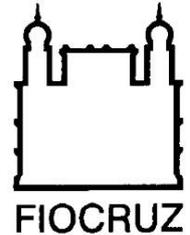




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



**Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana e
Experimental**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES NA CELULARIDADE DOS
MICROAMBIENTES ESPLÊNICOS DE CAMUNDONGOS DURANTE A
PROGRESSÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL**

BIANCA RAMOS MESQUITA

Salvador- Bahia

2021

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

**Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana e
Experimental**

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES NA CELULARIDADE DOS
MICROAMBIENTES ESPLÊNICOS DE CAMUNDONGOS DURANTE A
PROGRESSÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL**

BIANCA RAMOS MESQUITA

Orientador: Dr Washington LC dos-Santos

Co-orientadora: Dr^a Caroline Vilas Boas de Melo

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em
Patologia Humana para
obtenção do grau de Mestre.

Salvador- Bahia

2021

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

M582a Mesquita, Bianca Ramos.
Avaliação das alterações na celularidade dos microambientes esplênicos de camundongos durante a progressão da leishmaniose visceral. / Bianca Ramos \Mesquita. - 2021.
69 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Washington Luis Conrado dos Santos. Laboratório de Patologia Estrutural e Molecular.

Dissertação (Mestrado em Patologia Humana e Experimental) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2021

1. Leishmaniose Visceral. 2. Esplenomegalia. 3. Plasmócitos. 4. Camundongos.
I. Título.

CDU 616.993.161

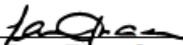
Título da Dissertação: "AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES NA CELULARIDADE DOS MICROAMBIENTES ESPLÊNICOS DE CAMUNDONGOS DURANTE A PROGRESSÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL".

Bianca Ramos Mesquita

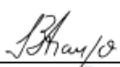
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 21 de junho de 2021.

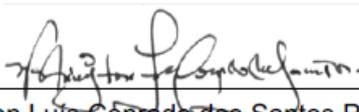
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Elisa Cupolillo
Pesquisadora
IOC/FIOCRUZ



Dra. Iguaracyra Barreto de Oliveira Araújo
Professora
UFBA



Dr. Washington Luis Conrado dos Santos Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB)

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

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, **Jurleide**, pelo apoio, incentivo e vibração a cada conquista minha, elas também são dedicadas a você;

Ao meu orientador, **Dr. Washington**, por todo incentivo, amizade, correções e ensinamentos. Levarei para a vida toda sua sabedoria compartilhada;

À minha coorientadora/amiga, **Kerol** (Caroline Melo), por estar sempre disponível e contribuir com sermões e grandes conhecimentos, obrigada master chefinha;

Aos meus amigos e colegas da pós, em especial **Jonathan** e **Reginaldo**, por sempre andarem lado a lado comigo nos caminhos tortuosos da pós-graduação, sempre com palavras amenas e esporros valiosos. Sem vocês essa dissertação jamais seria finalizada.

Aos meus amigos do **Grupo WLCS** e do **LAPEM**, pelo companheirismo e alegrias diárias;

A **Clecio**, por estar comigo em toda minha trajetória acadêmica, sempre acreditando em mim;

Aos meus amigos, em especial **Maria** e **Jamile**, por compartilhar das minhas angústias, felicidades e viagens. Vocês sempre me fazem sentir melhor!

À **Biblioteca** do IGM e seus funcionários, pelo suporte e correções;

Ao **Instituto Gonçalo Moniz**, pelo suporte e infraestrutura;

Às agências de fomento, **CNPq** e **FAPESB**, pela bolsa de mestrado e apoio financeiro do projeto;

Aos **animais** que fizeram esta pesquisa possível;

Por fim, a **todos aqueles** que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho fosse executado.

Muito obrigada!

MESQUITA, Bianca Ramos. Avaliação das alterações na celularidade dos microambientes esplênicos de camundongos durante a progressão da leishmaniose visceral. 2021. 65 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana e Experimental) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A leishmaniose visceral (LV) é uma doença parasitária causada por um protozoário do gênero *Leishmania*. Dentre os órgãos afetados, o baço se destaca por estar envolvido em todos os casos da doença, contribuindo para a imunopatogênese. Há relatos de desorganização do compartimento da polpa branca (PB) do baço, com alteração da celularidade do órgão nas formas graves de LV. **OBJETIVO:** Determinar a frequência e distribuição das células esplênicas de camundongos nos diferentes compartimentos do baço durante a LV experimental. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram utilizados 40 baços de camundongos infectados ou grupo controle. Os animais foram sacrificados 30, 60 e 90 dias após a injeção. Foi realizado estudo imuno-histoquímico no baço para detecção de linfócitos T (LT), linfócitos B (LB), plasmócitos e *Leishmania*. A contagem foi realizada em diferentes compartimentos esplênicos. **RESULTADOS:** Camundongos mantem a organização esplênica, com discretas alterações histológicas e ausência de sinais clínicos, exceto esplenomegalia. A progressão da doença está associada à diminuição de LT, LB e plasmócitos na polpa vermelha (PV). Enquanto os macrófagos infectados aumentam progressivamente em todos os compartimentos do baço. Apesar da presença de macrófagos infectados na PB, a proporção de LT e LB no local foi mantida durante quase todo o curso da infecção. **CONCLUSÕES:** A desorganização esplênica não é observada no decorrer da LV murina. A progressão da doença em camundongos está associada ao perfil subclínico, com permanência do parasita e diminuição significativa dos leucócitos esplênicos.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral; Imuno-histoquímica; Esplenócitos; Camundongos.

MESQUITA, Bianca Ramos. Evaluation of changes in the cellularity of mouse splenic microenvironments during the progression of experimental visceral leishmaniasis. 2021. 65 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana e Experimental) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Visceral *Leishmaniasis* (VL) is a parasitic disease caused by a protozoan of the genus *Leishmania*. Among affected organs, the spleen is highlighted for being involved in all cases of the disease, contributing to immunopathogenesis. Disorganization of the splenic white pulp (WP) compartment is reported, with changes in the organ's cellularity in severe forms of VL. **OBJECTIVE:** Determine frequency and distribution of mice splenic cells in the different compartments of the spleen during experimental VL. **MATERIAL AND METHODS:** Were used 40 spleens from infected mice or control group. Animals were euthanized 30, 60 and 90 days after injection. An immunohistochemical study was performed in the spleen to detect T lymphocytes (TL), B lymphocytes (BL), plasma cells and *Leishmania*. Counting was performed in different splenic compartments. **RESULTS:** Mice undergo maintenance of the splenic organization, slight histological changes, and absence of clinical signs, except for splenomegaly. Disease's progression is associated with decrease of TL, BL and plasma cells in red pulp (RP). While infected macrophages progressively increase in all compartments of the spleen. Despite of presence of macrophage infected in WP, the proportion of TL and BL at site was maintained for almost the entire course of the infection. **CONCLUSIONS:** Splenic disorganization is not observed in course of murine VL. Disease progression in mice is associated with subclinical profile, with persistence of the parasite and significant decrease in splenic leukocytes.

Keywords: Visceral *Leishmaniasis*; Immunohistochemistry; Splenocytes; Mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Avaliação de esplenomegalia em camundongos.....	38
Figura 2	Micrografias do baço dos camundongos.....	40
Figura 3	Densidade de macrófagos infectados com <i>Leishmania</i>	41
Figura 4	IHQ para <i>Leishmania</i>	41
Figura 5	Densidade de LT na PV e correção com macrófagos infectados.....	43
Figura 6	Distribuição dos LT na PV.....	45
Figura 7	Densidade de LT na PB.....	45
Figura 8	Distribuição dos LT na PB.....	45
Figura 9	Densidade de LB na PV.....	46
Figura 10	Distribuição dos LB na PV.....	47
Figura 11	Densidade de LB na PB.....	48
Figura 12	Distribuição dos LB na PB.....	48
Figura 13	Densidade de plasmócitos na PV.....	49
Figura 14	Distribuição dos plasmócitos na PV.....	50
Figura 15	Densidade de plasmócitos perivasculares em agrupados na PV.....	51
Figura 16	Distribuição dos plasmócitos perivasculares em agrupados na PV.....	51
Figura 17	Mapa de calor da densidade de células.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpos utilizados na fenotipagem de esplenócitos	33
Tabela 2	Evidência da infecção dos camundongos	37
Tabela 3	Representação dos valores do peso total e do baço dos animais	37
Tabela 4	Classificação da organização da polpa branca dos camundongos	38
Tabela 5	Análise histológica do baço de camundongos.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	<i>Antigen-Presenting Cell</i>
APRIL	Proliferation-Inducing Ligand
BAFF	<i>B-Cell Activating Fator</i>
CG	Centro Germinativo
CXCL	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand</i>
CXCR	C-X-C Motif Chemokine Receptor
DC	<i>Dendritic Cells</i>
DPI	Dias pós injeção
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunonosorbent Assay</i>
FC	Fold Change
FDC	<i>Follicular Dendritic Cells</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
HE	Hematoxilina e Eosina
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon Gama
LAPEM	Laboratório De Patologia Estrutural E Molecular
LB	Linfócitos B
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LT	Linfócitos T
LV	Leishmaniose Visceral
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMM	Macrófagos Metalofílicos De Zona Marginal
MZM	Macrófagos De Zona Marginal
M Φ	Macrófagos
NK	<i>Natural Killer</i>
NOS	<i>Nitric Oxide Synthase</i>
Nramp	<i>Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1</i>
PALS	<i>Periarteriolar Lymphoid Sheaths</i>

PB	Polpa Branca
PSG	<i>Promastigote Secretory Gel</i>
PV	Polpa Vermelha
RNI	<i>Reactive Nitrogen Intermediates</i>
ROI	<i>Reactive Oxygen Intermediates</i>
Tfh	<i>T Follicular Helper</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
Th1	<i>T Helper 1</i>
Th2	<i>T Helper 2</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
ZM	Zona Marginal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	LEISHMANIOSE VISCERAL	15
1.2	IMUNOPATOLOGIA DA LV	17
1.3	BAÇO E LV	20
1.3.1	Estrutura e função do baço	20
1.3.2	O baço nas doenças inflamatórias	23
1.3.3	O baço na LV	24
1.4	MODELOS DE ESTUDOS NA LV	25
2	JUSTIFICATIVA	28
3	OBJETIVOS	29
3.1	OBJETIVO GERAL	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	ANIMAIS E ESPÉCIMES UTILIZADOS NESTE ESTUDO	30
4.1.1	Considerações éticas	30
4.1.2	Espécimes	30
4.1.3	Infecção e acompanhamento dos animais	30
4.1.4	Coleta de sangue e necropsia	31
4.1.5	Evidência da infecção por <i>Leishmania</i>	31
4.1.5.1	<i>Cultura do macerado esplênico</i>	31
4.1.5.2	<i>ELISA</i>	31
4.1.6	Preparo espécimes para estudo histológico	32
4.1.7	Obtenção das secções para histologia e IHQ	32
4.1.8	Parâmetros da análise histológica	32
4.2	FENOTIPAGEM DAS CÉLULAS POR IMUNO-HISTOQUÍMICA	33

