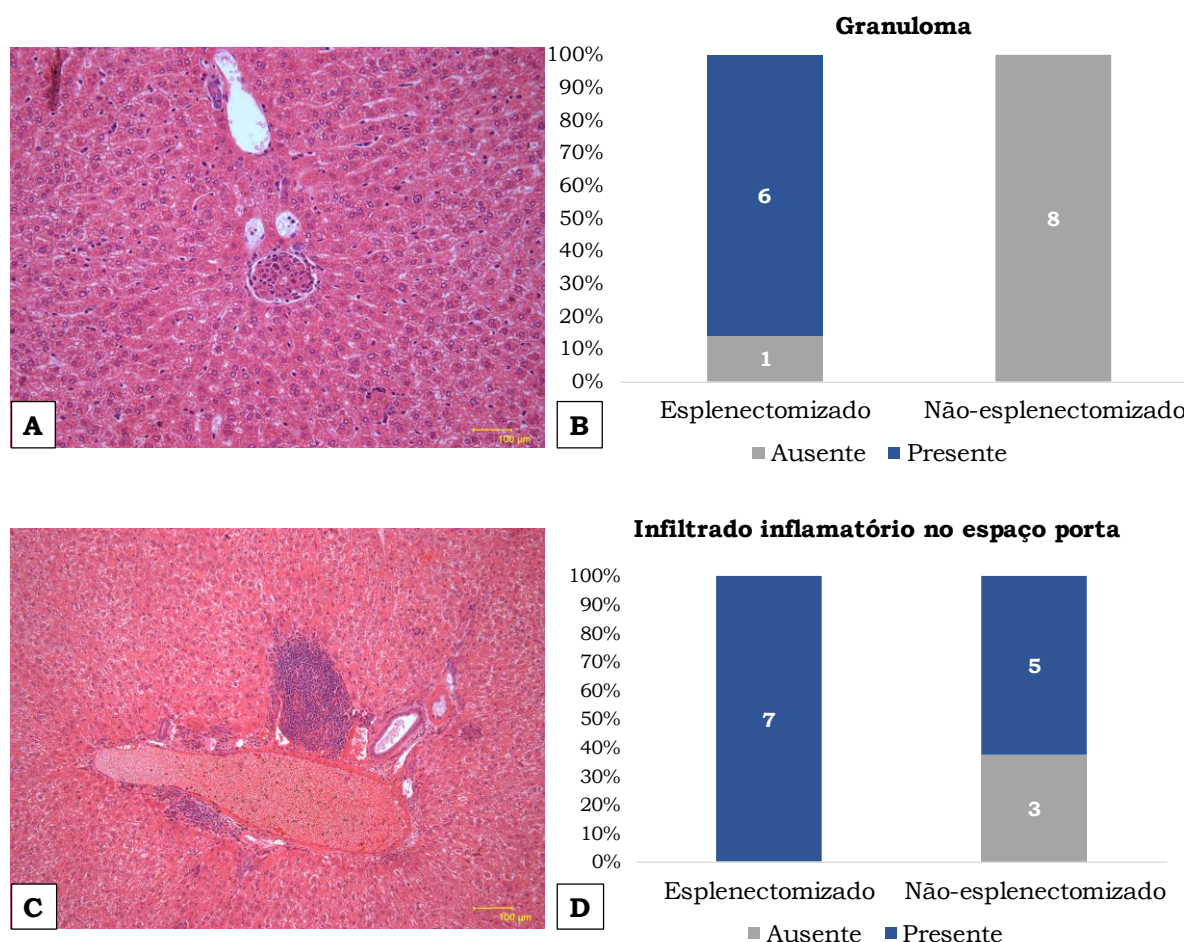


Figura 62: Fotomicrografias de fígado de hamsters esplenectomizados. (A) Fotomicrografia de granuloma em hamster infectado esplenectomizado, e quantificação de granuloma por frequência entre hamsters infectados esplenectomizados e não esplenectomizados (B). Fotomicrografia de infiltrado inflamatório em espaço porta de hamster infectado esplenectomizado (C), e quantificação de infiltrado inflamatório em espaço porta por frequência entre hamsters infectados esplenectomizados e não esplenectomizados (D). Tecidos corados em H&E, aumento de 200x.

8.2.4 Análise histológica - Camundongos

Linfonodo

Não houve alterações significativas nos linfonodos de camundongos não esplenectomizados ou esplenectomizados, independente de infecção.

Fígado

Presença de infiltrado inflamatório em espaço porta foi distribuída de maneira similar entre os grupos. Infiltrado inflamatório no parênquima foi observada apenas no animal esplenectomizado infectado (figura 63).

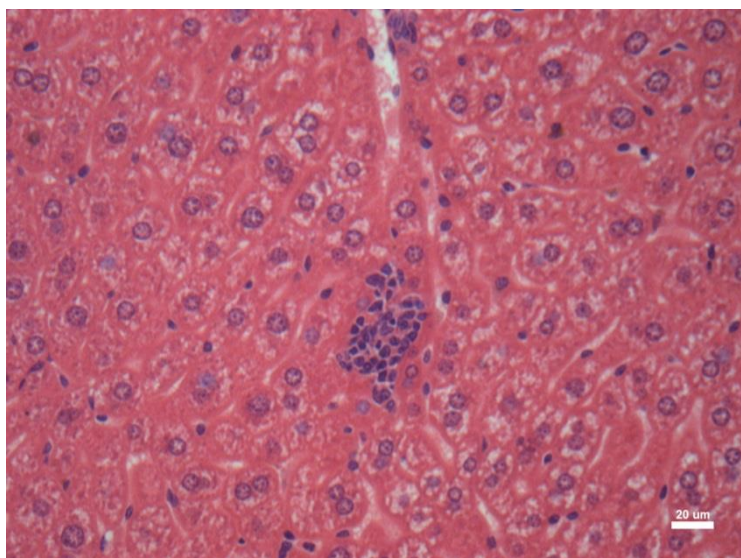


Figura 63: Fotomicrografia de fígado de camundongo esplenectomizado. Granuloma no parênquima de camundongo esplenectomizado. Coloração H&E, x200.

8.3 DISCUSSÃO

Estudamos neste capítulo as características histológicas desenvolvidas pela infecção por *L. infantum* na ausência do baço nos dois modelos de infecção para avaliar o impacto da função do baço na patogênese da LV. Mostramos baço tem papel central na proteção contra a doença, ao demonstrar que sua ausência implica em elevada letalidade de camundongos. Ocorre maior inflamação em órgãos-alvo da LV em hamsters esplenectomizados, mas que não reflete na apresentação clínica.

Hamsters infectados não esplenectomizados apresentaram maior número de sinais clínicos e laboratoriais, como concentração mais baixa de hemoglobina corpuscular média (CHGM) e menor número de plaquetas. Estas alterações são compatíveis com a LV em seres humanos e cães (DOS-SANTOS et al., 2014; LIMA et al., 2014). Ocorre ainda maior intensidade de infiltrado inflamatório na pele em hamsters não esplenectomizados. Em contrapartida, hamsters infectados esplenectomizados apresentaram maior número de alterações histopatológicas em órgãos-alvo de LV, mas que não reflete na avaliação clínica e sem repercussão laboratorial de avaliação bioquímica e de hemograma. Ocorre maior frequência de granulomas em linfonodo que hamsters não esplenectomizados. No fígado, a presença de granulomas e infiltrado inflamatório no espaço porta apresentou maior tendência em frequência e intensidade em hamsters esplenectomizados, que não foi estatisticamente diferente de hamsters não-esplenectomizados.

É sabido que a esplenectomia é utilizada como medida terapêutica em seres humanos que não respondem ao tratamento (ALON; CHOWERS, 2012; REES, 1984). Uma possível explicação para o fato desses pacientes melhorarem o estado geral após a retirada do baço pode ser pela ocorrência de hiperesplenismo. O tratamento convencional da LV é direcionado ao controle do parasito. Em fase crônica da doença, o baço não é mais responsivo à infecção e não há tratamento para reversão de sua função. Na realidade, este estado de exaustão do baço tem sido alvo de investigação. Marcadores de exaustão do sistema imune aparecem superexpressos no baço em estágios tardios da progressão da LV (ESCH et al., 2013). É possível

que a infecção persistente no baço contribua para o agravamento da LV de tal forma que a doença seja similar como observada em hamsters previamente esplenectomizados.

Tem sido especulado que o controle da LV em camundongos ocorra no fígado (KAYE et al., 2004). Entretanto, mostramos elevada letalidade de camundongos esplenectomizados. Essa observação sugere um papel sincronizado entre baço e fígado na função de proteção do camundongo contra a infecção por *L. infantum*. Devido à alta perda de indivíduos, não foi possível inferir sobre marcadores de gravidade que podem contribuir para a morte por LV em camundongos sem o baço.

9. DISCUSSÃO GERAL

O conjunto de dados já discutidos confirmam que a infecção por *L. infantum* altera o baço substancialmente nas diferentes fases da LV, e tem impacto no estabelecimento e agravamento da infecção. Mostramos que as alterações estruturais do baço resultam de um estado inflamatório de longa duração com morte de populações celulares, produção anormal de citocinas e migração inadequada de células leucocitárias e estromais causadas pela infecção por *L. infantum*; que a desorganização de microambientes linfoides associada a LV interfere com as interações celulares no órgão e contribui para a resposta inadequada à *Leishmania*.

Hamsters desenvolvem leishmaniose visceral crônica e progressiva como relatada em cães e seres humanos, com regulação gênica de desorganização dos microambientes linfoides, observada em níveis de transcrito e tecidual. Camundongos, por sua vez, não são modelo adequados para estudo de gravidade, por desenvolver doença subclínica com alterações nas primeiras fases da doença e sem desorganização do baço, mas que fornece importantes informações acerca da dinâmica de remodelamento tecidual do ponto de vista fenotípico.

Identificamos neste trabalho potenciais marcadores precoces de gravidade na LV – DLK1 e CDKN2A – que possam ser utilizados na definição no diagnóstico na identificação de casos propensos a um desfecho letal, assim como na definição de estratégias de tratamento que inibam a progressão desses casos.

10. CONCLUSÕES

1. A infecção por *Leishmania infantum* induz alterações sequenciais na estrutura da polpa branca do baço;
2. Desorganização da polpa branca do baço é geneticamente regulada na cinética da infecção e está associada ao agravamento da doença em hamsters;
3. A expressão de CDKN2A aumenta e DLK1 diminui na progressão da doença, associados a moléculas e células envolvidas na desorganização do baço;
4. Células e citocinas participam no remodelamento tecidual esplênico, mas sem desorganização da polpa branca na infecção por *L. infantum* subclínica em camundongos;
5. Esplenectomia apresenta lesões histológicas mais intensas em hamsters e LV mais grave em camundongos, contribuindo para alta letalidade.

REFERÊNCIAS

- ABREU, C. B. DE *et al.* Aspectos clínicos, patológicos e sorológicos da toxoplasmose experimental em cães jovens. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 123–129, 18 maio 2001.
- ALON, D, CHOWERS, M. Successful therapeutic splenectomy in an HIV patient with relapsing visceral leishmaniasis. **International Journal of STD & AIDS**, v.4, p. 289–290, 2012.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 31 maio 2012.
- ANDRADE, T. M.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H. Bacterial infections in patients with visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 162, n. 6, p. 1354–1359, dez. 1990.
- ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G. Some new aspects of the kala-azar pathology. (Morphologic study of 13 autopsy cases). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 8, n. 6, p. 259–266, nov. 1966.
- ANDRADE, Z. A.; BINA, J. C. A patologia da forma hepato-esplênica da esquistossomose mansoni em sua forma avançada (estudo de 232 necrópsias completas). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 78, n. 3, p. 285–305, jul. 1983.
- ANSEL, K. M. *et al.* A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. **Nature**, v. 406, n. 6793, p. 309–314, 20 jul. 2000.
- ARNOLDI, J.; MOLL, H. Langerhans cell migration in murine cutaneous leishmaniasis: regulation by tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and macrophage inflammatory protein-1 alpha. **Developmental Immunology**, v. 6, n. 1–2, p. 3–11, 1998.
- ASHWIN, H. *et al.* Tissue and host species-specific transcriptional changes in models of experimental visceral leishmaniasis. **Wellcome Open Research**, v. 3, p. 135, 2018.
- AUERBACH, A. *et al.* Splenic manifestations of chronic autoimmune disorder: a report of five cases with histiocytic necrotizing change in four cases. **Histopathology**, v. 63, n. 1, p. 19–28, jul. 2013.
- BADARO, R. *et al.* A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 4, p. 639–649, out. 1986.
- BEYER, T.; MEYER-HERMANN, M. Mechanisms of organogenesis of primary lymphoid follicles. **International Immunology**, v. 20, n. 4, p. 615–623, abr. 2008.