4.3	IDENTIFICAÇÃO DA <i>LEISHMANIA</i> POR IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	33
4.4	ANÁLISE MORFOMÉTRICA E DISTRIBUIÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES NO BAÇO	34
4.5	EXPRESSÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5	RESULTADOS	37
5.1	EVIDÊNCIA DA INFECÇÃO.....	37
5.2	ANÁLISE MORFOLÓGICA DO BAÇO	37
5.3	IDENTIFICAÇÃO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM <i>L. INFANTUM</i> 40	
5.4	ANÁLISE DAS POPULAÇÕES CELULARES ESPLÊNICAS POR IMUNO- HISTOQUÍMICA.....	42
5.4.1	Linfócitos T CD3⁺	42
5.4.2	Linfócitos B CD20⁺	46
5.4.3	Plasmócitos CD138⁺	49
5.5	ANÁLISE INTEGRADA DOS DADOS DE FENOTIPAGEM.....	52
6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÃO	58
8	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é doença parasitária, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, caracterizada pela presença de febre persistente, perda de peso e aumento do baço e fígado (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). A epidemiologia se associa a condições ambientais, climatológicos e sociais, sendo a pobreza um dos fatores mais influentes (READY, 2014). É transmitida entre os mamíferos através da picada de flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, com o cão representando um importante reservatório urbano da doença (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017).

Dentro os órgãos afetados na LV, o baço se destaca por ser acometido durante todo o curso da doença, com falha para conter a infecção (POULAKI; PIPERAKI; VOULGARELIS, 2021). O baço tem funções imunológicas importantes e possui dois compartimentos denominados de Polpa Branca (PB) e Polpa Vermelha (PV) (MEBIUS; KRAAL, 2005). Durante a LV, esses compartimentos sofrem alterações diversas como hiperplasia ou atrofia de folículos linfoides, desorganização da PB e substituição da celularidade normal do órgão (HERMIDA *et al.*, 2018).

Essas alterações decorrem do prejuízo na comunicação intercelular, bem como variação na frequência e disposição das populações celulares esplênicas (HERMIDA *et al.*, 2018). É demonstrado que na desorganização esplênica há diminuição de Células Dendríticas Foliculares (*Follicular Dendritic Cells* - FDC), plasmocitose na PV, redução e migração inadequada de linfócito B e apoptose de células T (SANTANA *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012).

O conhecimento dos eventos envolvidos na desestruturação esplênica auxilia na compreensão da doença humana e canina. Através do estudo imuno-histoquímico, objetivamos identificar como os esplenócitos estão distribuídos nos diferentes compartimentos esplênicos e quais alterações histológicas ocorrem na cinética de infecção.

1.1 LEISHMANIOSE VISCERAL

A LV, popularmente conhecida como calazar, é uma doença causada por protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania* (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017). As espécies causadoras da forma visceral da leishmaniose diferem dependendo da região, nos países da América do Sul e Central a *Leishmania infantum* é responsável pelos casos relatados (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). A leishmaniose é uma doença negligenciada, sendo a LV zoonótica considerada como a zoonose mais importante, ocasionando aproximadamente 500.000 novos casos e 40.000-50.000 óbitos por ano (LIDANI *et al.*, 2017). No Brasil, a taxa de letalidade alcançou 8,8% em 2017, com a maioria dos casos concentrados nas regiões Nordeste, Norte e Sudeste do país (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

No país, o principal vetor do protozoário são os flebotomíneos fêmeas da espécie *Lutzomyia longipalpis* (BARÇANTE *et al.*, 2015). No momento do repasto sanguíneo, o vetor ingere macrófagos ($M\Phi$) infectados com *Leishmania* de um hospedeiro mamífero parasitado. No intestino do flebótomo, desencadeia-se o desenvolvimento do parasito que posteriormente, migra para o intestino médio torácico, onde evoluem para forma metacíclica, capaz de infectar mamíferos. Em um novo repasto sanguíneo, o vetor regurgita no hospedeiro as formas infectantes, que são fagocitadas no local da inoculação, estabelecendo a infecção (BATES, 2007; SUNTER; GULL, 2017). Dentre as espécies afetadas, destacam-se os humanos e cães. Os cães têm papel importante no estabelecimento do ciclo urbano da doença, devido a susceptibilidade e proximidade ao homem (DANTAS-TORRES, 2007; PISCOPO; AZZOPARDI, 2007).

O curso da infecção em humanos depende das interações entre o parasito, ambiente, fatores genéticos e imunidade do hospedeiro, com manifestações que podem variar de doença fatal a perfil subclínico ou assintomático (KUMAR; NYLÉN, 2012; FALEIRO *et al.*, 2014). Pacientes podem apresentar respostas imunológicas diversas, que levam a resistência

ou susceptibilidade à doença de acordo com o perfil de citocinas secretado (TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007; KUMAR; NYLÉN, 2012; GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013).

Devido a afecção de vários órgãos na LV, há uma diversidade de apresentações clínicas, sendo as mais frequentes nos pacientes sintomáticos a hepatomegalia, esplenomegalia, pancitopenia, anemia progressiva e perda de peso (PISCOPO; AZZOPARDI, 2007; TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017). A letalidade da LV está relacionada a alguns fatores secundários, destacando-se coinfeções bacterianas, hemorragias e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana. Outros fatores como edema, desnutrição, anemia e possuir menos de cinco anos ou mais de quarenta também já foram descritos (DE ARAÚJO *et al.*, 2012; BELO *et al.*, 2014).

Por se tratar de uma doença de notificação compulsória e de grave evolução, o diagnóstico deve ser realizado com brevidade. No Brasil, é preconizado a realização de imunofluorescência indireta, testes rápidos imunocromatográficos e o Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay* - ELISA) para identificação de anticorpos *anti-Leishmania*. A identificação do parasito em esfregaço ou em cultura de material biológico, preferencialmente medula óssea, linfonodo ou baço permitem o diagnóstico de certeza, quando formas amastigotas ou promastigotas, respectivamente, são observadas. Porém para a obtenção desses espécimes são utilizadas técnicas invasivas, o que limita a realização com frequência (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Como medida de prevenção e controle da LV no Brasil, é recomenda a eutanásia de cães sororreagentes ou com exame parasitológico positivo. As medidas terapêuticas em cães não são recomendadas devido à baixa eficácia dos medicamentos empregados atualmente, não diminuindo a importância do cão como reservatório do parasito. O tratamento em humanos é realizado principalmente com antimoniais, mas devido aos efeitos colaterais, que atingem por exemplo o sistema cardiovascular,

muitos pacientes abandonam (BRASIL, 2006; PISCOPO; AZZOPARDI, 2007).

1.2 IMUNOPATOLOGIA DA LV

Devido às limitações para obtenção de órgãos afetados na LV humana, o conhecimento imunológico se baseia principalmente em modelos experimentais de roedores, nestes animais a definição das redes imunológicas que definem a susceptibilidade ou resistência ao parasito puderam ser melhor definidas (RODRIGUES *et al.*, 2016). Em todas as formas de leishmaniose e espécies de estudo, o controle e cura da infecção é direcionada pela ativação bem-sucedida de MΦ para destruição do parasito (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004).

A imunopatologia da LV começa desde o momento da picada. O flebótomo rompe vasos sanguíneos durante a alimentação e os parasitos são regurgitados em uma poça de sangue intradérmica. O inóculo infeccioso é composto também pela saliva do inseto, com potentes vasodilatadores e anti-hemostáticos, que, tem-se proposto, modula a resposta imune local. Igualmente, o *Promastigote Secretory Gel* (PSG) co-inoculado aumenta as reações patogênicas e o número de parasitos no sítio da picada (BATES, 2007; MCCALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013). Neutrófilos são as primeiras células recrutadas ao encontro da *Leishmania*, a fagocitose ativa do parasito pode levar a três diferentes desfechos: sucesso ao destruí-lo no fagolisossoma; a formação de armadilhas extracelular de neutrófilos, também levando a eliminação do parasito; ou as células sofrerem apoptose, resultando na formação de corpos apoptóticos contendo *Leishmania* que são fagocitados posteriormente, em alguns casos a *Leishmania* é capaz ainda de escapar destes corpos apoptóticos (KUPANI; PANDEY; MEHROTRA, 2021). Os parasitos, assim como os corpos apoptóticos, são fagocitados pelas células mononucleares, estabelecendo a infecção. Estas células migram do local da picada e iniciam respostas imunes adaptativas em órgãos específicos (FORESTIER, 2013; LIDANI *et al.*, 2017).

Vários mecanismos são ativados com o acesso da *Leishmania* ao organismo do hospedeiro. O sistema complemento é responsivo, porém a *Leishmania* obteve vantagem evolutiva, com a expressão de lipofosfoglicanos e a metaloprotease leishmanolisina o parasito inibe as ações líticas do hospedeiro (GURUNG; KANNEGANTI, 2015).

É possível que a disseminação ocorra ou pela propagação da infecção na derme, ou por células infectadas que migram para fora da pele, ou pela entrega de parasitos livres via circulação. Os estudos dos mecanismos de disseminação para as vísceras ainda são escassos, mas é sugerida que a vasodilatação que ocorre no local da picada é um dos fatores que promove o acesso da *Leishmania* aos órgãos (BATES, 2007; FORESTIER, 2013).

O perfil de resposta do hospedeiro na LV irá definir em muitos casos o espectro de doença apresentado. Apenas uma pequena parcela de parasitos inoculados sobrevive às defesas iniciais na derme. A secreção de interleucina (IL)-12 por Células Dendríticas (*Dendritic Cells* - DC) da pele é crítica para o desenvolvimento de um perfil de resistência, presente em animais com infecção subclínica ou assintomática. Essa citocina ativa células Assassinas Naturais (*Natural Killer* - NK), fonte inicial de Interferon Gama (INF- γ), que limita o crescimento do parasito até o início da resposta específica de células T. As células T CD4⁺ estimuladas e ativadas também irão secretar INF- γ e Fator de Necrose Tumoral (*Tumor Necrosis Factor* - TNF), todas estas citocinas agem sob macrófagos, estimulando a geração de Intermediários Reativos de Oxigênio (*Reactive Oxygen Intermediates* - ROI) e Intermediários Reativos de Nitrogênio (*Reactive Nitrogen Intermediates* - RNI) eficazes na destruição da *Leishmania* (TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007; KUMAR; NYLÉN, 2012; SAPORITO *et al.*, 2013; FALEIRO *et al.*, 2014).

Em contraste ao perfil de resistência, indivíduos e animais com doença ativa possuem resposta mista, com presença de citocinas de ambos os perfis, incluindo IL-4, Fator de Crescimento Transformador β (*Transforming Growth Factor Beta* - TGF- β) e em destaque a IL-10, descrita como a principal causadora de defeitos na resposta imunológica observada durante

a LV crônica. A IL-10 inibe a atividade leishmanicida dos MΦ e estimulam negativamente a expressão de moléculas coestimuladoras e o Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex - MHC*), favorecendo a replicação do parasito. Na ausência da citocina há aumento da resistência a infecção, porém com maior dano tecidual (KUMAR; NYLÉN, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2016; MEDINA-COLORADO *et al.*, 2017). Concomitantemente nas respostas mistas, a imunidade humoral se desenvolve desordenadamente e está mais associada aspectos patogênicos do que protetivos (STÄGER; BANKOTI, 2012). Em modelos experimentais com diversidade genética e conseqüente maior complexidade imunológica, é possível observar que apesar de existir variações na resposta imune frente a *Leishmania*, o desfecho clínico pode ser o mesmo (SAPORITO *et al.*, 2013).

Mutações pontuais e alterações na conformação de proteínas possivelmente se relacionam com o tropismo da *Leishmania* por diferentes órgãos (ZHANG *et al.*, 2014). As respostas órgão-específicas desenvolvidas irão definir a gravidade da doença apresentada, dentre os órgãos afetados, a medula óssea, fígado e o baço se destacam. O exame da medula óssea, colhida por aspiração é um dos métodos de diagnóstico da LV usado em todo o mundo, sendo esse um espécime de acesso mais fácil em comparação com a obtenção de amostra dos demais órgãos acometidos na LV humana.

Nos pacientes, a citologia da medula óssea possui alterações distintas, com predomínio variando entre hiper celularidade, granulomas, hemofagocitose, presença de células espumosas, blastos, aumento de plasmócitos, histiócitos e linfócitos, podendo ocorrer várias destas alterações em conjunto (KUMAR *et al.*, 2007; CHANDRA; CHANDRA; KAUSHIK, 2013; IDRIS; FARID; GUL, 2018). Os achados citológicos se relacionam com altos níveis de TNF, Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e MΦ (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor - GM-CSF*) e distúrbios hematológicos de pancitopenia (DHINGRA *et al.*, 2010).

Nas primeiras semanas após a infecção em camundongos, a *Leishmania* se multiplica rapidamente e é controlada em aproximadamente 8 semanas no fígado, o crescimento do parasito é contido pela formação de granulomas numa resposta mediada pelo perfil T auxiliar 1 (*T helper 1 - Th1*), com papel importante de TNF na formação das estruturas granulomatosas e posterior declínio da carga parasitaria (KUMAR; NYLÉN, 2012; DE FREITAS *et al.*, 2016). Em contraste, no baço a infecção avança, com o TNF associado a dano celular progressivo e disfunção da resposta imune (FALEIRO *et al.*, 2014). A progressão da infecção no órgão afeta primeiramente MΦ residentes. A carga parasitaria no local é mantida por um tempo. Embora seja capaz de conter a infecção, a resposta imune no baço não é eficaz. A carga aumenta progressivamente, levando a cronicidade (RODRIGUES *et al.*, 2016). A persistência do parasito está associada ao remodelamento histológico esplênico, apoptose de células residentes, infecção dos da ZM que secretam TNF, perturbando a dinâmica de interação celular, prejudicando a resposta adaptativa que se desenvolve no baço (DE FREITAS *et al.*, 2016). Alterações no perfil de migração de linfócitos e CDs também foram relatadas (STÄGER; BANKOTI, 2012; DE FREITAS *et al.*, 2016).

1.3 BAÇO E LV

1.3.1 Estrutura e função do baço

O baço é um órgão intraperitoneal localizado no quadrante superior esquerdo do abdômen, mantido anatomicamente nessa posição por dois ligamentos, o gastroesplênico e esplenorrenal (KAPILA; WEHRLE; TUMA, 2020; COFFEY; BALASUBRAMANYA, 2021). O baço é revestido por uma capsula de tecido conjuntivo denso e fibroso, a parte interna é projetada em direção ao parênquima e dá origem as trabéculas, fornecendo certa rigidez ao órgão. Na região do hilo, há entrada e saída de nervos, vasos linfáticos eferentes e vasos sanguíneos, os vasos arteriais e venosos se

subdividem e são transportadas através das trabéculas, adentrando a polpa esplênica (BLUE; WEISS, 1981; GROSSI; LYDYARD, 1998; CESTA, 2006).

O baço possui duas unidades principais, histologicamente e funcionalmente distintas: a PV e PB. A PV compreende os sinusoides, vasos sanguíneos que estão sobrepostos ao tecido conjuntivo de uma outra região denominada cordões esplênicos (PIVKIN *et al.*, 2016). Nos cordões, o sangue chega através das arteríolas centrais formando um sistema sanguíneo aberto, que permite a passagem dos eritrócitos para o local. Os seios venosos coletam o sangue dos cordões por sua estrutura descontínua incomum, entretanto, hemácias envelhecidas ou danificadas não conseguem retornar ao lúmen do sinusoide, ficam aprisionados nos cordões e são fagocitadas ativamente pelos MΦ residentes, ocorrendo a hemocaterese (GROSSI; LYDYARD, 1998; MEBIUS; KRAAL, 2005).

Após fagocitose nos cordões, os MΦ decompõem as hemácias e reciclam o ferro, utilizando-o, liberando da célula ou armazenando como ferritina, que em grandes quantidades podem se agregar em acúmulos de hemossiderina. É bem descrito mecanismos do macrófago que restringem a disponibilidade de ferro em situações de infecções, interferindo diretamente no metabolismo e crescimento microbiano, destacando a região como importante sítio em resposta a microrganismos (MEBIUS; KRAAL, 2005; GANZ, 2016). Na PV também é possível encontrar células reticulares, fibroblastos, polimorfonucleares, linfócitos, plasmócitos, fibras colágenas e elásticas (VAN KRIEKEN, 1997; CESTA, 2006).

A PB, região linfóide do baço, desempenha papel importante na defesa contra patógenos sanguíneos e na efetividade de respostas imunes adaptativas. A PB pode ser subdividida em Bainha Linfóide Periarteriolar (Periarteriolar Lymphoid Sheaths - PALS), folículos primários ou secundários [determinado pela presença de centro germinativo (CG) e zona do manto], zona marginal (em camundongos) ou zona perifolicular (em seres humanos) (GROSSI; LYDYARD, 1998; STEINIGER, 2015).

A PB é organizada de forma a permitir interações celulares de linfócitos T (LT) com linfócitos B (LB) e linfócitos com Célula Apresentadora

de Antígenos (*Antigen-Presenting Cell* - APC) para a elaboração de respostas imunes adaptativas (LEWIS; WILLIAMS; EISENBARTH, 2019). Os antígenos chegam no baço através de pequenos ramos arteriais que terminam na Zona Marginal (ZM), uma interface entre PB e PV, onde células do sistema imune inato, principalmente os MΦ de ZM (MZM) e MΦ metalofílicos de ZM (MMM), DC e LB de ZM estão e, ativamente rastreiam a circulação em busca de antígenos (MEBIUS; KRAAL, 2005; EISENBARTH, 2019).

Os MΦ da ZM, após fagocitose, começam a secretar citocinas pró-inflamatórias e efetuar a eliminação do patógeno. As células B de ZM presentes, captam os antígenos por meio de receptores específicos e migram para o folículo, conhecido também como zona de células B, devido à presença em grandes quantidades desse tipo de célula, ao chegar ao local, as FDC residentes irão receber em sua superfície os antígenos carregados pelas células B de ZM. As FDCs sensibilizadas com os antígenos, estimulam os LB foliculares a dar início a reação do CG, com posterior desenvolvimento de plasmoblastos, que migram para a PB e podem se diferenciar em plasmócitos produtores de anticorpos de alta afinidade (DEN HAAN; KRAAL, 2012; BRONTE; PITTET, 2013; EISENBARTH, 2019).

Uma parte dos antígenos também podem ser capturados ou transferidos diretamente dos MΦ para DCs que são encontrados na PB ou na ZM. As DCs migram para a PALS, que está posicionada em torno de arteríolas centrais, composta majoritariamente por LT (MEBIUS; KRAAL, 2005; LEWIS; WILLIAMS; EISENBARTH, 2019). Na PALS, as células B da ZM com ou sem auxílio das DCs, induzem a diferenciação dos LT *helper naive* em LT auxiliar folicular (*T follicular helper* - Tfh) que induzem a geração de plasmoblastos extrafolicular de baixa afinidade, ou se deslocam para interseção entre folículo-PALS, auxiliando os LB na hipermutação somática e troca de classe de anticorpos (DEN HAAN; KRAAL, 2012; CERUTTI; COLS; PUGA, 2013; EISENBARTH, 2019; LEWIS; WILLIAMS; EISENBARTH, 2019).

1.3.2 O baço nas doenças inflamatórias

O baço é importante local para o desenvolvimento da imunidade adaptativa e regulação de respostas inflamatórias (BRONTE; PITTET, 2013). Entretanto, algumas doenças infecciosas e não infecciosas são descritas por comprometerem a arquitetura esplênica e sua função (HERMIDA *et al.*, 2018).

Em neoplasias o baço é destacado por ser local de proeminente hematopoiese extramedular. É relatado a expansão profunda de células precursoras hematopoiéticas e mieloides imunossupressoras em adenocarcinomas de pulmão, cânceres hepatocelular, gástrico, renal e pancreático (WU; HUA; ZHENG, 2020). A hiperplasia linfoide, imunoblástica e plasmocitária é relatada em linfomas (BURKE; OSBORNE, 1983).