- BLACKWELL, J. M. *et al.* Role of Lsh in regulating macrophage priming/activation. **Research in immunology**, v. 140, n. 8, p. 798–805, out. 1989.
- BLOOM, W. *et al.* Textbook of Histology. Philadelphia: Saunders, 720 p., 1962.
- BORGES, V. M.; VANNIER-SANTOS, M. A.; DE SOUZA, W. Subverted transferrin trafficking in Leishmania-infected macrophages. **Parasitology Research**, v. 84, n. 10, p. 811–822, 1998.
- BROX, A.; SHUSTIK, C. Non-Hodgkin's lymphoma of the spleen. **Leukemia & lymphoma**, v. 11, n. 3-4, p. 165–171, out. 1993.
- BROZMAN, M. Outer mantle zone of the follicle in the human spleen. **Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histopathology**, v. 407, n. 1, p. 107–117, 1985.
- CADMAN, E. T. *et al.* Alterations of splenic architecture in malaria are induced independently of Toll-like receptors 2, 4, and 9 or MyD88 and may affect antibody affinity. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 9, p. 3924–3931, set. 2008.
- CÁNEPA, E. T. *et al.* INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. **IUBMB Life**, v. 59, n. 7, p. 419–426, 2007.
- CARRIÓN, J. *et al.* Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 5, p. 173–183, maio 2006.
- CERUTTI, A.; PUGA, I.; COLS, M. Innate control of B cell responses. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 5, p. 202–211, maio 2011.
- CERUTTI, A.; PUGA, I.; COLS, M. New helping friends for B cells. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 8, p. 1956–1968, ago. 2012.
- CESTA, M. F. Normal structure, function, and histology of the spleen. **Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 5, p. 455–465, 2006.
- CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Publishing Group**, v. 5, n. 11, p. 873–882, nov. 2007.
- COSTA, C. H. N. *et al.* Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 386–392, jul. 2010.
- CROCKER, P. R.; DAVIES, E. V.; BLACKWELL, J. M. Variable expression of the murine natural resistance gene Lsh in different macrophage populations infected in vitro with Leishmania donovani. **Parasite Immunology**, v. 9, n. 6, p. 705–719, nov. 1987.

CUPEDO, T.; KRAAL, G; MEBIUS, R.E., 2002. The role of CD45+CD4+CD3- cells in lymphoid organ development. **Immunological Reviews**, v.189, p. 41-50. 2002.

DA SILVA, A. V. A. *et al.* Morphophysiological changes in the splenic extracellular matrix of *Leishmania infantum*-naturally infected dogs is associated with alterations in lymphoid niches and the CD4+ T cell frequency in spleens. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. e0006445, 20 abr. 2018.

DA SILVA, R.; SACKS, D.L. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. **Infection and Immunity**, v. 11, n. 55, 2802-6, nov. 1987.

DE ALMEIDA, M. C. *et al.* Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 861–870, out. 2003.

DE CASTRO, M. B. *et al.* Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v. 119, n. 1, p. 73–86, 5 jan. 2004.

DE LIMA, V. M. F. *et al.* Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral blood of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 2-4, p. 147–153, 23 mar. 2012.

DE PAIVA-CAVALCANTI, M. *et al.* Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & Bioscience**, v. 5, p. 31, 2015.

DEAN, K. M.; QIN, Y.; PALMER, A. E. Visualizing metal ions in cells: An overview of analytical techniques, approaches, and probes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 9, p. 1406–1415, 1 set. 2012.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Public health aspects and control. **Clinics in dermatology**, v. 14, n. 5, p. 417–423, 1 set. 1996.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 239–243, 1 maio 2001.

DKHIL, M. A. E. Apoptotic changes induced in mice splenic tissue due to malaria infection. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi**, v. 42, n. 1, p. 13–18, fev. 2009.

DONOVAN, M. J. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induced by *Leishmania* infection of human dendritic cells. **Parasite Immunology**, v. 34, n. 10, p. 464–72, out. 2012.

DOS-SANTOS, W. L. C. *et al.*. Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniosis. **Parasitology Research**, v. 92, n. 2, p. 89–94, 1 jan. 2004.

DOS-SANTOS, W. L. *et al.* A case of conventional treatment failure in visceral leishmaniasis: leukocyte distribution and cytokine expression in splenic compartments. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, p. 491, 2014.

ELLYARD, J. I. *et al.* Contribution of stromal cells to the migration, function and retention of plasma cells in human spleen: potential roles of CXCL12, IL-6 and CD54. **European Journal of Immunology**, v. 35, n. 3, p. 699–708, mar. 2005.

ENGWERDA, C. R.; ATO, M.; KAYE, P. M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 11, p. 524–530, nov. 2004.

ESCH, K.J. *et al.* PD-1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. **Journal of Immunology**, v. 11, p. 5542–5550. 2013.

ESPITIA, C. M. *et al.* Transcriptional profiling of the spleen in progressive visceral leishmaniasis reveals mixed expression of type 1 and type 2 cytokine-responsive genes. **BMC Immunology**, v. 15, p. 38, 26 nov. 2014.

FEIJÓ, D. *et al.* Dendritic Cells and *Leishmania* Infection: Adding Layers of Complexity to a Complex Disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 1–9, 19 jan. 2016.

FOX, C. H.; COTTLER-FOX, M. The pathobiology of HIV infection. **Immunology today**, v. 13, n. 9, p. 353–356, set. 1992.

FÖRSTER, R. *et al.* A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. **Cell**, v. 87, n. 6, p. 1037–1047, 13 dez. 1996.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: New perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317–2336, 2009.

GANGNEUX, J. P. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase activity as a potential biomarker of immune suppression during visceral leishmaniasis. **Innate Immunity**, v. 19, n. 6, p. 564–568, 2013.

GANTT, K. R. *et al.* Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 167, n. 2, p. 893–901, 15 jul. 2001.

GAUR, U. *et al.* An Effect of Parasite-Encoded Arginase on the Outcome of Murine Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 12, p. 8446–8453, 2007.

- GHALIB, H. W. *et al.* IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. **Journal of Immunology**, v. 154, n. 9, p. 4623–4629, 1 maio 1995.
- GHOSE, A C. *et al.* Serological investigations on Indian kala-azar. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 40, p. 318–326, 1980.
- GIFAWESEN, C., FARRELL, J.P. Comparison of T-cell responses in self-limiting versus progressive visceral *Leishmania donovani* infections in golden hamsters. **Infection and Immunity**, v. 57, p. 3091-3096. 1989.
- GIGLEY *et al.* T Cell exhaustion in protozoan disease. **Trends in Parasitology**, v.9, p. 377-84. 2012.
- GIUNCHETTI, R. C. *et al.* Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 84, n. 2, p. 269–277, 1 abr. 2008.
- GLATMAN ZARETSKY, A. *et al.* Infection with *Toxoplasma gondii* alters lymphotoxin expression associated with changes in splenic architecture. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 10, p. 3602–3610, out. 2012.
- GRANT, C. F. *et al.* Assessment of T-dependent and T-independent immune responses in cattle using a B cell ELISPOT assay. **Veterinary Research**, v. 43, n. 1, p. 68, 10 out. 2012.
- HAAN, DEN, J. M.; MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Stromal cells of the mouse spleen. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 201, 2012.
- HAG, EL, I. A. *et al.* Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kala-azar). **Journal of Clinical Pathology**, v. 47, n. 6, p. 547–551, jun. 1994.
- HARGREAVES, D. C. *et al.* A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. **The Journal of experimental medicine**, v. 194, n. 1, p. 45–56, 2 jul. 2001.
- HERMIDA, M. D'EL-R. *et al.* Histological Disorganization of Spleen Compartments and Severe Visceral Leishmaniasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 8, p. 394, 13 nov. 2018.
- HERMIDA, M. D. R. **Fagócitos mononucleares inflamatórios potencialmente envolvidos no transporte de *Leishmania* em hospedeiros vertebrados.** 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Salvador, Brasil, 2007.
- HERMIDA, MDR. **Transporte de *Leishmania* do sítio inflamatório para o linfonodo drenante: potenciais fagócitos envolvidos e cinética de disseminação.** 2013. 116 f. Tese (Doutorado) - Salvador, Brasil, 2013.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191–1199, 2 out. 1999.

KAMHAWI, S. Protection Against Cutaneous Leishmaniasis Resulting from Bites of Uninfected Sand Flies. **Science**, v. 290, n. 5495, p. 1351–1354, 17 nov. 2000.

KAYE, P. M. *et al.* The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunological Reviews**, v. 201, n. 1, p. 239–253, out. 2004.

KEENAN, C. M. *et al.* Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. II. Pathology. **Veterinary Pathology**, v. 21, n. 1, p. 80–86, jan. 1984.

KIM, C. H. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. **Journal of Blood Medicine**, v. 1, p. 13–19, 2010.

KITAMURA, H. *et al.* Systemic lupus erythematosus with multiple calcified fibrous nodules of the spleen. **Acta Pathologica Japonica**, v. 35, n. 1, p. 213–226, jan. 1985.

KONG, F. *et al.* Transcriptional Profiling in Experimental Visceral Leishmaniasis Reveals a Broad Splenic Inflammatory Environment that Conditions Macrophages toward a Disease-Promoting Phenotype. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 1, p. e1006165, jan. 2017.

KRAAL, G. Cells in the marginal zone of the spleen. **International Review of Cytology**, v. 132, p. 31–74, 1992.

KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 251, 2012.

KYAW, M. H. *et al.* Evaluation of severe infection and survival after splenectomy. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 3, p. 276.e1–7, mar. 2006.

LANE, P.J., GASPAL, F.M.; KIM, M.Y. Two sides of a cellular coin: CD4(+)CD3- cells regulate memory responses and lymph-node organization. **Nature reviews immunology**, v.8, p. 665–60. 2005.

LAURENTI, M. D. *et al.* Experimental visceral leishmaniasis: sequential events of granuloma formation at subcutaneous inoculation site. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 71, n. 6, p. 791–7, 1990.

LEPIDI, H. *et al.* Comparative pathology, and immunohistology associated with clinical illness after Ehrlichia phagocytophila-group infections. **The American Journal of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 62, n. 1, p. 29–37, 1 jan. 2000.

LIMA, I. S. *et al.* Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e87742, 2014.

LIMA, I.S. **Patologia da Leishmaniose Visceral Canina: Ênfase no significado da resposta inflamatória granulomatosa no fígado**. 2017. 101 f. il. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2017.

LIMA, V. M. F. DE *et al.* Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral blood of L. (L.) chagasi naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 2–4, p. 147–153, 23 mar. 2012.

LOPES-CARVALHO, T.; FOOTE, J.; KEARNEY, J. F. Marginal zone B cells in lymphocyte activation and regulation. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, n. 3, p. 244–250, jun. 2005.

LUZ, N. F. *et al.* Heme Oxygenase-1 Promotes the Persistence of Leishmania chagasi Infection. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 9, p. 4460–4467, 2012.

MACLENNAN, I. C. Germinal centers. **Annual Review of Immunology**, v. 12, n. 1, p. 117–139, 1994.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Cytokine and Phenotypic Cell Profiles of Leishmania infantum Infection in the Dog. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, n. 3, p. 541571–7, 2012.