Em condições inflamatórias persistentes o baço também sofre alterações. A doença celíaca é a causa mais comum de asplenia, com hipoesplenismo e atrofia do órgão (DI SABATINO *et al.*, 2013). Outro exemplo de inflamação persistente é na doença falciforme, alterações como redução do folículo, expansão da PV, aumento de células mononucleares, diminuição de células linfócitos e plasmócitos é relatado (SZCZEPANEK *et al.*, 2012). A vaso oclusão congestiva ocasiona esplenomegalia inicialmente, progredindo com episódios de infarto, fibrose e atrofia, resultando em autoesplenectomia (BROUSSE; BUFFET; REES, 2014).

A ativação policlonal de células B e esplenomegalia ocorre no Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) (GLEICHMANN; VAN ELVEN; VAN DER VEEN, 1982), associado a hiperplasia da PB inicialmente e necrose multifocal em casos tardios (AUERBACH *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2013). Como no LES, a artrite reumatoide apresenta atrofia da PB em estágios tardios, com riscos de ruptura esplênica espontânea (FISHMAN; ISENBERG, 1997; WAHBA; MESSIHA; ABO-SAIF, 2016).

Em doenças infecciosas encontramos diferentes padrões de lesão. Na toxoplasmose, babesiose e malária a esplenomegalia pode estar associada a hiperplasia da PB em estágios precoces, ou atrofia da PB, desorganização

esplênica, congestão e expansão da PV tardiamente (URBAN *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2017; OKŁA *et al.*, 2017; DJOKIC; AKOOLU; PARVEEN, 2018; PEREIRA *et al.*, 2020). Em baço provindos de esplenectomia de pacientes com Vírus da Imunodeficiência Adquirida é observado hiperplasia de folículos com proeminente CG e congestão da PV (CHEYNIER *et al.*, 1994). Entretanto, baço derivados de necropsias mostra perda de FDC, involução do CG e surgimento de nódulos fibróticos no local (FOX; COTTLER-FOX, 1992; WILKINS *et al.*, 2003). Em situações congestivas, como esquistossomose e endocardite bacteriana, a esplenomegalia ocorre em conjunto a expansão dos compartimentos do baço (LEITE FREITAS *et al.*, 1999; COSENZA-CONTRERAS *et al.*, 2019).

1.3.3 O baço na LV

O baço está associado a todos os casos da LV, representando um local de persistência do parasito, em que o remodelamento e desorganização tecidual já foi relatado (VERESS *et al.*, 1977; CARRION *et al.*, 2006; SILVA-O'HARE *et al.*, 2016; MELO *et al.*, 2020).

As alterações dos compartimentos esplênico ocorrem sequencialmente, inicialmente na LV há hiperplasia de folículos linfoides, que progride para ausência de folículos com CG, perda progressiva dos limites da PB, atrofia e então desorganização, que se relaciona com a diminuição ou aumento de alguns tipos celulares no órgão (VERESS *et al.*, 1977; VERESS; ABDALLA; EL HASSAN, 1983; MELO *et al.*, 2020). Baseada em estudos de cães naturalmente infectados com *L. infantum*, foi proposto uma classificação morfológica relacionada a organização da PB esplênica em três categorias: o baço tipo 1, com todas suas sub-regiões delimitadas e organizadas; tipo 2 com algumas alterações de hipoplasia ou hiperplasia celular e delimitações de PV e PB prejudicadas, mas ainda visíveis; tipo 3, em que não há distinção clara entre os compartimentos esplênicos ou em que as regiões de PB estão ausentes (SANTANA *et al.*, 2008; MELO *et al.*, 2020).

A desorganização também está associada a redução da expressão de quimiocinas, como a CXCL13, responsáveis pela atração e retenção de LB no folículo linfóides, comprometendo assim a formação também do CG (SILVA *et al.*, 2012). As FDCs são as principais fontes da quimiocina, e estabelecem um feedback positivo na secreção de CXCL13 no baço, porém há diminuição desta população celular no curso da LV, concomitante a infiltração de MO parasitados no CG, sendo uma possível explicação para diminuição da expressão da proteína (SMELT *et al.*, 1997; EL SHIKH; PITZALIS, 2012).

Alterações na distribuição de populações celulares de plasmócitos é bem descrita. Foi observado que havia acúmulo dessas células na PV, que substituíam a celularidade normal da região e frequentemente estava associado a desorganização esplênica. Citocinas como Fator De Ativação Das Células B (*B-cell activating* fator - BAFF), Ligante Indutor de Proliferação (Proliferation-Inducing Ligand- APRIL) e CXCL12, que são importantes para manutenção, diferenciação e orientação dessas células, estavam reguladas positivamente nos baços de animais infectados, o que poderia explicar o prolongamento da sobrevivência e retenção dos plasmócitos no baço durante a LV (SANTANA *et al.*, 2008; SILVA-O'HARE *et al.*, 2016).

A esplenomegalia também é um achado comum na LV, com hiperplasia das células esplênicas (BADARO *et al.*, 1986). A hiperplasia gera distúrbios no órgão, que pode originar o hiperesplenismo, ou seja, o baço exacerba suas funções naturais, levando a desordens hematológicas pela destruição exacerbada de hemácias e provocando quadros de anemia, a deficiência nutricional é um fator agravante adicional para o quadro de anemia. A pancitopenia também está associada ao hiperesplenismo em estágios tardios da doença, devido ao sequestro esplênico das células circulantes (VARMA; NASEEM, 2010; LV *et al.*, 2016).

1.4 MODELOS DE ESTUDOS NA LV

Alguns animais têm sido empregados nos estudos da LV. O cão é o principal reservatório urbano da LV zoonótica e reproduzem infecção natural semelhante a infecção humana (GUPTA; NISHI, 2011). Pesquisas feitas utilizando o modelo canino permitiu elucidar aspectos da imunidade celular e possíveis mecanismos de resistência e susceptibilidade presentes na doença. O desenvolvimento de terapias medicamentosas foram um dos avanços que acompanharam os estudos em cães, favorecido por seu metabolismo da droga e farmacocinética similares aos parâmetros encontrados em humanos (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014; YADAGIRI; SINGH, 2018). Porém, seu uso é limitado devido ao alto custo e as implicações éticas, com os modelos de roedores sendo preferidos (KUMAR; NYLÉN, 2012).

Hamster e camundongos são modelos de infecção amplamente utilizados para estudos imunológicos, patológicos e terapêuticos na LV (CROFT; YARDLEY, 1999). Infecções em hamster sírio se mostraram duradouras, a incapacidade da ativação eficiente de MΦ mediada por IFN- γ , e a diminuição de Óxido Nítrico Sintase (*Nitric Oxide Synthase* - NOS)-2 devido a defeitos genéticos são fatores que influenciam na falha da depuração e controle da replicação do parasito (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014; YADAGIRI; SINGH, 2018). O resultado é doença letal e progressiva, representativa dos hospedeiros naturais com doença grave na LV (MELBY *et al.*, 2001; KUMAR; NYLÉN, 2012). Mesmo se mostrando útil para entendimento dos mecanismos na LV, a alta susceptibilidade inata do animal e disponibilidade escassa de reagentes específicos para a espécie, o tornam um modelo menos adequado para estudo das respostas imunológicas, mas útil em testes de drogas (GUPTA; NISHI, 2011; KUMAR; NYLÉN, 2012; YADAGIRI; SINGH, 2018).

Camundongos de linhagens específicas têm sido extensivamente utilizados em infecções experimentais com *Leishmania*, a disponibilidade expansiva de reagentes, histórico genético homogêneo, custo acessível, fácil alojamento e manuseio são fatores que implicam na escolha deste modelo (JIMÉNEZ-ANTÓN *et al.*, 2019).

A susceptibilidade ou não a infecção por *Leishmania* em murinos tem explicação genética, linhagens resistentes como o camundongo CBA, expressam o gene *Slc11a1*, que codifica a Proteínas de Macrófagos Associadas à Resistência Natural 1 (*Natural Resistance Associated Macrophage Protein* - Nramp-1) funcional e confere o controle da infecção. Entretanto, camundongos das linhagens C57BL/6 e BALB/c possuem o gene *Slc11a1* não funcional devido a uma mutação pontual, que favorece a rápida replicação do parasito e o estabelecimento da infecção nas primeiras semanas após a inoculação (KUMAR; NYLÉN, 2012; FALEIRO *et al.*, 2014). A nramp1 é uma proteína expressa em membranas fagossômicas infectadas e controlam a disponibilidade de ferro e manganês no compartimento intrafagossômico, restringindo o acesso dos patógenos aos íons, função importante para a limitar a multiplicação da *Leishmania* no espaço intracelular (NIETO *et al.*, 2011). A falha na resposta de camundongos também é atribuída ao desenvolvimento de respostas de perfil T auxiliar 2 (*T helper 2* - Th2), com produção de IL-4, IL-10 e TGF- β , implicando em inativação do poder microbicida dos M Φ (YADAGIRI; SINGH, 2018).

A susceptibilidade em BALB/c a possibilita o estudo de respostas órgãos-específicas, sabidamente a infecção no fígado por exemplo é limitada, mas no baço progride, com controle tardio do parasitismo, mas que são mantidos no órgão por toda vida (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014). Apesar da susceptibilidade, por controlarem o agravamento da doença, não reproduzem a LV progressiva observada em muitos cães e seres humanos, mas dispõe de reagente que possibilitam a caracterização de fatores referentes ao hospedeiro e resposta imune, compreendendo também estudos de resolução clínica, infecção subclínica e aguda (GOTO; PRIANTI, 2009; ONG *et al.*, 2020; SAINI; RAI, 2020).

2 JUSTIFICATIVA

A desorganização esplênica está associada ao agravamento da LV favorecendo comorbidades e óbito. Entender os mecanismos e as alterações esplênicas que ocorrem na doença irá auxiliar na compreensão dos mecanismos de resistência e susceptibilidade a infecção. Assim, auxiliando futuramente o prognóstico do paciente, desenvolvimento de vacinas e tratamentos mais adequados.

Alguns estudos mostram alterações histológicas na LV murina (ASHWIN *et al.*, 2019; CARRIÓN *et al.*, 2006; MELO *et al.*, 2020; VERESS; ABDALLA; EL HASSAN, 1983). Entretanto, os limites e sub-regiões da PB em camundongos são menos evidentes na coloração Hematoxilina e Eosina (HE) e microscopia convencional, comparado ao observado em cães e seres humanos. É possível que o contato constante a antígenos seja um fator que leve ao destaque das sub-regiões observada nestas espécies. Logo, há dificuldade em afirmar se em camundongos a desorganização ocorre de fato, como em infecções naturais.

O estudo imuno-histoquímico permitirá identificar células e destacar os compartimentos da PB e seus limites. Dessa forma, propomos um estudo sequencial das alterações esplênicas envolvidas na LV murina. Em apoio, o estudo em camundongos auxiliará na compreensão dos eventos celulares associados a doença subclínica, mecanismos de resistência e reparo tecidual.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar sequencialmente as alterações celulares esplênica *in situ* no curso da infecção por *L. infantum* em camundongos utilizando imuno-histoquímica (IHQ).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Ajustar procedimentos imuno-histoquímicos para identificação de linfócitos T, LB e plasmócitos em baços de camundongos;
- b. Identificar as alterações das subpopulações de linfócitos T, LB e plasmócitos presentes no baço de camundongos da linhagem *BALB/c* em 30, 60 e 90 dias pós a infecção experimental por *L. infantum* por IHQ;
- c. Avaliar a distribuição dessas células nos diferentes compartimentos esplênicos;
- d. Examinar a presença e distribuição de fagócitos infectados com *L. infantum* nos baços dos animais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E ESPÉCIMES UTILIZADOS NESTE ESTUDO

4.1.1 Considerações éticas

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais vivos 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/l11794.htm) e com as diretrizes da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) para pesquisa com animais (<https://www.bahia.fiocruz.br/cpqgm/comite-de-etica-no-uso-de-animais/>). Esta proposta foi aprovada pelo comitê de ética para o uso de animais em pesquisa sob licenças N.004/2013 e 017/2015.

4.1.2 Espécimes

O material experimental utilizado neste estudo consta de espécimes histológicos provindos do arquivo de amostras histológicas do Laboratório de Patologia Estrutural e Molecular (LAPEM), no Instituto Gonçalo Moniz (IGM), FIOCRUZ. O material foi coletado em 2018, e processado conforme descrito abaixo. Outros estudos foram previamente conduzidos utilizando essas amostras e outras colhidas dos mesmos animais. Informações adicionais sobre os procedimentos experimentais e análises prévias estão detalhadas em outras publicações (MELO *et al.*, 2020; MELO, 2019). Apresentaremos abaixo um sumário desses procedimentos em conjunto com os procedimentos deste estudo.

4.1.3 Infecção e acompanhamento dos animais

Foram utilizados 40 camundongos BALB/c (*Mus musculus*), com idade entre 6 a 8 semanas, obtidos e mantidos no biotério do Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz/BA, em ambiente controlado de temperatura, períodos de

claro e escuro, ração específica e água *ad libitum*. Cada ponto da análise incluiu 14 animais, com exceção do último ponto que incluiu apenas 12 animais, sendo eles 30, 60 e 90 dias pós injeção (dpi) para acompanhar as alterações esplênicas no curso da infecção. Os animais foram distribuídos entre: grupo controle, com aplicação de 1mL de solução salina via intraperitoneal; grupo infectado, inoculados com 1mL de *L. infantum* (cepa MHOM /BR2000 /Merivaldo2) em fase estacionária de cultivo in vitro, suspensas numa concentração 1×10^8 /mL em solução salina utilizando a mesma via de administração. A cultura estava na segunda passagem. As *Leishmanias* foram obtidas através de cultura de esplenócitos de hamsters *Mesocricetus auratus* previamente infectados.

4.1.4 Coleta de sangue e necropsia

Os camundongos foram anestesiados com cetamina + xilazina e coletado o sangue via punção intracardíaca. Para a eutanásia, foi injetado uma dose letal de anestésico. A necropsia foi realizada e o baço foi coletado, um fragmento foi destinado a estudos histológicos, fixados em paraformaldeído por 24 horas e embebidos em parafina. Outro fragmento foi separado para utilização na evidência da infecção.

4.1.5 Evidência da infecção por *Leishmania*

4.1.5.1 *Cultura do macerado esplênico*

O fragmento esplênico foi macerado e cultivado em meio bifásico (ágar sangue + meio de Schneider completo) em incubadora B.O.D. a 24°C por 4 semanas. Para a identificação do parasito, as observações microscópicas foram realizadas semanalmente dentro do prazo estabelecido (BARROUIN-MELO *et al.*, 2004).

4.1.5.2 *ELISA*

O sangue total, obtido em tudo seco foi centrifugado a 1200rpm, por 10' em temperatura ambiente para separação e obtenção do soro. A técnica foi realizada no soro dos camundongos para detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania* conforme protocolo descrito (DOS-SANTOS *et al.*, 2008).

4.1.6 Preparo espécimes para estudo histológico

Fragmentos de baço foram fixados em paraformaldeído a 4% por 24 horas em temperatura ambiente, após fixação o tecido é desidratado em crescentes gradiente de álcool, mergulhado em xilol para remover o álcool restante, embebidos em parafina e preservadas para uso.

4.1.7 Obtenção das secções para histologia e IHQ

Tecidos fixados foram cortadas em secções de ~4 µm de espessura para coloração em HE ou adicionadas a lâminas silanizadas (Sakura Finetek, Torrance, Estados Unidos) para IHQ. As secções foram desparafinizadas através de submersão consecutivas em xileno e reidratadas utilizando concentrações decrescentes de álcool.

4.1.8 Parâmetros da análise histológica

Os tecidos dos animais foram examinados sem conhecimento prévio dos grupos do estudo, com orientação de dois médicos patologistas. Foram estimados: (1) Granulomas: agregado focal organizado de quatro ou mais MΦ epitelioides. (2) 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). (3) Tamanho dos folículos linfoides e CG: foram classificados em escore. Para os CGs foi considerada também a categoria ausente.

4.2 FENOTIPAGEM DAS CÉLULAS POR IMUNO-HISTOQUIMICA

Para identificar as populações celulares de linfócitos T, B e MΦ, as lâminas preparadas foram imersas em solução de hidróxido de amônio 20% em álcool a 95% por 20' para remoção de pigmentos de formol, peróxido de hidrogênio 3% por 10' para bloqueio da peroxidase endógena e em Tris-EDTA pH 9,0, a 115°C em panela de pressão elétrica 70 kPa, por 20' para recuperação antigênica. As lâminas, ainda submersas na solução de recuperação antigênica foram resfriadas 20' em temperatura ambiente, com posterior bloqueio de ligações inespecíficas com albumina sérica bovina 5% por 20'. Entre cada etapa sinalizada no processo, as lâminas foram submetidas a lavagens com água destilada ou PBS.

As amostras foram incubadas 16-18 horas, a 4°C em câmara úmida com anticorpos primários anti-CD3 (linfócitos T), anti-CD20 (LB), anti-F4/80 (MΦ), seguido de incubação com o anticorpo secundário conjugado HRP ou HRP Polymer Detection (Vector Laboratories, California, Estados Unidos). Como controle negativo, as secções foram incubadas pelo mesmo tempo com imunoglobulinas do mesmo isotipo e espécie do anticorpo primário. A marcação foi revelada utilizando uma solução de 3,3-diaminobenzidina 0,02% por 5', os núcleos contracolorados em hematoxilina de Harris (Sigma) e montadas com meio de montagem rápida entellan (Entellan®, 107960 - Merck KGA, Darmstadt, Alemanha). Os detalhes dos anticorpos utilizados foram definidos previamente e estão sumarizados na tabela 1.

Tabela 1. Anticorpos utilizados na fenotipagem de esplenócitos

Anticorpo	Clone	Titulação	Fabricante	Código
Anti-CD3	SP7	1/400	Abcam	ab16669
Anti-CD20	SP32	1/200	Abcam	ab62088
Anti-CD138	281-2	1/2000	Biosciences	553712

4.3 IDENTIFICAÇÃO DA *LEISHMANIA* POR IMUNO-HISTOQUIMICA

Após o tratamento das lâminas descritos no tópico 5.4, elas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio 0,3% em metanol por 30' para bloqueio da peroxidase endógena e permeabilização das células, com posterior bloqueio de ligações inespecíficas utilizando albumina sérica bovina 5% em PBS1x por 30'. As secções foram incubadas por 16-18 horas, a 4°C em câmara úmida com anticorpos primário anti-*Leishmania* produzidos no laboratório, seguidas de incubação com anticorpo secundário e revelação iguais as descritas no tópico anterior.

4.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA E DISTRIBUIÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES NO BAÇO

As secções dos baços, coradas para os diferentes anticorpos, foram scaneadas num aumento de 400x utilizando o Olympus VS110 (Olympus America Inc, Estados Unidos). Para a captura das regiões de contagem o programa Olyvia OLYMPUS versão 2.9 (Olympus America Inc, Estados Unidos) foi utilizado.

As seleções das regiões de PV foram realizadas da seguinte forma: a primeira área é definida de acordo com a presença do maior número de células marcadas ("hot spot"), em seguida mais quatro áreas adjacentes (acima, abaixo, ao lado direito e ao esquerdo da primeira imagem selecionada) são fotografadas, sem sobreposições das áreas selecionadas e excluindo regiões da PB. As contagens da PV, realizadas através do software ImageJ Fiji (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos) para os marcadores CD3, CD138 e anti-*Leishmania* (considerada a contagem de MΦ parasitados) foram realizadas manualmente. No caso de CD20, devido à grande densidade de marcação na PV, dificultando a visualização individualizada das células, a contagem foi realizada de forma automatizada.

Para analisar as regiões de PB, os parâmetros sugerido por Silva-O'hare e colaboradores (2016) em conjunto com as descrições estruturais histológicas do baço foram utilizados (CESTA, 2006; MEBIUS; KRAAL,

2005). As 5 maiores PBs foram selecionadas e contornadas em todas as marcações, seguindo critério de possuir arteríola central evidente e em corte transversal. Adicionalmente, para marcadores de CD3 e CD20, em que era possível ter uma visualização clara dos limites da PALS, essa sub-região também foi delimitada para contagem. As áreas foram estimadas morfometricamente e, dentro de cada região, a contagem foi realizada.

A contagem de células CD3⁺ e CD20⁺, em que há uma grande densidade de células positivas na PB, foi efetuada de forma automatizada. Para os marcadores em que não é possível distinguir a sub-região da PALS, como CD138 e anti-*Leishmania*, foi considerada a delimitação apenas da área de PB total, e as contagens foram realizadas manualmente devido à baixa densidade de células positivas.

Para as representações numérica das contagens, no caso das automatizadas, foram consideradas as proporções da área marcada/área total da imagem (PV) ou da área delimitada (PB e PALS). No caso da contagem manual, em que é gerado um número absoluto, é considerada a contagem por milímetro quadrado (densidade de população de células positivas=(número de células/medida da área definida)*1.000.000. As médias das medidas das 5 regiões de cada animal foram utilizadas para a análise estatística.