MAKALA, L. H. C. *et al.* Leishmania major attenuates host immunity by stimulating local indoleamine 2,3-dioxygenase expression. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 5, p. 715–725, 2011.

MARTIN, M. E.; BUNNELL, J. E.; STEPHEN DUMLER, J. Pathology, Immunohistology, and Cytokine Responses in Early Phases of Human Granulocytic Ehrlichiosis in a Murine Model. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 374–378, 1 jan. 2000.

MCCONVILLE, M. J.; NADERER, T. Metabolic Pathways Required for the Intracellular Survival of Leishmania. **Annual Review of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 543–561, 13 out. 2011.

MCKENNA, K., BEIGNON, A.S., BHARDWAJ, N. Plasmacytoid Dendritic Cells: Linking Innate and Adaptive Immunity. **Journal of Virology**, v. 1, p. 17–27. 2005.

MEBIUS, R.E. Educating stroma. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, p. 79–80. 2007.

MEBIUS, R. E. Lymphoid Organogenesis: Educating stroma. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 79–80, 1 fev. 2007.

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

MEDINA-COLORADO, A. A. *et al.* Splenic CD4⁺ T cells in progressive visceral leishmaniasis show a mixed effector-regulatory phenotype and impair macrophage effector function through inhibitory receptor expression. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0169496, 2017.

MELBY, P.C. *et al.* Leishmania donovani: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. **Experimental parasitology**, v.1, p. 17-25. 2001.

MELBY, P. C. *et al.* The Hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent th1-like cytokine response. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 3, p. 1912–1920, 2001.

MELO-GONZALEZ, F.; HEPWORTH, M. R. Functional and phenotypic heterogeneity of group 3 innate lymphoid cells. **Immunology**, v. 150, n. 3, p. 265–275, 2017.

MOK, C. C.; LAU, C. S. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Journal of Clinical Pathology**, v. 56, n. 7, p. 481–490, jul. 2003.

OLINA, D. K.; DIMAIO, V. J. M. Normal organ weights in men: part II-the brain, lungs, liver, spleen, and kidneys. **The American Journal of Forensic Medicine and Pathology**, V. 33, n. 4, p. 368–372, dez. 2012.

MURRAY, H. W. *et al.* IFN- γ -induced macrophage antileishmanial mechanisms in mice: A role for immunity-related GTPases, Irgm1 and Irgm3, in Leishmania donovani infection in the liver. **Experimental Parasitology**, v. 157, p. 103–109, out. 2015.

NUNES, C. M. *et al.* Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 153, n. 1-2, p. 19–23, 6 maio 2008.

NYLÉN, S.; KUMAR, R. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, 14 ago. 2012.

OLANO, J. P. *et al.* Histologic, Serologic, and Molecular Analysis of Persistent Ehrlichiosis in a Murine Model. **The American Journal of Pathology**, v. 165, n. 3, p. 997–1006, 1 set. 2004.

OLIVEIRA, J. B. Marginal zone B-cell dysfunction in ALPS. **Blood**, v. 124, n. 10, p. 1542–1543, 4 set. 2014.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 7, p. 499–511, 2002.

PEREIRA, S. A. DE L. *et al.* Morphometric study of the spleen in chronic Chagas' disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 4, p. 401–403, abr. 2002.

PEREZ, L. E. *et al.* Reduced nitric oxide synthase 2 (NOS2) promoter activity in the Syrian hamster renders the animal functionally deficient in NOS2 activity and unable to control an intracellular pathogen. **Journal of Immunology**, v. 176, n. 9, p. 5519–5528, 1 maio 2006.

PETERS, N. C. *et al.* In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 15 ago. 2008.

PETERS, N. C.; SACKS, D. L. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 1290–1296, set. 2009.

PINELLI, E. *et al.* Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 1, p. 229–235, jan. 1994.

POZO, A. L.; GODFREY, E. M.; BOWLES, K. M. Splenomegaly: investigation, diagnosis and management. **Blood Reviews**, v. 23, n. 3, p. 105–111, maio 2009.

QUINNELL, R. J. *et al.* The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. **Parasitology**, v. 115 (Pt 2), p. 143–156, ago. 1997.

RAGHUNANDAN, R. *et al.* Dlk1 Influences Differentiation and Function of β Lymphocytes. **Stem Cells and Development**, v. 17, n. 3, p. 495–508, 2008.

RATLEDGE, C.; DOVER, L. G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annual Review Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 881–941, 28 nov. 2003.

REEME, A. E.; MILLER, H. E.; ROBINSON, R. T. IL12B expression is sustained by a heterogenous population of myeloid lineages during tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 93, n. 3, p. 343–356, maio 2013.

REES, M. J. Black Hole Models for Active Galactic Nuclei. **Annual Review of Astronomy and Astrophysics**, v. 22, n. 1, p. 471–506, 28 set. 1984.

REES, P. H. *et al.* Splenectomy in kala-azar. **Tropical and Geographical Medicine**, v. 36, p. 285–92. 1984.

RODRIGUES, J. V., DA SILVA J.S., Campos-Neto A. Selective inability of spleen antigen presenting cells from *Leishmania donovani* infected hamsters to mediate specific T cell proliferation to parasite antigens. **Parasite Immunology** v. 14, p. 49–58. 1992.

- RODRIGUES, V. *et al.* Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 118, 1 mar. 2016.
- ROLÃO *et al.* Leishmania infantum: mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, v.3, p.270-6. 2007.
- ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 1, p. e584, 19 jan. 2010.
- ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions! **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 103–111, 2018.
- SACKS, D. L.; MELBY, P. C. Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. **Current Protocols in Immunology**, v. 108, p. 19.2.1–24, 2 fev. 2015.
- SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**, v. 3, n. 11, p. 1041–1047, nov. 2002.
- SAINI, S. *et al.* Zinc depletion promotes apoptosis-like death in drug-sensitive and antimony-resistance Leishmania donovani. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.
- SAKAJIRI, S. *et al.* Dlk1 in normal and abnormal hematopoiesis. **Leukemia**, v. 19, n. 8, p. 1404–1410, 2005.
- SANCHEZ, M. A. *et al.* Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with leishmania chagasi. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, V. 70, n. 6, p. 618–624, 1 jun. 2004.
- SANTANA, C. C. *et al.* Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. **Parasite immunology**, v. 30, n. 10, p. 515–524, out. 2008.
- SHI, K. *et al.* Lymphoid chemokine B cell-attracting chemokine-1 (CXCL13) is expressed in germinal center of ectopic lymphoid follicles within the synovium of chronic arthritis patients. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 1, p. 650–655, 1 jan. 2001.
- SILVA, J. S. *et al.* Low CXCL13 expression, splenic lymphoid tissue atrophy and germinal center disruption in severe canine visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. e29103, 2012.
- SILVA-O'HARE, J. *et al.* Disruption of splenic lymphoid tissue and plasmacytosis in canine visceral leishmaniasis: changes in homing and survival of plasma cells. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. e0156733, 2016.

SILVA-BARRIOS, S. *et al.* Innate Immune B Cell Activation by *Leishmania donovani* Exacerbates Disease and Mediates Hypergammaglobulinemia. **Cell Reports**, v. 15, p. 2427–2437.

SINGH, O. P. *et al.* Asymptomatic *Leishmania* Infection: A New Challenge for *Leishmania* Control. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 10, p. 1424–1429, 15 maio 2014.

SMELT, S. C. *et al.* Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 158, n. 8, p. 3813–3821, 15 abr. 1997.

STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 138–147, fev. 2007.

STEINIGER, B.; BARTH, P. Microanatomy and function of the spleen. **Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology**, v. 151, p. III–IX– 1–101, 2000.

STREIT, J.A., RECKER, T.J., FILHO, F.G., Beverley SM, Wilson ME. Protective immunity against the protozoan *Leishmania chagasi* is induced by subclinical cutaneous infection with virulent but not avirulent organisms. **Journal of Immunology**, v. 166, p. 1921–1929. 2001.

SZCZEPANEK, S. M. *et al.* Splenic morphological changes are accompanied by altered baseline immunity in a mouse model of sickle-cell disease. **The American Journal of Pathology**, v. 181, n. 5, p. 1725–1734, nov. 2012.

TANGYE, S. G. Staying alive: regulation of plasma cell survival. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 12, p. 595–602, 1 dez. 2011.

TEIXEIRA, C. *et al.* Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum chagasi* in Latin America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. e638, 23 mar. 2010.

TOWNSON, H. *et al.* Exploiting the potential of vector control for disease prevention. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 83, n. 12, p. 942–947, dez. 2005.

VAN DE PAVERT, S. A.; MEBIUS, R. E. New insights into the development of lymphoid tissues. **Nature Reviews Immunology**, p. 1–11, 13 ago. 2010.

VAN VLIET, E.; MELIS, M.; VAN EWIJK, W. Marginal zone macrophages in the mouse spleen identified by a monoclonal antibody. Anatomical correlation with a B cell subpopulation. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 33, n. 1, p. 40–44, 5 jan. 1985.

VAN ZANDBERGEN, G. *et al.* Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum.

Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 103, n. 37, p. 13837–13842, 2006.

VERESS, B. *et al.* Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. **Immunology**, v. 33, n. 5, p. 605–610, nov. 1977.

VERESS, B.; ABDALLA, R. E.; HASSAN, EL, A. M. Visceral spreading depletion of thymus-dependent regions and amyloidosis in mice and hamsters infected intradermally with Leishmania isolated from Sudanese cutaneous leishmaniasis. **British journal of experimental pathology**, v. 64, n. 5, p. 505–514, out. 1983.

WANG, Y.-J. *et al.* Destructive effect of eggs of Schistosoma japonicum on spleens in C57BL/6 mice. **Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi = Chinese journal of schistosomiasis control**, v. 23, n. 3, p. 285–287, jun. 2011.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de Saude Publica**, v. 48, n. 5, p. 851–856, out. 2014.

WILSON, M. E.; STREIT, J. A. Visceral leishmaniasis. **Gastroenterology clinics of North America**, v. 25, n. 3, p. 535–551, set. 1996.

XU, Y. *et al.* Irgm1 is required for the inflammatory function of M1 macrophage in early experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 101, n. 2, p. 507–517, 2017.

YAN-JUAN, W. *et al.* Observation on destroyed architecture of splenic lymphoid follicles in mice infected with Schistosoma japonicum by immunohistochemistry. **Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi = Chinese journal of schistosomiasis control**, v. 29, n. 4, p. 468–470, 21 ago. 2017.

APÊNDICE A

Ficha para avaliação clínica dos animais

FICHA CLÍNICA – LEISHMANIOSE VISCERAL			
CÓDIGO ANIMAL	GRUPO <input type="radio"/> Infectado <input type="radio"/> 30 dias <input type="radio"/> Promastigota <input type="radio"/> Controle <input type="radio"/> 60 dias <input type="radio"/> total <input type="radio"/> 90 dias <input type="radio"/> Promastigota <input type="radio"/> 120 dias metacíclica <input type="radio"/> 150 dias	ANIMAL	DATA EXAME <hr/> DATA EUTANÁSIA

1. IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL Número animal: Sexo: <input type="radio"/> Macho <input type="radio"/> Fêmea Nascimento: Peso:	2. PERFIL CLÍNICO Estado nutricional: <input type="radio"/> Normal ou obeso <input type="radio"/> Magro <input type="radio"/> Caquético Ascite : <input type="radio"/> Ausente <input type="radio"/> Presente Coloração de mucosas: <input type="radio"/> Normal <input type="radio"/> Pálida Pele: • Alopecia: <input type="radio"/> Ausente <input type="radio"/> Focal <input type="radio"/> Difusa Onde: _____ • Dermatite : <input type="radio"/> Ausente <input type="radio"/> Focal <input type="radio"/> Difusa Onde: _____ Olho: • Dermatite periocular: <input type="radio"/> Ausente <input type="radio"/> 1 Olho <input type="radio"/> 2 Olhos • Conjuntivite: <input type="radio"/> Ausente <input type="radio"/> 1 Olho <input type="radio"/> 2 Olhos Orelha: • Crosta: <input type="radio"/> Ausente <input type="radio"/> 1 Orelha <input type="radio"/> 2 Orelhas • Úlcera: <input type="radio"/> Ausente <input type="radio"/> 1 Orelha <input type="radio"/> 2 Orelhas Focinho: • Despigmentação: <input type="radio"/> Ausente <input type="radio"/> Presente • Crosta: <input type="radio"/> Ausente <input type="radio"/> Presente Lesões: • extremidades: <input type="radio"/> Ausente <input type="radio"/> Presente Onde: _____ • difusas: <input type="radio"/> Ausente <input type="radio"/> Presente Onde: _____
--	---

PESQUISADOR (A): Observações:

APÊNDICE B

RESULTADOS – Cinética de infecção com 1×10^7 *L. infantum*/mL por 30, 60, 90, 120 e 150 dias

Sinais clínicos de LV e evidências de infecção

Os camundongos não apresentaram sinais clínicos de LV no curso da infecção. A avaliação de peso do animal, peso do baço e evidências de infecção estão listadas na tabela 1.