4.5 EXPRESSÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em valores numéricos absolutos e relativos, em tabelas e gráficos quando adequado. Os testes estatísticos e gráficos equivalentes foram realizados no software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Estados Unidos). Para análise por ponto de observação os valores foram comparados entre os grupos controle e infectado, nos dados paramétricos foi utilizado o teste T, e não paramétrico o Mann-Whitney.

Para analisar a diferença da frequência de células nos animais infectados entre os pontos da cinética de avaliação, utilizamos a medida de

fold change (FC). O FC representará a densidade relativa, ou seja, quantas vezes o valor final (X) altera em relação ao valor referência (Y), através da fórmula $(X-Y)/Y$. Portanto, teremos a razão de quantas vezes o animal infectado tem a frequência de células aumentada ou diminuída em relação à média do grupo controle. A análises da densidade relativa entre os pontos foi realizada através do ANOVA (pós teste Tukey) para dados paramétricos e o Kruskal-Wallis (pós teste de Dunn) para não paramétricos. As correlações foram realizadas com o teste Spearman r. A plataforma Orange (Orange Data, Eslovênia) foi utilizada na construção do mapa de calor. O valor para significância dos resultados foi estabelecido em $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 EVIDÊNCIA DA INFECÇÃO

Todos os animais injetados com *Leishmania* apresentaram cultura positiva em todos os pontos de avaliação (Tab. 2). O teste sorológico foi negativo em três animais do grupo infectado no ponto de 30 dias, sendo positivo em todos os animais nos pontos subsequentes. Não foi observada diferença entre o peso dos animais durante todo o período da infecção. Os animais infectados não apresentaram sinais clínicos comuns da LV, exceto esplenomegalia (Fig. 1).

Tabela 2. Evidência da infecção 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.

5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO BAÇO

Na tabela 3 estão descritos os valores relativos do peso do baço e dos animais. Os baços dos animais infectados com *Leishmania* aumentaram progressivamente de peso conforme observado 60 e 90 dpi (Tab. 3, Fig. 1).

Tabela 3. Representação dos valores do peso total e do baço dos animais

Parâmetros	30 dias		60 dias		90 dias	
	CT	INF	CT	INF	CT	INF
Peso dos animais (g)	33,2 [30,8-33,6]	32,0 [30,0-32,8]	24,6 [24,5-25,8]	25,6 [23,4-26,8]	30,2 [29,4-30,4]	30,3 [27,8-30,9]
Peso do baço (g)	0,14 [0,13-0,16]	0,14 [0,14-0,14]	0,11 [0,1-0,13]	0,28 [0,25-0,32]	0,12 [0,1-0,13]	0,56 [0,39-0,61]
% peso do baço	0,43 [0,41-0,53]	0,45 [0,42-0,47]	0,43 [0,42-0,46]	1,11^a [1,09-1,20]	0,42 [0,37-0,43]	1,81^b [1,46-2,02]

Nota: CT=grupo controle; INF= grupo infectado; Valores representados em medianas e intervalos interquartis [p25-p75]; ^{a-b} representam a diferença da relação peso do baço e peso do animal entre os grupos controle e infectado, em 30, 60 e 90 dpi. ^a: p=0,0006, Mann-Whitney test; ^b: p= <0,0001, teste t.

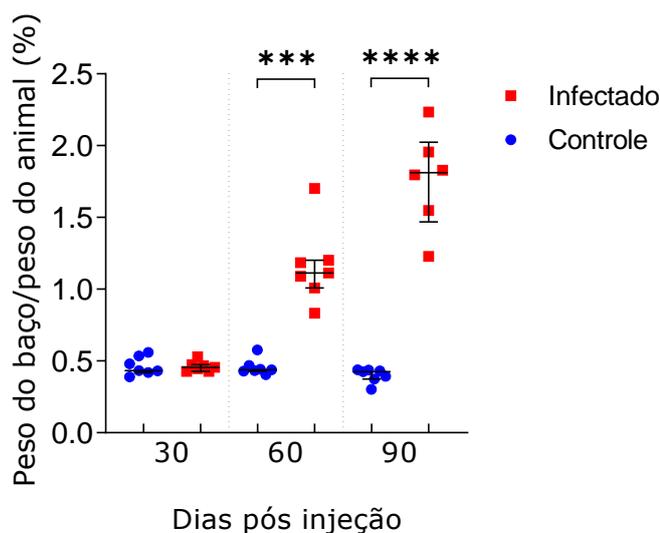


Figura 1. Avaliação de esplenomegalia em camundongos. Relação entre o peso do baço e o peso total do animal em percentual, nos grupos controle e infectado, dos pontos de avaliação 30, 60 e 90 dpi. ***= $p \leq 0,001$; ****= $p \leq 0,0001$. Representação em medianas e intervalos interquartis [p25-p75].

Dentre os camundongos infectados com *L. infantum*, 3/20 apresentaram discreta desorganização da PB (correspondendo a baços tipo 2), 2 30 dpi e 1 no 90º dpi. Dentre os camundongos do grupo controle, 1 animal apresentou baço tipo 2 no 60º dpi (Tab. 4). Não foi observada desorganização moderada ou severa (correspondente a baço tipo 3) em qualquer dos animais dos dois grupos.

Tabela 4. Classificação da organização da polpa branca 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)
Organização esplênica						
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

A proporção PB/PV varia no curso da infecção. Essa proporção foi maior após 30 dpi que a observada nos animais do grupo controle. Houve aumento do tamanho de folículos, com aumento dos centros germinativo

nos baços dos animais infectados, evidente 60 dpi e persistindo após 90 dpi. Contudo, após 60 dpi houve redução da PB nos animais infectados. Foi observada hiperplasticidade na PV e presença de granulomas (Tab. 5). A figura 2 mostra imagens representativas dos baços dos animais infectados e sem infecção.

Tabela 5. Análise histológica do baço de camundongos.

Parâmetros	30 dias	60 dias	90 dias
Tamanho do folículo			
Controle	0 [0 - 1]	1 [0 - 1]	0 [0 - 1]
Infectado	1 [0 - 2]	1 [1 - 2]	2 [0,7 - 3]^a
Centro germinativo			
Controle	1 [0 - 1]	0 [-0,5 - 0,5]	0 [-1 - 0]
Infectado	1 [0,7 - 1]	2 [1 - 2]^b	2 [1 - 3]^c
Celularidade da PV			
Controle	0 [0 - 1]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]
Infectado	1 [1 - 1]	0 [0 - 0]	1 [0,7 - 1,2]^d
Granuloma na PV			
Controle	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]
Infectado	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	1,5 [1 - 3]^e
Proporção da PB			
Controle	33 [26 - 40]	40 [39 - 46]	34 [32 - 41]
Infectado	48 [38 - 48]^f	37 [29 - 40]^g	35 [31,7 - 38,5]

Nota: Valores representados em mediana e intervalos interquartis [p25-p75]. ^{a-g} representam a diferença do score ou porcentagem de cada parâmetro entre os grupos controle e infectados, em 30, 60 e 90 dpi. ^a: p=0,03, Mann-Whitney test; ^b: p=0,02, Mann-Whitney test; ^c: p=0,003, Mann-Whitney test. ^d: p=0,004, Mann-Whitney test; ^e: p=0,0006, Mann-Whitney test; ^f: p=0,006, Mann-Whitney test; ^g: p=0,03, t test.

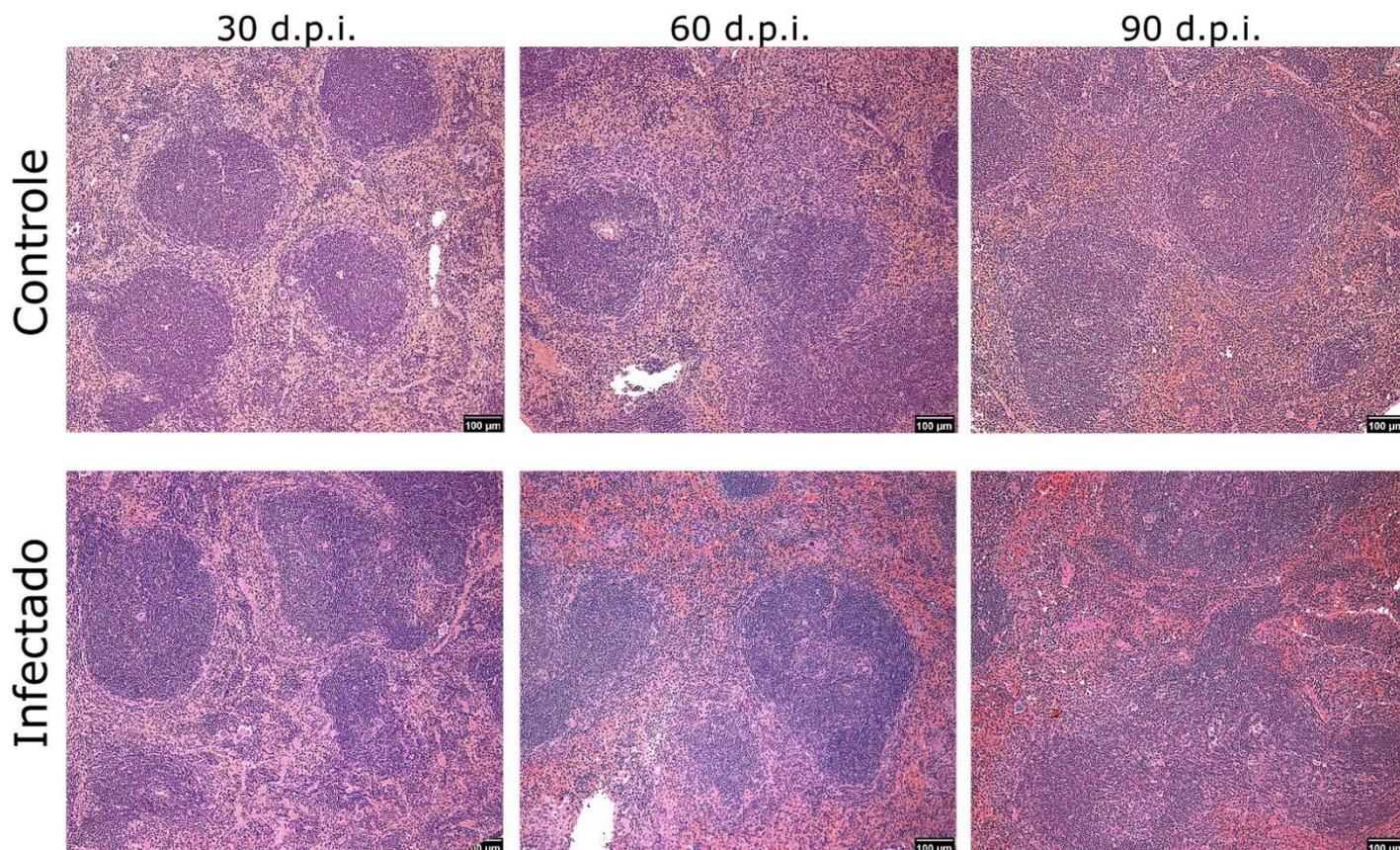


Figura 2. Micrografias do baço dos camundongos. Fotos representativas do baço de camundongos dos grupos controle e infectado, 30, 60 e 90 dpi. Aumento 100x; Barras= 100µm.