Tabela 1. Características gerais dos camundongos.

Grupo	Peso (g)	Peso do baço (g)	Cultura	qPCR
30 dias				
<i>Controle</i>	31,2 ± 2,8	0,12 ± 0,02	0/5	0/5
<i>Infectado</i>	28,9 ± 3,9	0,1 ± 0,007	5/5	5/5
60 dias				
<i>Controle</i>	26,9 ± 3,5	0,12 ± 0,03	0/5	0/5
<i>Infectado</i>	29,8 ± 3,1	0,15 ± 0,02	5/5	2/5
90 dias				
<i>Controle</i>	31,9 ± 4,8	0,15 ± 0,03	0/5	0/5
<i>Infectado</i>	29,4 ± 3,5	0,15 ± 0,02	5/5	4/5
120 dias				
<i>Controle</i>	30,2 ± 3,4	0,14 ± 0,05	0/5	1/5
<i>Infectado</i>	33,4 ± 2,5	0,14 ± 0,04	3/5	3/5
150 dias				
<i>Controle</i>	26,6 ± 2,2	0,10 ± 0,01	0/5	0/5
<i>Infectado</i>	27,3 ± 0,4	0,12 ± 0,01	5/5	3/5

Análise histológica

Linfonodo

Tratando-se de um órgão pequeno e de difícil acesso, mesmo quando coletado com sucesso, o material apareceu pouco representado ou com poucas sub-regiões evidentes, prejudicando a análise sistemática dos parâmetros. Quando presente e bem representado, não foram constatadas

alterações significantes. Não houve presença de granuloma, embora apareçam células epitelioides e possível presença de *Leishmania* em dois animais infectados no ponto de 150 dpi (figura 1).

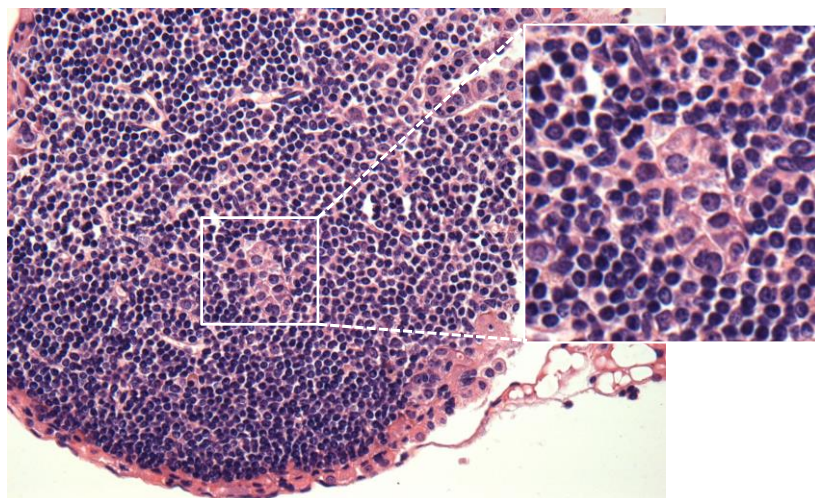


Figura 1: Fotomicrografia de linfonodo de camundongo com 150 dias de infecção. Macrófagos contendo formas amastigotas de *L. infantum*, aumento de 400x. Coloração H&E.

Fígado

Os parâmetros de avaliação histológica do fígado estão relacionados na tabela 2. Foi observada discreta hiperplasia de célula de Kupffer independente dos grupos. Granulomas pequenos e bem organizados foram observados apenas em camundongos infectados, sendo mais frequente no ponto de 30 dpi (3/5, $p=0,02$, tabela 2, figura 2). Neste mesmo grupo de animais, leucocitose intrassinusoidal foi mais frequente (4/5, $p=0,001$, tabela 7, figura 3).

Tabela 2. Parâmetros de análise histológica do fígado de camundongos avaliados a 30, 60, 90, 120 e 150 dias após a injeção.

Grupos	Parâmetros					
	<u>Infiltrado inflamatório</u>			Granuloma	Hiperplasia de célula de Kupffer	Leucocitose intrassinusoidal
	Parênquima	Espaço porta	Veia central			
30 dias						
Controle	0,6 ± 0,5	0,4 ± 0,5	0,2 ± 0,4	0	0,2 ± 0,4	0
Infectado	0,6 ± 0,5	0,2 ± 0,4	0,4 ± 0,5	0,6 ± 0,5	0,2 ± 0,4	0,8 ± 0,4
60 dias						
Controle	0,4 ± 0,5	0,6 ± 0,5	0	0,2 ± 0,4	0,4 ± 0,5	0,2 ± 0,4
Infectado	1 ± 0	0	0	0	0,2 ± 0,4	0
90 dias						
Controle	0,2 ± 0,4	0,4 ± 0,5	0,6 ± 0,5	0	0,8 ± 0,8	0
Infectado	1 ± 0	0,6 ± 0,5	0,2 ± 0,4	0,2 ± 0,4	0,2 ± 0,4	0
120 dias						
Controle	0,6 ± 0,5	0,4 ± 0,5	0	0	0,4 ± 0,5	0
Infectado	0,2 ± 0,4	0,4 ± 0,5	0	0	0,6 ± 0,5	0
150 dias						
Controle	0,4 ± 0,5	0,4 ± 0,5	0,2 ± 0,4	0	0	0,2 ± 0,4
Infectado	0,6 ± 0,5	0,4 ± 0,5	0,4 ± 0,5	0	0,2 ± 0,4	0
Valor de p	ns	ns	ns	0.001 ^a	ns	0.0001 ^a

Nota: valores expressos em média de escore ± desvio padrão. a= diferença entre controle e infectado de 30 dias após a infecção, Kruskal-Wallis test, $p < 0,001$. ns= não significante.

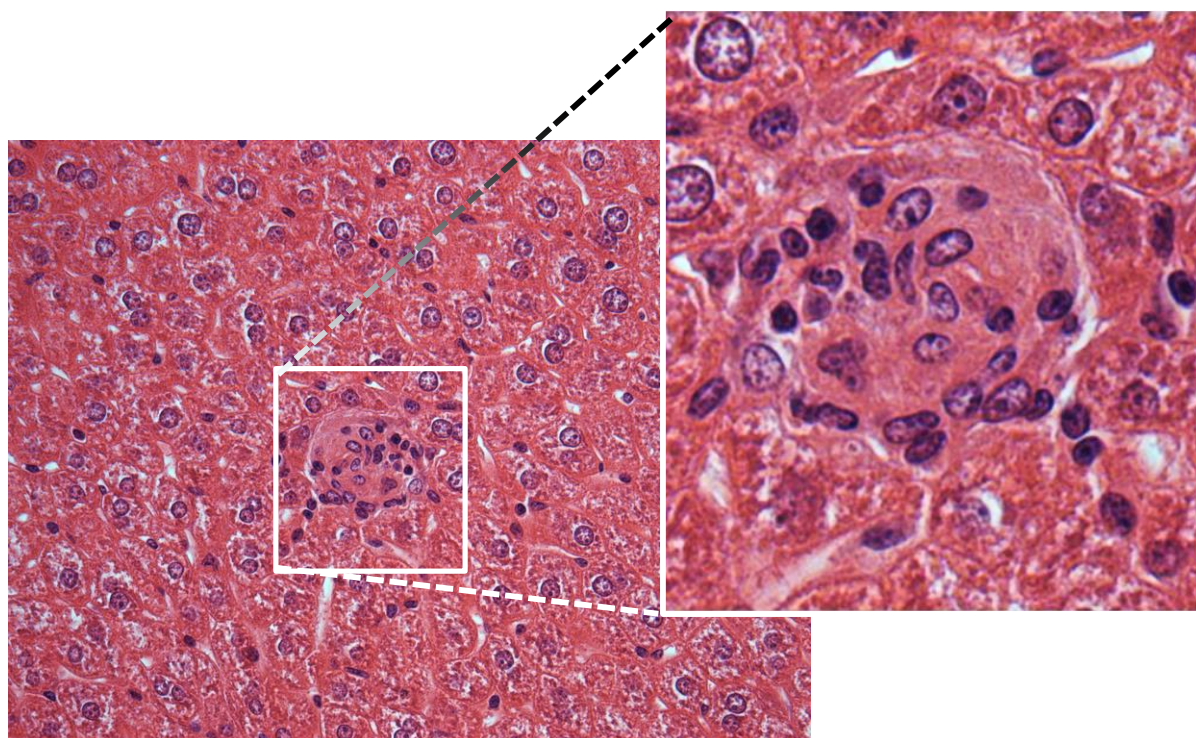


Figura 2: Fotomicrografias de fígado de camundongo com 30 dias de infecção. Fotos representativas da análise de fígado de camundongos evidenciando granuloma intraparenquimatoso. Coloração H&E, aumento de 400x.

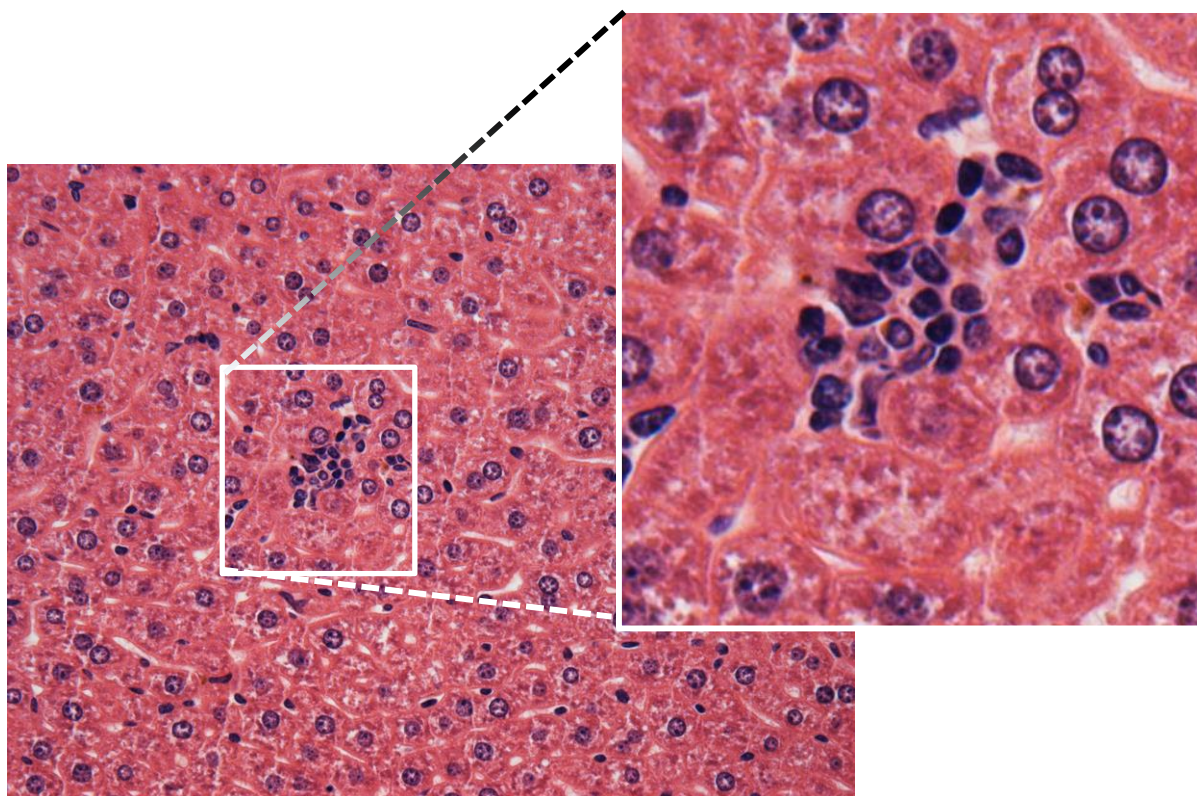


Figura 3: Fotomicrografias de fígado de camundongo com 30 dias de infecção. Fotos representativas da análise de fígado de camundongos evidenciando infiltrado inflamatório mononuclear. Coloração H&E, aumento de 400x.