5.3 IDENTIFICAÇÃO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM *L. INFANTUM*

MΦ parasitados por *Leishmania* foram observados a partir de 30 dpi nos baços dos animais infectados, com aumento significativo do número de células parasitadas 90 dpi na PV (Fig. 3a; $p=0,007$, ANOVA e pós teste Tukey) e PB (Fig. 3b, $p=0,0005$, Kruskal-Wallis e pós teste Dunn). Não foram vistas amastigotas de *Leishmania* nos animais do grupo controle. Essas marcações estão representadas na figura 4.

Macrófagos infectados com *Leishmania*

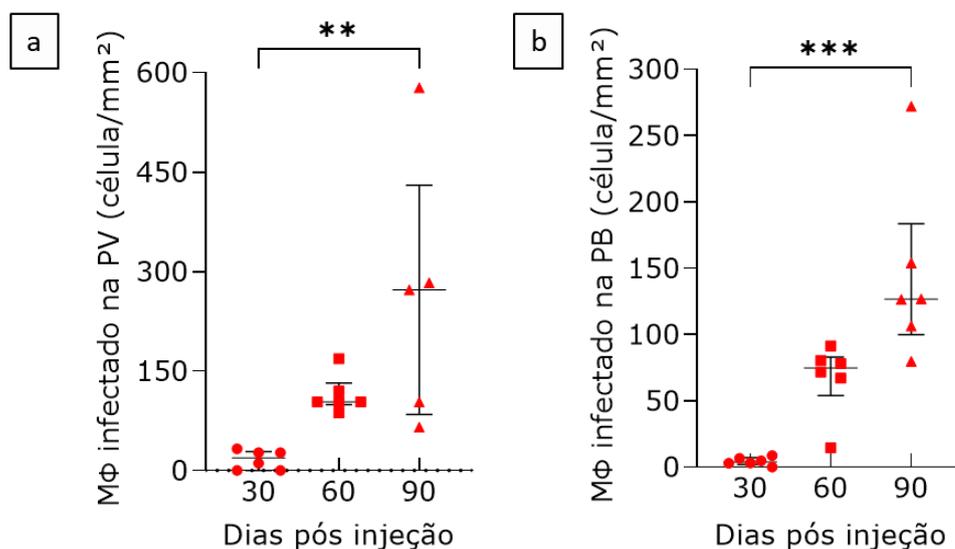


Figura 3. Densidade de macrófagos infectados com *Leishmania*. a: Número de macrófagos parasitados com *Leishmania* na PV, comparados entre os pontos; b: Número de macrófagos parasitados com *Leishmania* na PB, comparados entre os pontos. **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$. Representação em medianas e intervalos interquartis [p25-p75].

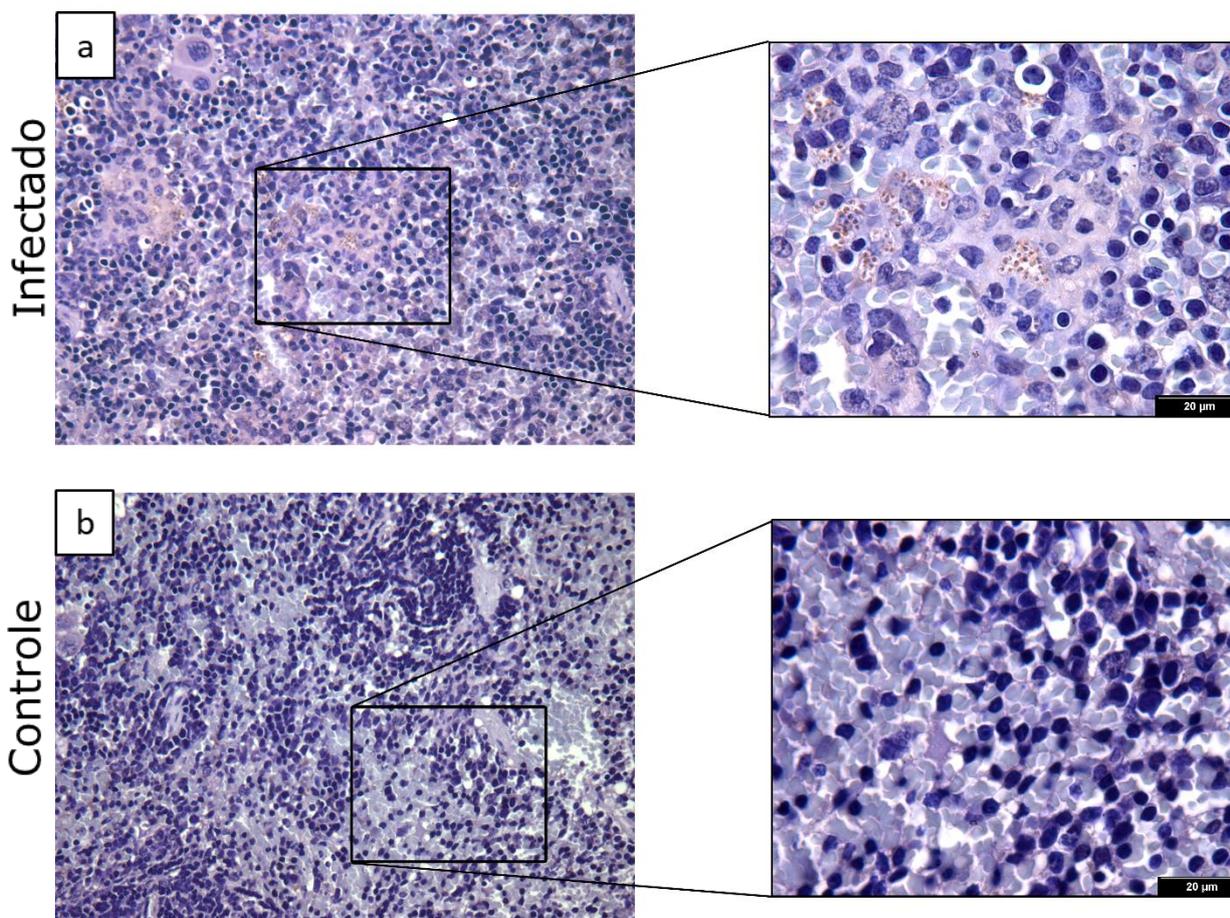


Figura 4. IHQ para *Leishmania*. a: Micrografia representativas da marcação para *Leishmania* no tecido esplênico parasitado. b: micrografia representativa da ausência da marcação no tecido esplênico de animais controle. Aumento 1000x; barra= 20 µm.

5.4 ANÁLISE DAS POPULAÇÕES CELULARES ESPLÊNICAS POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

A reação de IHQ permitiu uma clara identificação e contextualização das principais populações leucocitárias nos compartimentos esplênicos. Para padronização dos marcadores, os tecidos foram submetidos a diferentes métodos de recuperação antigênica: recuperação por calor (tampões citrato pH 6,0 e EDTA pH 9,0) ou digestão enzimática (proteínase K, 20 µg/mL). Todos os anticorpos utilizados apresentaram melhor performance na recuperação por calor com tampão EDTA pH 9,0.

Para padronizar a diluição dos anticorpos, diferentes concentrações foram testadas. Consideramos para uso a maior diluição, em que era possível obter marcação satisfatória sem que houvesse diminuição na intensidade do sinal. As diluições definidas e referências do anticorpo estão descritas na tabela 1. Em nosso estudo não conseguimos padronizar a marcação para o anticorpo anti-F4/80 (Bio-Rad, referência MCA497G), específico para macrófagos da PV de camundongos. Testamos todas as recuperações recomendadas pelo fabricante e citadas na literatura, bem como diferentes diluições. Ainda assim, as marcações não foram satisfatórias, com coloração fraca (mesmo em altas concentrações do anticorpo) e padrão de marcação não condizente com o esperado.

5.4.1 Linfócitos T CD3⁺

Os camundongos infectados possuem maior densidade de LT na PV 30 dpi (Fig. 5a; $p=0,0006$, teste Mann-Whitney) e menor densidade 90 dpi (Fig. 5a; $p=0,03$, teste t) do que os animais do grupo controle. A densidade relativa ao controle mostra uma redução da densidade de LT 90 dpi comparado a 30 dpi (Fig. 5b; $p=0,0002$, pós-teste Kruskal-Wallis e Dunn). Há uma relação inversa entre densidade de LT e a de MΦ infectados, na PV

[Fig. 5c; intervalo de confiança (IC) $-0,924$ a $-0,46$, teste Spearman r]. As marcações para CD3 na PV estão representadas na figura 6.