Baço

As alterações de PB foram discretas. A 30 dias da injeção, os folículos dos camundongos do grupo controle estavam ligeiramente aumentados (figura 4, A), enquanto houve tendência à atrofia de folículos em camundongos infectados do mesmo ponto (figura 4, B).

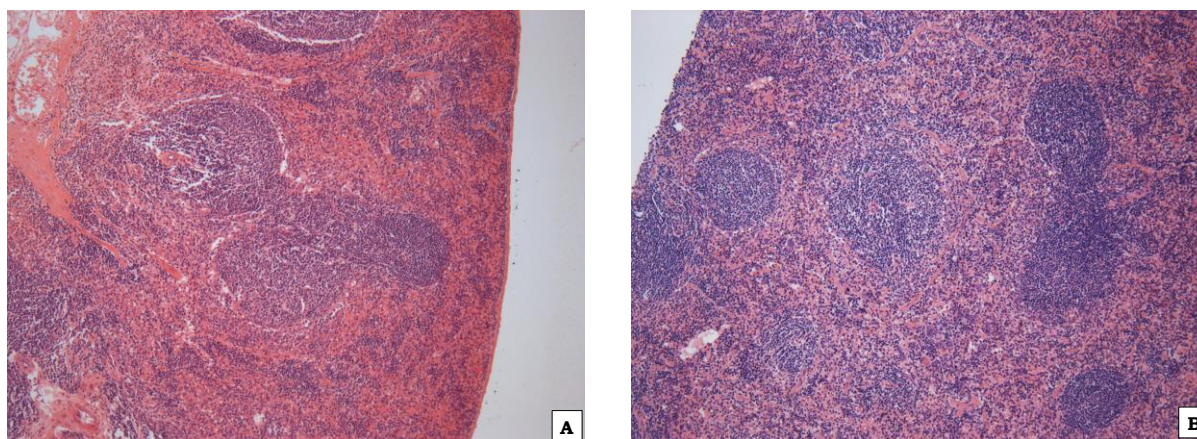


Figura 4: Fotomicrografias de baço de camundongos. Fotos representativas de baços de camundongos controle (A) e infectado (B) a 30 dias da injeção. Coloração H&E, aumento de 200x.

As médias de tamanho dos folículos ao longo da cinética estão representadas na figura 5, A. Os centros germinativos variaram de ausentes a discretamente aumentados (figura 5, B). Não foi observada desorganização da PB.

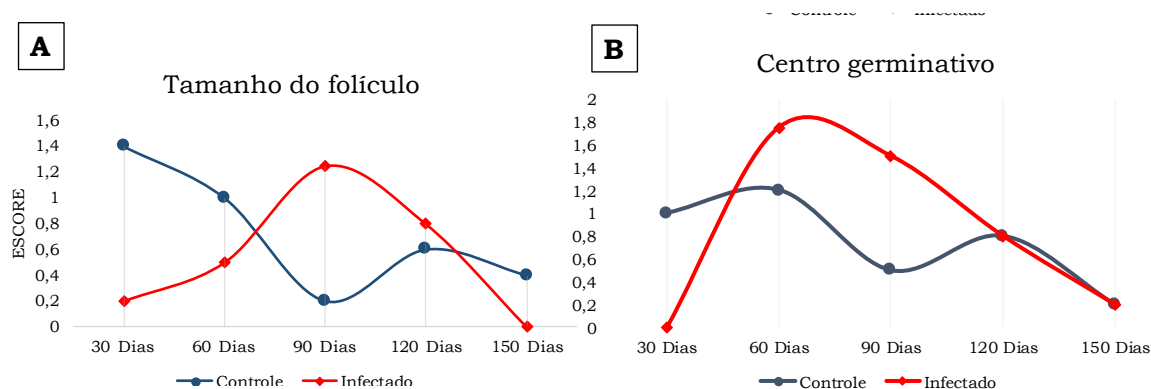


Figura 5: Mensuração de tamanho de folículos e centros germinativos de camundongos. Representação de tamanho mensurado por escore de folículos (A) e centro germinativos (B) de baço de camundongos dos grupos controle e infectado, em 30, 60, 90, 120 e 150 dias após a injeção.

Análise fenotípica de esplenócitos por citometria de fluxo

Estão representadas as estratégias de gate para caracterização das subpopulações de linfócitos T e B, macrófagos, plasmócitos, células dendríticas foliculares e plasmocitoides para cada grupo de avaliação. Foram utilizados isotipos controle para cada fenótipo celular para caracterização de gate negativo. Os valores expressos são percentuais relativos à população positivamente selecionada.

Linfócitos T

Para avaliação de linfócitos T, foram selecionadas as células positivas para CD3 e então subdivididas entre linfócitos T CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺CD8⁻) e linfócitos T CD8⁺ (CD3⁺CD4⁻CD8⁺) (figura 6). Os percentuais das subpopulações de linfócitos estão listados na tabela 3.

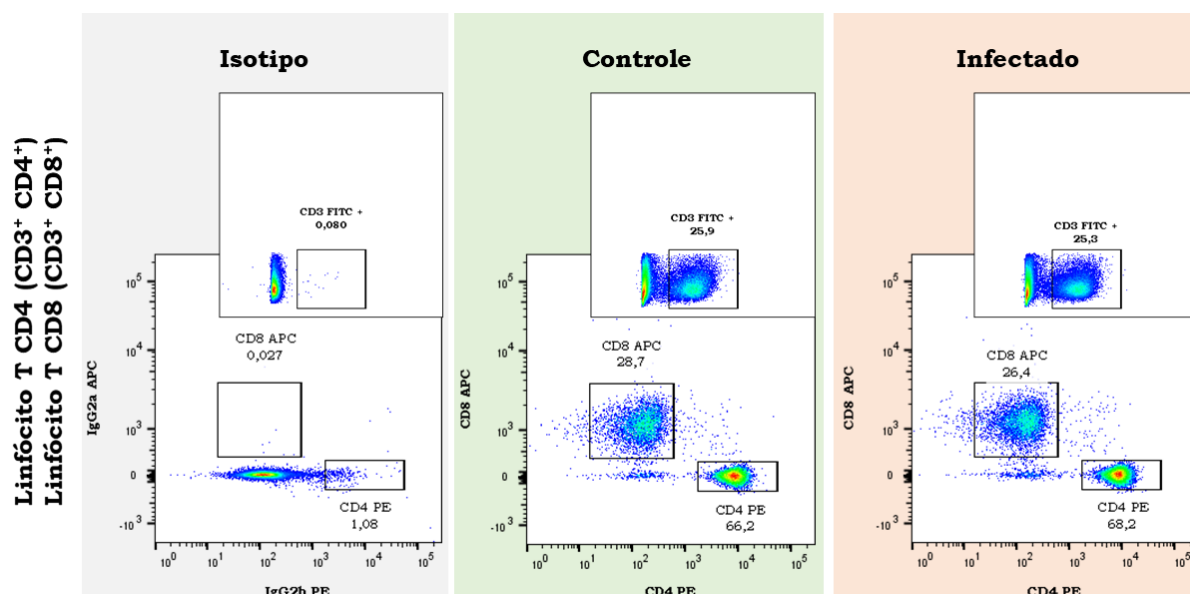


Figura 6: Estratégia de gate para seleção das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Imagens representativas das estratégias de gate utilizadas para seleção das subpopulações em isotipo controle e grupos controle e infectado.

Tabela 3. Percentual de subpopulações de linfócitos T nos grupos controle ou infectado, em 30, 60, 90, 120 e 150 dias após a injeção.

Células	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias
Linfócito T CD4⁺					
<i>Controle</i>	67 ± 2,7	63,3 ± 2,6	65,5 ± 2,1	62,5 ± 2,2	69,5 ± 1,4
<i>Infectado</i>	67,9 ± 1,8	60,3 ± 2,7	67,3 ± 1,6	65,1 ± 2,9	70,1 ± 1,9
Linfócito T CD8⁺					
<i>Controle</i>	28,5 ± 2,4	27,1 ± 1	32,3 ± 2,9	32,4 ± 2,2	27,1 ± 1,3
<i>Infectado</i>	26,6 ± 1,7	26,5 ± 1,5	29 ± 1,1	30,2 ± 2,9	26,4 ± 1,6

Nota: dados percentuais expressos em média ± desvio padrão.

A distribuição de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ não se distinguiu entre camundongos controle ou infectado (figura 7, A e C). Foi avaliada a proporção das células em relação ao tempo de infecção, calculada por fold change (figura 7, B e D). A população de linfócitos T CD4⁺ aparece reduzida em 60 dpi em comparação aos pontos de 90 dpi ($p=0,01$) e 120 dpi ($p=0,001$) (figura 7, B).

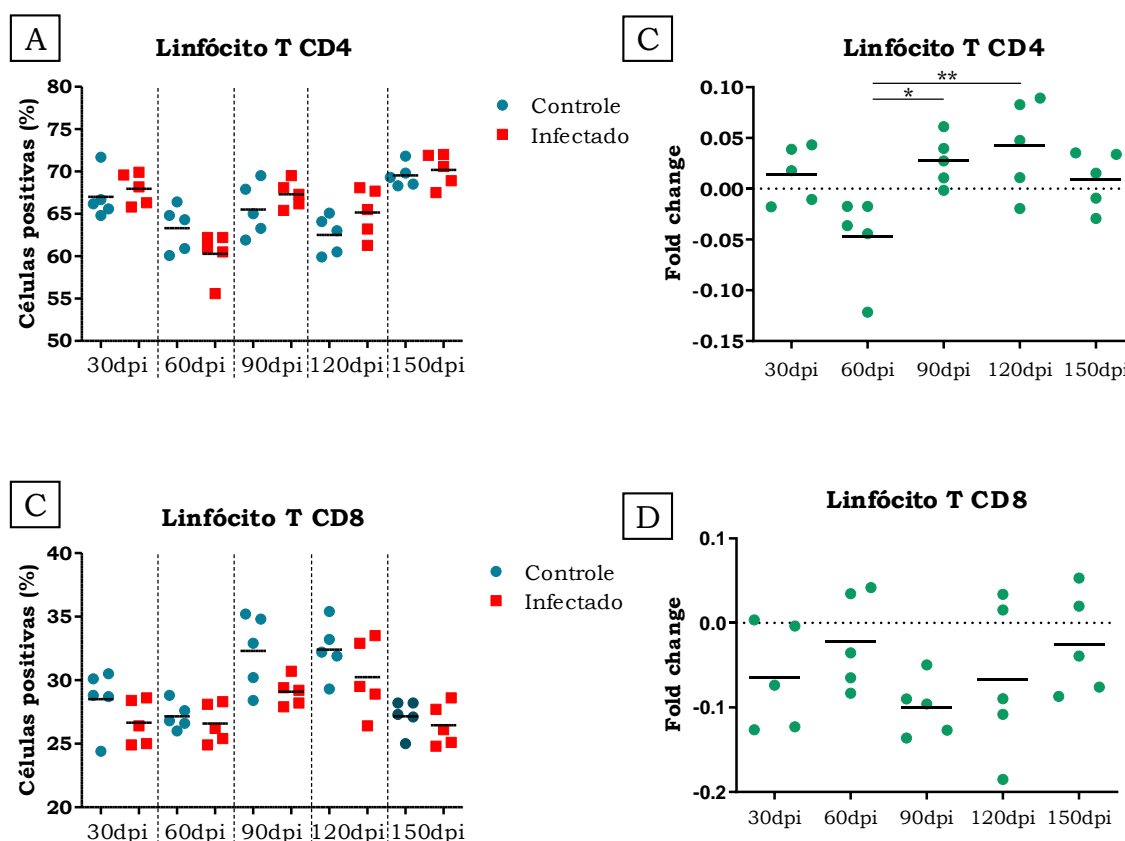


Figura 7: Avaliação do percentual de linfócitos T no baço de camundongos.

Representação gráfica do percentual de células positivas para linfócitos T CD4 e CD8 nos grupos controle e infectado nos diferentes pontos de avaliação (A e C) e por *fold change* ao longo da cinética de avaliação (B e D). *=ANOVA test, Bonferroni's post test, $p=0,01$.

**=ANOVA test, Bonferroni's post test, $p=0,001$.

Linfócitos B

As células negativas para CD3 e positivas para CD19 foram caracterizadas como linfócitos B (CD3-CD19⁺) (figura 8). Os percentuais das subpopulações de linfócitos estão listados na tabela 4.

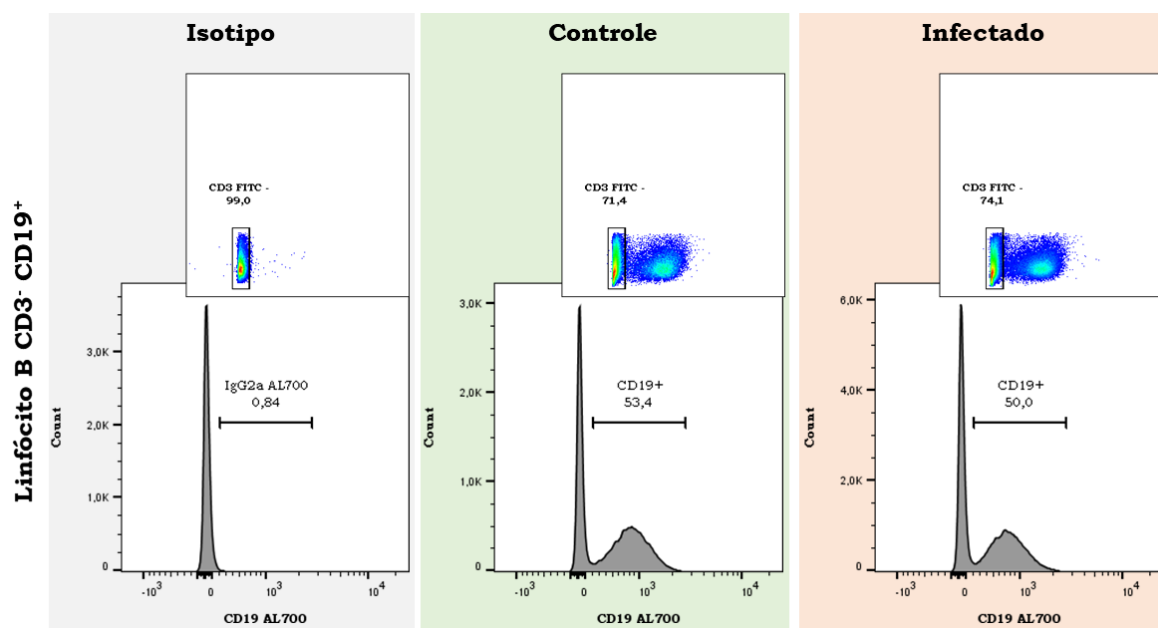


Figura 8: Estratégia de gate para seleção das subpopulações de linfócitos B. Imagens representativas das estratégias de gate utilizadas para seleção das subpopulações em isotipo controle e grupos controle e infectado.

Tabela 4. Percentual de subpopulações de linfócitos B nos grupos controle ou infectado, em 30, 60, 90, 120 e 150 dias após a injeção.

Linfócitos B	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias
<i>Controle</i>	59,5 ± 11	38,8 ± 7,4	9,2 ± 7,1	24,2 ± 14,8	55,4 ± 2,6
<i>Infectado</i>	56,1 ± 10,3	25 ± 6,3	4,4 ± 2	11,4 ± 4,1	53,2 ± 4,5

Nota: dados percentuais expressos em média ± desvio padrão.

Camundongos a 60 dpi apresentaram menor número de linfócitos B ($25 \pm 6,3\%$) que os camundongos controle ($38,8 \pm 7,4\%$, $p=0,01$) do mesmo tempo de injeção (figura 9, A). Ocorre aumento da população no último ponto de avaliação (150 dpi, $p=0,01$) (figura 9, B).

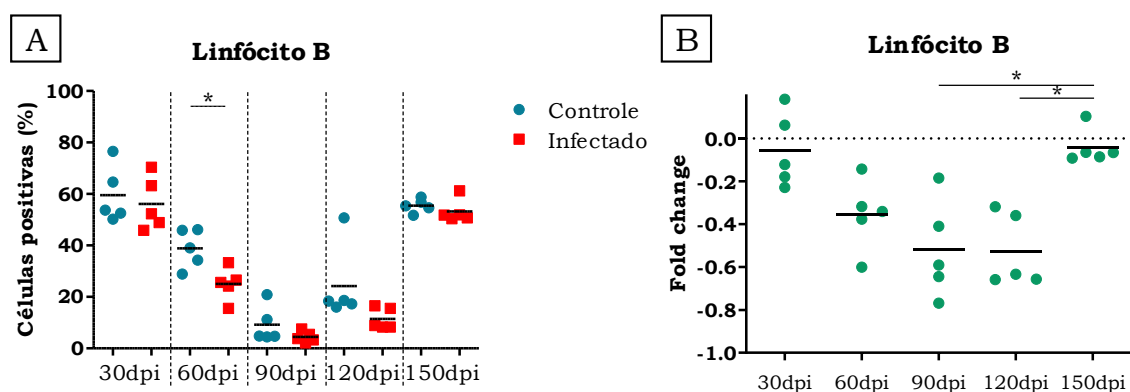


Figura 9: Avaliação do percentual de linfócitos B no baço de camundongos. Representação gráfica do percentual de células positivas para linfócitos B nos grupos controle e infectado nos diferentes pontos de avaliação*= ANOVA test, Bonferroni's post tes, $p=0,01$ (A) e por *fold change* ao longo da cinética de avaliação (B)*=Kruskal-Wallis test, $p=0,01$.

Linfócitos CD3-CD4⁺

Foi observada uma fração de células que expressam CD4 mas não expressam CD3, sugestivas de linfócitos (CD3-CD4⁺) (figura 10). Os percentuais das subpopulações de linfócitos estão listados na tabela 5.

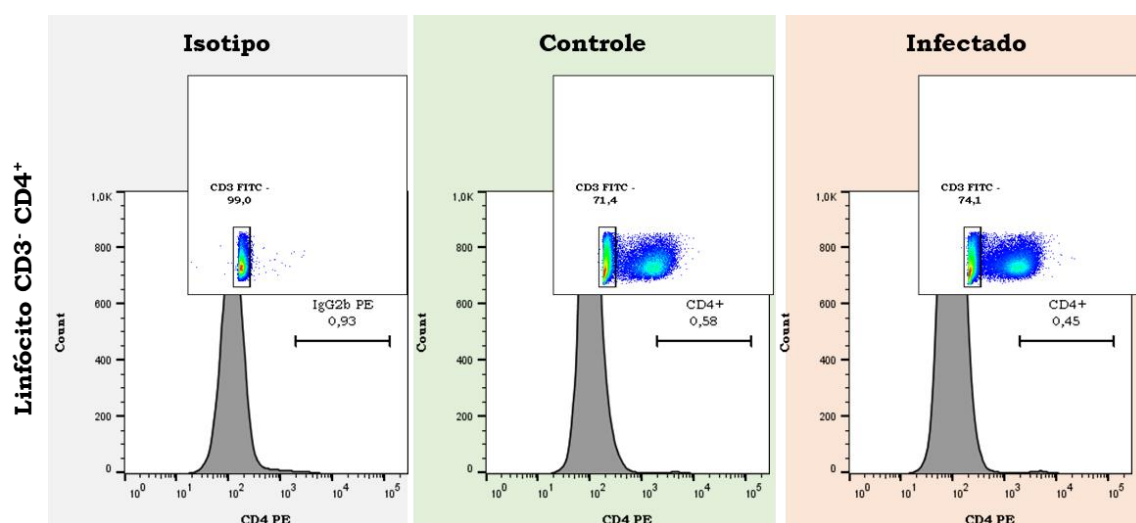


Figura 10: Estratégia de gate para seleção das subpopulações de linfócitos T CD3-CD4⁺. Imagens representativas das estratégias de gate utilizadas para seleção das subpopulações em isotipo controle e grupos controle e infectado.

Tabela 5. Percentual de subpopulações de linfócitos CD3-CD4⁺ nos grupos controle ou infectado, em 30, 60, 90, 120 e 150 dias após a injeção.

Linfócitos CD3-CD4 ⁺	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias
Controle	0,6 ± 0,1	2,1 ± 0,3	4,1 ± 0,4	1,6 ± 0,4	1,3 ± 0,1
Infetado	0,5 ± 0,1	3,3 ± 0,2	3,5 ± 1	1,6 ± 0,5	1,6 ± 0,3

Nota: dados percentuais expressos em média ± desvio padrão.

A 60 dpi a proporção de linfócitos CD3⁺CD4⁺ aparece com média de $3,3 \pm 0,2\%$, maior em comparação a camundongos não infectados ($2,1 \pm 0,3\%$, $p=0,001$) (figura 11, A). Essa população de células aparece elevada no ponto de 60dpi quando comparados com o ponto anterior (30dpi, $p=0,0001$) e os pontos subsequentes (90dpi, $p=0,001$; 120 dpi, $p=0,01$) (figura 11, B).

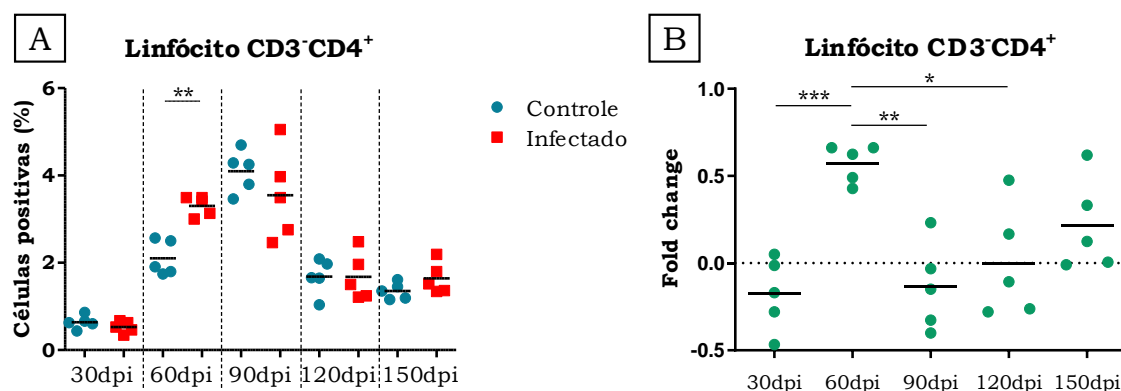


Figura 11: Avaliação do percentual de linfócitos CD3-CD4⁺ no baço de camundongos.

Representação gráfica do percentual de células CD3-CD4⁺ nos grupos controle e infectado nos diferentes pontos de avaliação (A)**= ANOVA, Bonferroni's post test, $p=0,001$ e por *fold change* ao longo da cinética de avaliação (B) *= ANOVA, Bonferroni's post test, $p=0,01$; **= ANOVA, Bonferroni's post test, $p=0,001$; ***= ANOVA, Bonferroni's post test, $p=0,0001$.

Macrófagos

Para avaliação de macrófagos, foi selecionada a população negativa para CD11c. Macrófagos foram definidos por dupla marcação para F4/80 e CD11b (figura 12) e os percentuais de população relacionados na tabela 6.

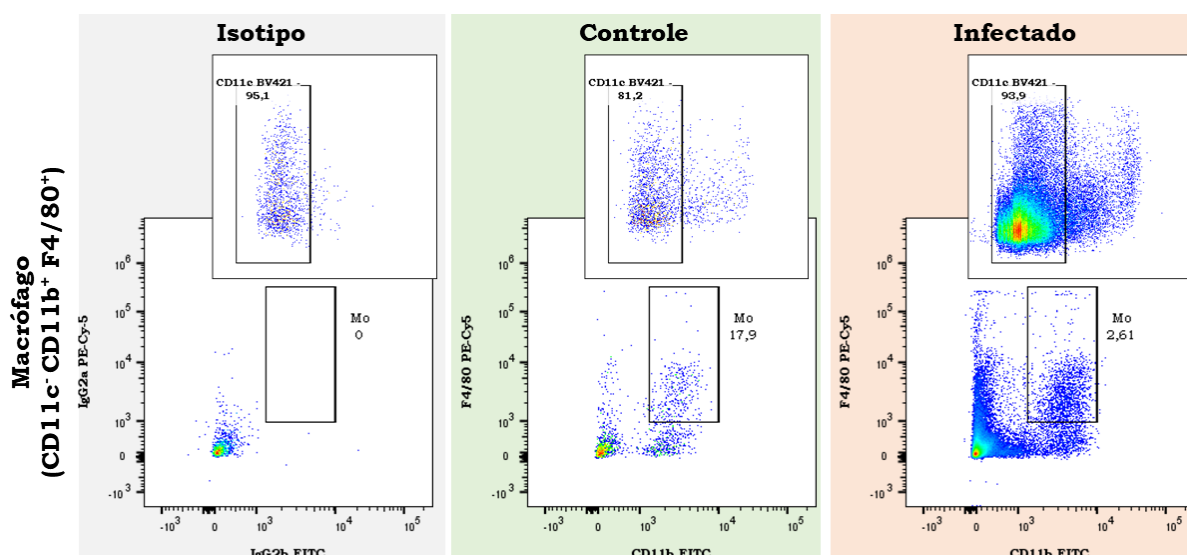


Figura 12: Estratégia de gate para seleção das subpopulações de macrófagos. Imagens representativas das estratégias de gate utilizadas para seleção das subpopulações em isotipo controle e grupos controle e infectado.

Tabela 6. Percentual de macrófagos nos grupos controle ou infectado, em 30, 60, 90, 120 e 150 dias após a injeção.

Macrófago	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias
Controle	16,4 ± 1,1	4,3 ± 2,1	2,9 ± 1,1	2,1 ± 1	1,8 ± 0,5
Infectado	6,3 ± 4,4	5,4 ± 2,3	1,7 ± 1	2,6 ± 0,6	2,6 ± 0,6

Nota: dados percentuais expressos em média ± desvio padrão.

Camundongos infectados apresentaram menor número de macrófagos ($6,3 \pm 4,4\%$) que o grupo controle ($16,4 \pm 1,1\%$, $p = 0,0001$) após 30 dias da injeção (figura 13, A). Observando ainda o ponto de 30dpi, quando avaliado por *fold change* na cinética, a população de macrófagos aparece menor que os demais pontos de avaliação (60 dpi, $p=0,01$; 120 dpi, $p=0,01$; 150 dpi, $p=0,001$), exceto pelo ponto de 90 dpi (figura 13, B). Este, aparece com redução de macrófagos quando comparado ao ponto mais tardio (150 dpi, $p=0,01$).

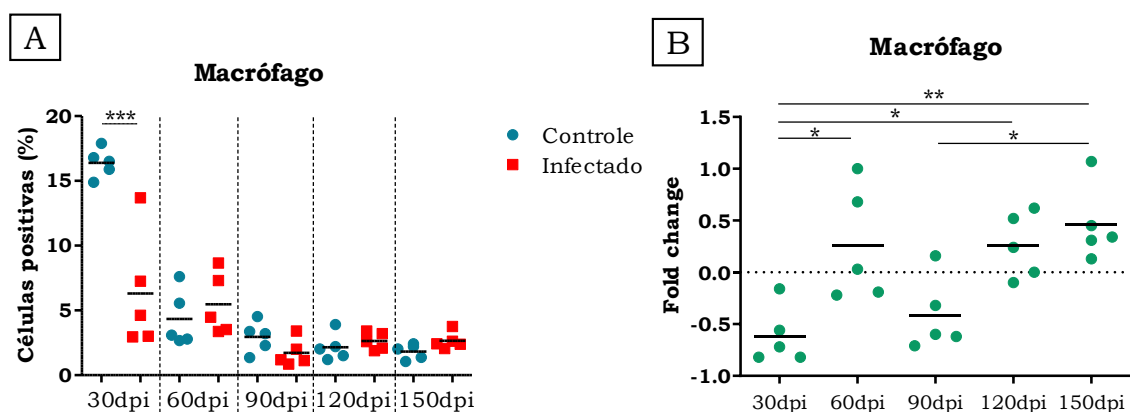


Figura 13: Avaliação do percentual de macrófagos no baço de camundongos. Representação gráfica do percentual de células positivas para macrófagos nos grupos controle e infectado nos diferentes pontos de avaliação, ***= ANOVA, Bonferroni's post test, $p=0,0001$ (A) e por *fold change* ao longo da cinética de avaliação (B) *= ANOVA, Bonferroni's post test, $p=0,01$; **= ANOVA, Bonferroni's post test, $p=0,001$.

Plasmócitos

Para a fenotipagem de plasmócitos, inicialmente foi selecionada a população positiva para CD138. Em seguida, uma fração negativa e/ou com baixa expressão de B220 foi separada. Similarmente, foi selecionada uma porção com baixa e/ou nenhuma expressão de CD19. Dentre esta, os plasmócitos foram caracterizados por dupla marcação para CD93 e MHC-II (figura 14) e suas populações estimadas em percentuais (tabela 7).

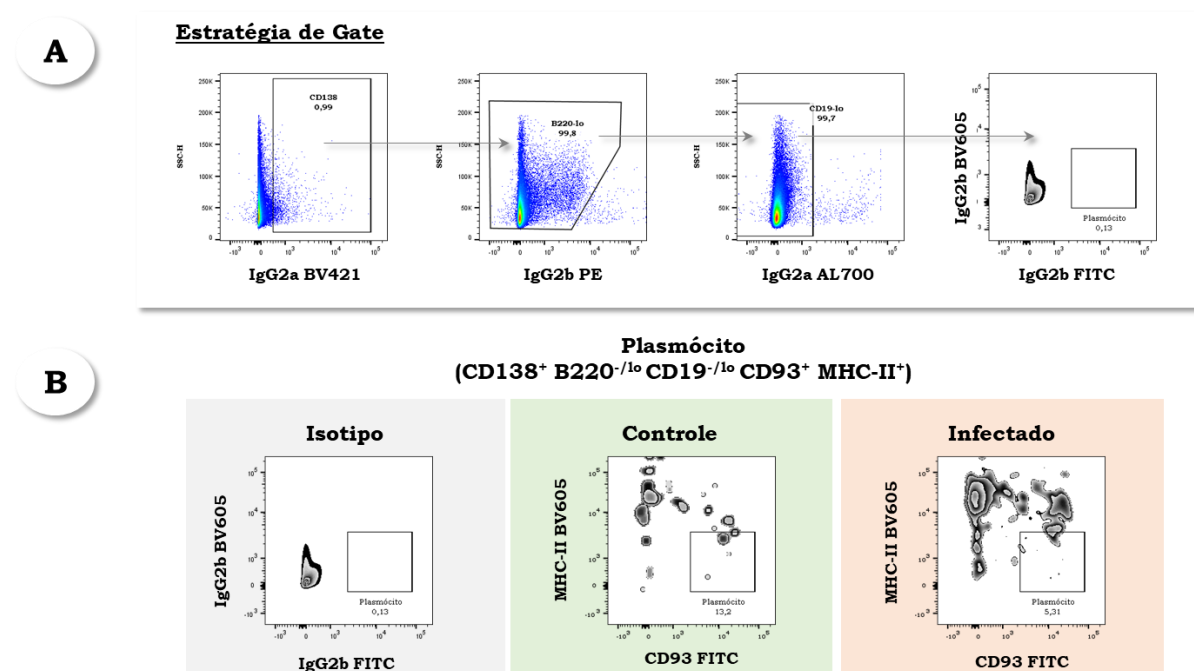


Figura 14: Estratégia de gate para seleção das subpopulações de plasmócitos Imagens representativas das estratégias de gate utilizadas para seleção das subpopulações em isotipo controle e grupos controle e infectado.

Tabela 7. Percentual de plasmócitos nos grupos controle ou infectado, em 30, 60, 90, 120 e 150 dias após a injeção.

Plasmócito	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias
Controle	10,9 ± 6	2,3 ± 0,9	21 ± 7,9	27,6 ± 11,7	16,6 ± 2,8
Infectado	5,1 ± 0,7	5,3 ± 1,9	25 ± 4,5	16,6 ± 8,7	15,2 ± 4,9

Nota: dados percentuais expressos em média ± desvio padrão

A população de plasmócitos aparece elevada nos camundongos com 60 dias de infecção ($5,3 \pm 1,9\%$, $p=0,01$) (figura 15, A). Apesar da aparente tendência a aumento de plasmócitos nos pontos de avaliação seguintes, que não é significativa e não distingue entre controle e infectado. Quando avaliados na cinética, o mesmo ponto de 60dpi aparece com *fold change* de plasmócitos elevado em relação aos demais pontos (30 dpi, $p=0,0001$; 90 dpi, $p=0,01$; 120 dpi, $p=0,0001$; 150 dpi, $p=0,0001$) (figura 15, B).

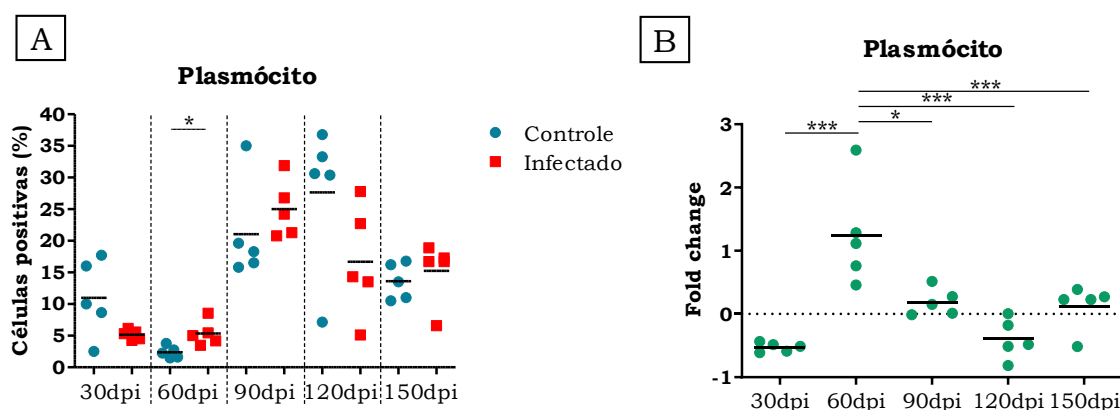


Figura 15: Avaliação do percentual de plasmócitos no baço de camundongos. Representação gráfica do percentual de células positivas para plasmócitos nos grupos controle e infectado nos diferentes pontos de avaliação, * = t test, $p=0,01$ (A) e por *fold change* ao longo da cinética de avaliação (B) * = ANOVA, Bonferroni's post test, $p=0,01$; ** = ANOVA, Bonferroni's post test, $p=0,001$; *** = ANOVA, Bonferroni's post test, $p=0,0001$.

Célula dendrítica folicular

Como primeira seleção, foi considerada a população marcada positivamente para CD11c. Em seguida, células dendríticas foliculares foram caracterizadas por dupla marcação para CD21 e CD23 (figura 16). As populações foram mensuradas e listadas na tabela 8.

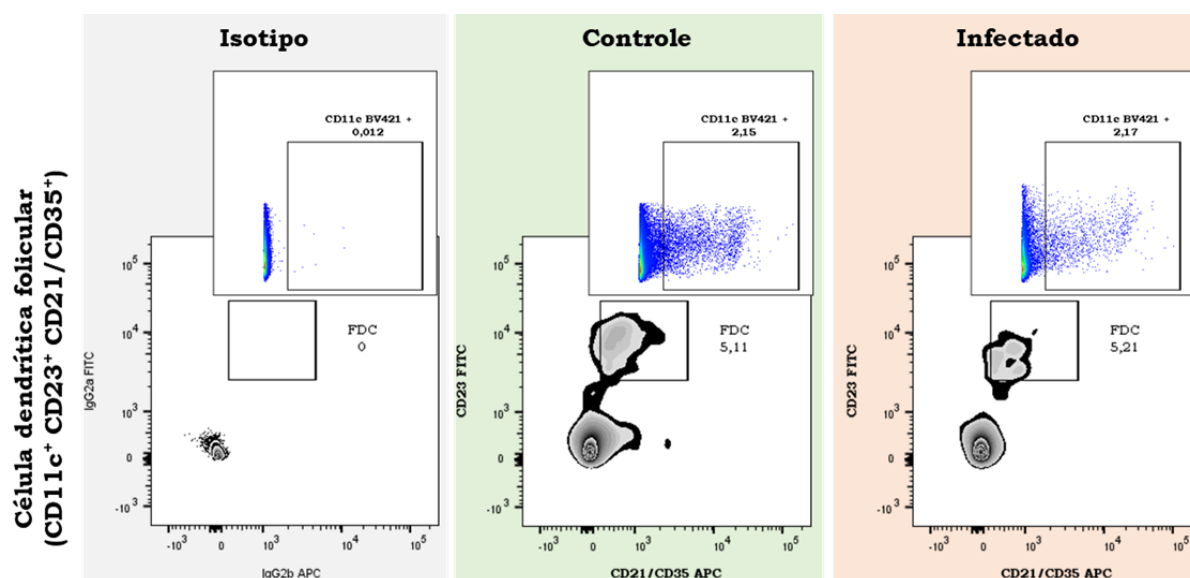


Figura 16: Estratégia de gate para seleção das subpopulações de células dendríticas foliculares. Imagens representativas das estratégias de gate utilizadas para seleção das subpopulações em isotipo controle e grupos controle e infectado.

Tabela 8. Percentual de células dendríticas foliculares nos grupos controle ou infectado, em 30, 60, 90, 120 e 150 dias após a injeção.

Célula dendrítica folicular	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias
<i>Controle</i>	4,6 ± 0,8	3 ± 0,7	11,4 ± 4,2	1 ± 0,5	4 ± 0,6
<i>Infectado</i>	6,1 ± 1,1	4,1 ± 0,9	14,4 ± 5,3	0,9 ± 0,5	4,1 ± 0,7

Nota: dados percentuais expressos em média ± desvio padrão

Não houve diferença estatisticamente significativa no número de células dendríticas foliculares entre os camundongos infectados ou não (figura 17, A), mesmo quando avaliados em relação ao tempo de infecção (figura 17, B).

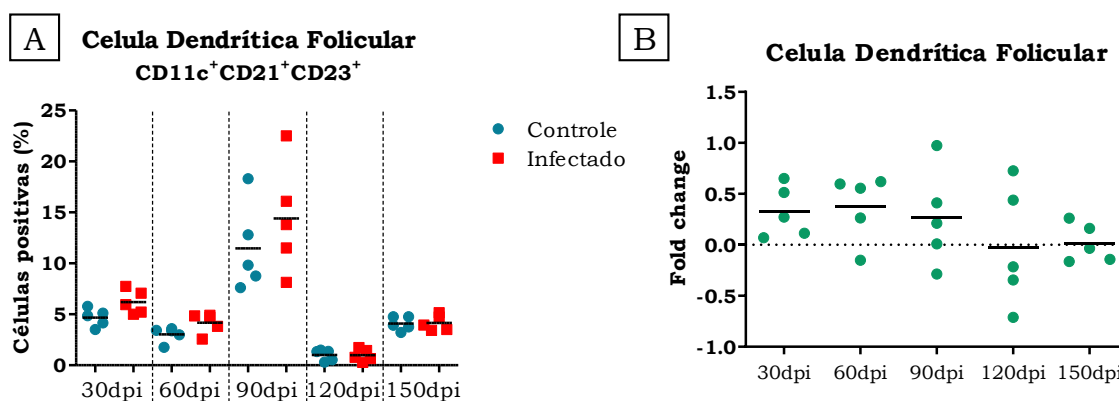


Figura 17: Avaliação do percentual de células dendríticas foliculares no baço de camundongos. Representação gráfica do percentual de células positivas para células dendríticas foliculares nos grupos controle e infectado nos diferentes pontos de avaliação (A) e por *fold change* ao longo da cinética de avaliação (B).

Célula dendrítica plasmocitóide

Inicialmente, foi definida a fração negativa para CD11b. Dentre essa, CD11c foi selecionado positivamente e as células dendríticas plasmocitóides foram caracterizadas por dupla marcação para B220 e GR-1 (figura 18). As populações foram mensuradas e os percentuais estão representados em média e desvio padrão na tabela 9.

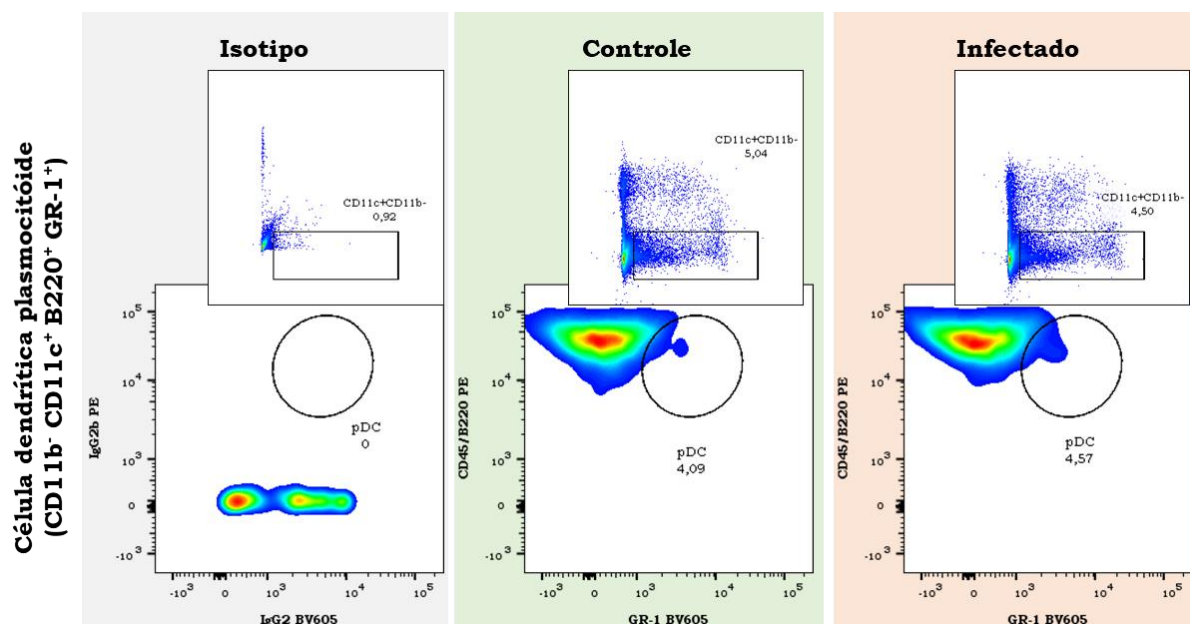


Figura 18: Estratégia de gate para seleção das subpopulações de células dendríticas plasmocitóides. Imagens representativas das estratégias de gate utilizadas para seleção das subpopulações em isotipo controle e grupos controle e infectado.

Tabela 9. Percentual de células dendríticas plasmocitóides nos grupos controle ou infectado, em 30, 60, 90, 120 e 150 dias após a injeção.

Célula dendrítica plasmocitoide	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias
<i>Controle</i>	4,4 ± 1,5	1,7 ± 0,8	8,3 ± 2,1	3,7 ± 1	1,3 ± 0,8
<i>Infectado</i>	4 ± 1,1	1,5 ± 0,2	2,2 ± 0,6	6,7 ± 1,8	1,5 ± 1,1

Nota: dados percentuais expressos em média ± desvio padrão

Camundongos infectados apresentaram menor número de células dendríticas plasmocitoides no ponto de 90dpi ($2,2 \pm 0,6\%$) que os camundongos não infectados ($8,3 \pm 2,1\%$, $p=0,0001$). Esse efeito se inverte no ponto subsequente, 120 dpi, quando camundongos infectados apresentam um percentual de $6,7 \pm 1,8\%$ e os camundongos não infectados apresentam menor número de células dendríticas plasmocitoides ($3,7 \pm 1\%$, $p=0,001$) (figura 20, A). Esse resultado se reflete na avaliação por tempo, quando o ponto de 120 dpi aparece com maior percentual de células dendríticas plasmocitoides que o ponto anterior (90dpi, $p=0,0001$) (figura 20, B).

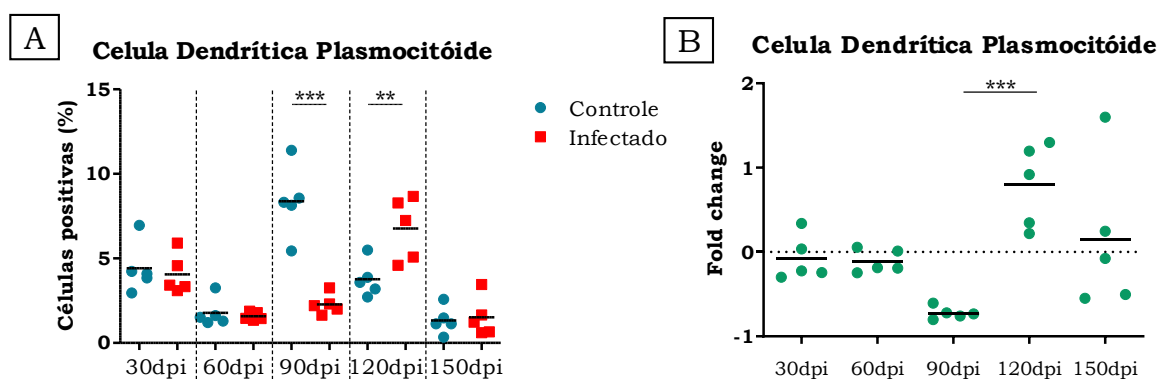


Figura 20: Avaliação do percentual de células dendríticas plasmocitoides no baço de camundongos. Representação gráfica do percentual de células positivas para células plasmocitoides foliculares nos grupos controle e infectado nos diferentes pontos de avaliação, ***= ANOVA, Bonferroni's post test, $p=0,0001$. (A) e por *fold change* ao longo da cinética de avaliação, **= ANOVA, Bonferroni's post test, $p=0,001$; ***= ANOVA, Bonferroni's post test, $p=0,0001$ (B).