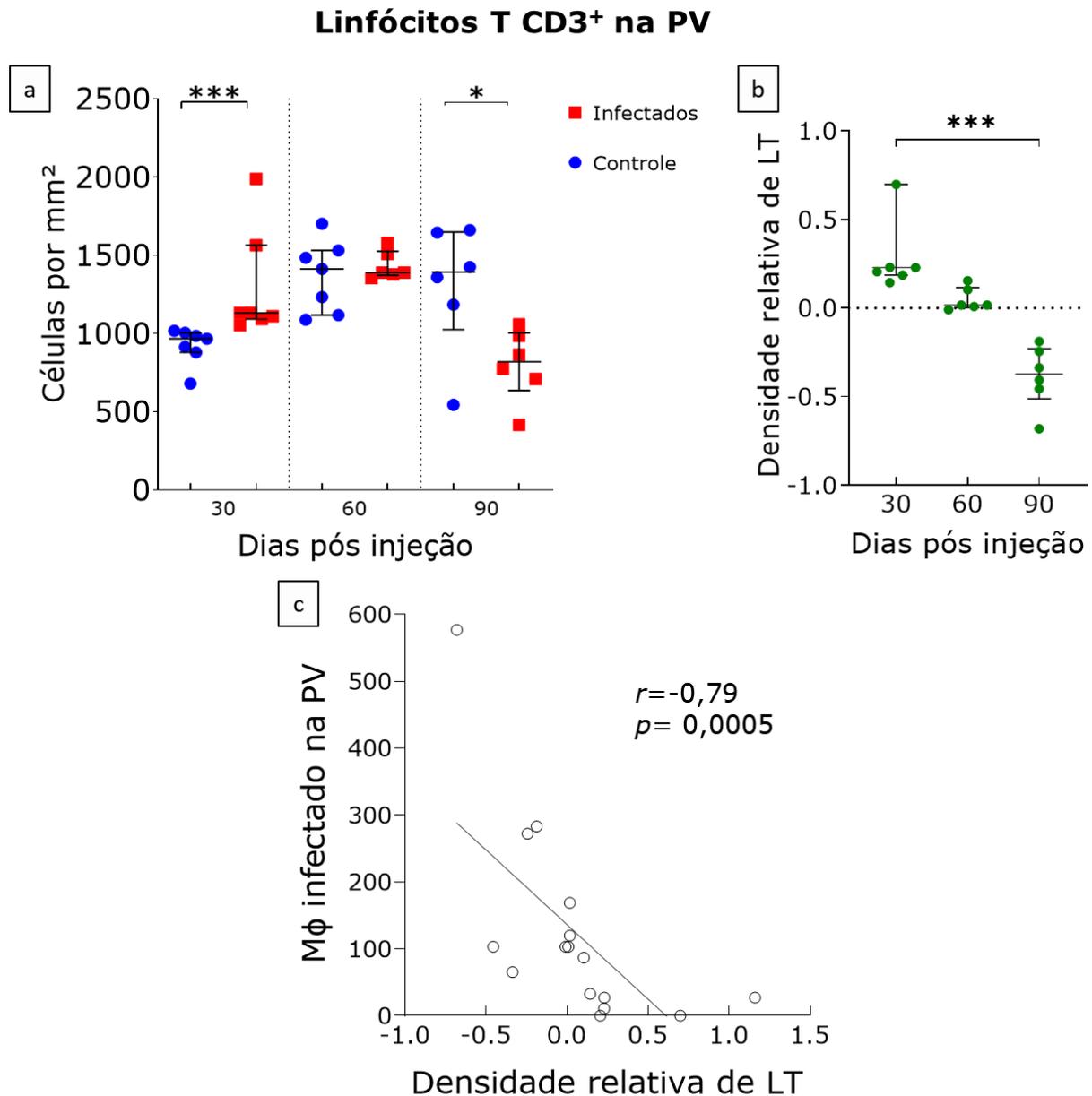


Figura 5. Densidade de LT na PV e correção com macrófagos infectados. a: Número de células CD3⁺ na PV dos grupos controles (azul) e infectados (vermelho), nos diferentes pontos de avaliação; b: comparação da densidade relativa de LT na cinética de avaliação; c: correlação entre a densidade relativa de LT na PV com o número de macrófagos parasitados na PV. $*=p \leq 0,05$; $***= p \leq 0,001$. Representação em medianas e intervalos interquartis [p25-p75].

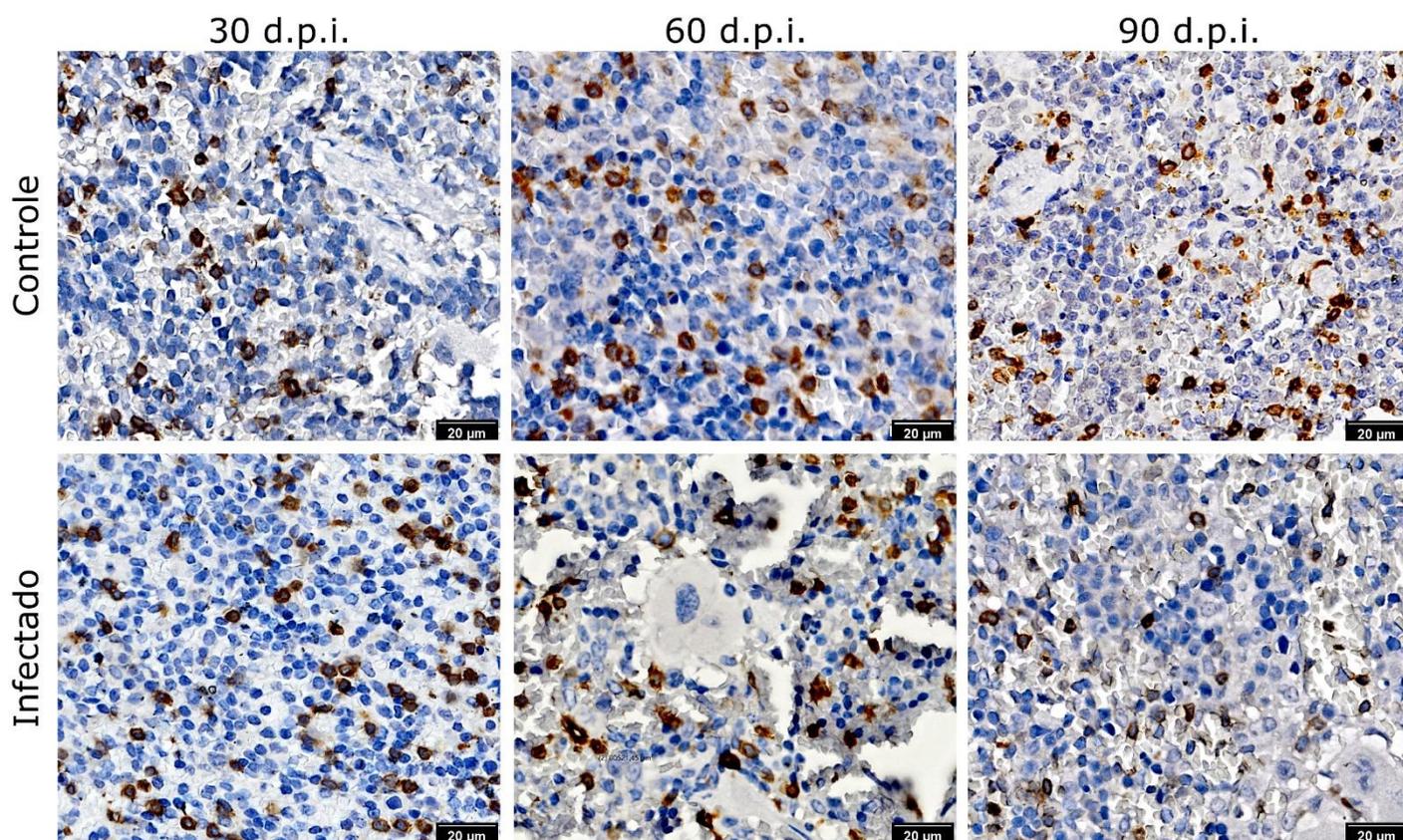


Figura 6. Distribuição dos LT na PV. Micrografias representativas das secções da PV marcadas com CD3 nos tecidos esplênicos de animais controles e infectados em 30, 60 e 90 dpi. Aumento 400x; Barra= 20 µm.

A proporção de LT na PB dos animais infectados foi menor que na dos animais do grupo controle 60 dpi (Fig. 7a; $p = 0,02$, teste t). Houve redução da densidade de LT entre 30 e 90 dpi nos animais infectados (Fig. 7b; $p = 0,03$ ANOVA e pós teste Tukey). As marcações para CD3 na PB estão representadas na figura 8.

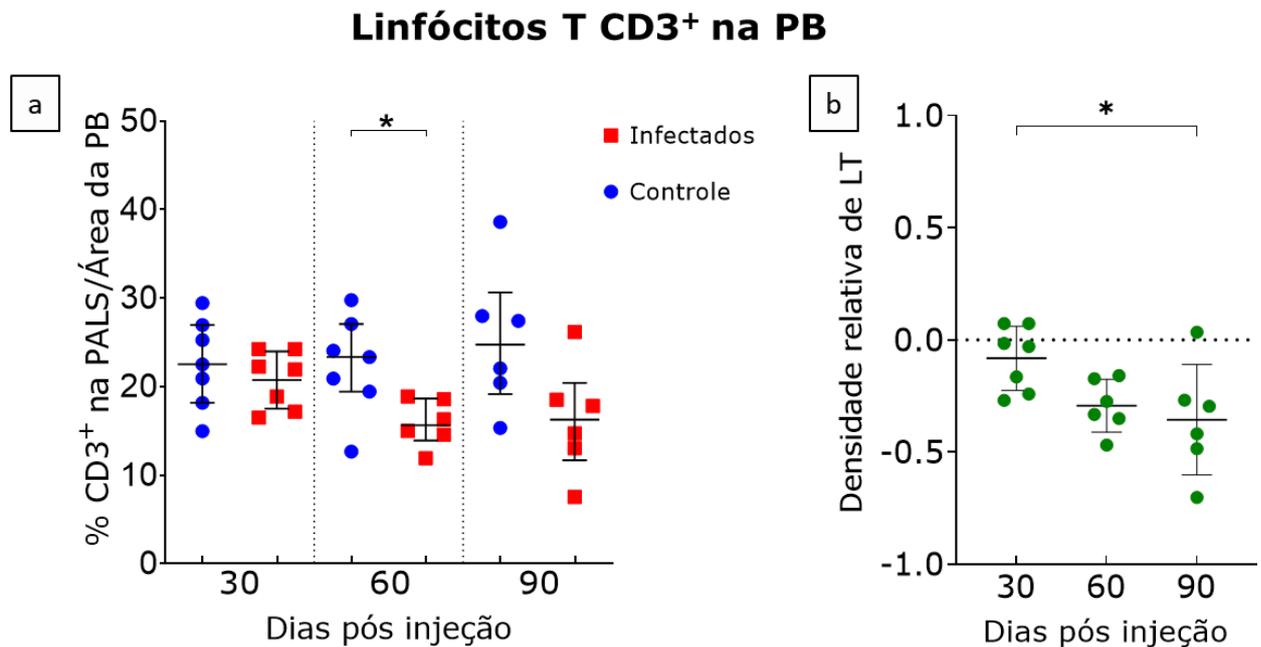


Figura 7. Densidade de LT na PB. a: Número de células CD3⁺ na PB dos grupos controles e infectados, nos diferentes pontos de avaliação; b: comparação da densidade relativa de LT na cinética de avaliação. *= $p \leq 0,05$. Representação em medianas e intervalos interquartis [p25-p75].

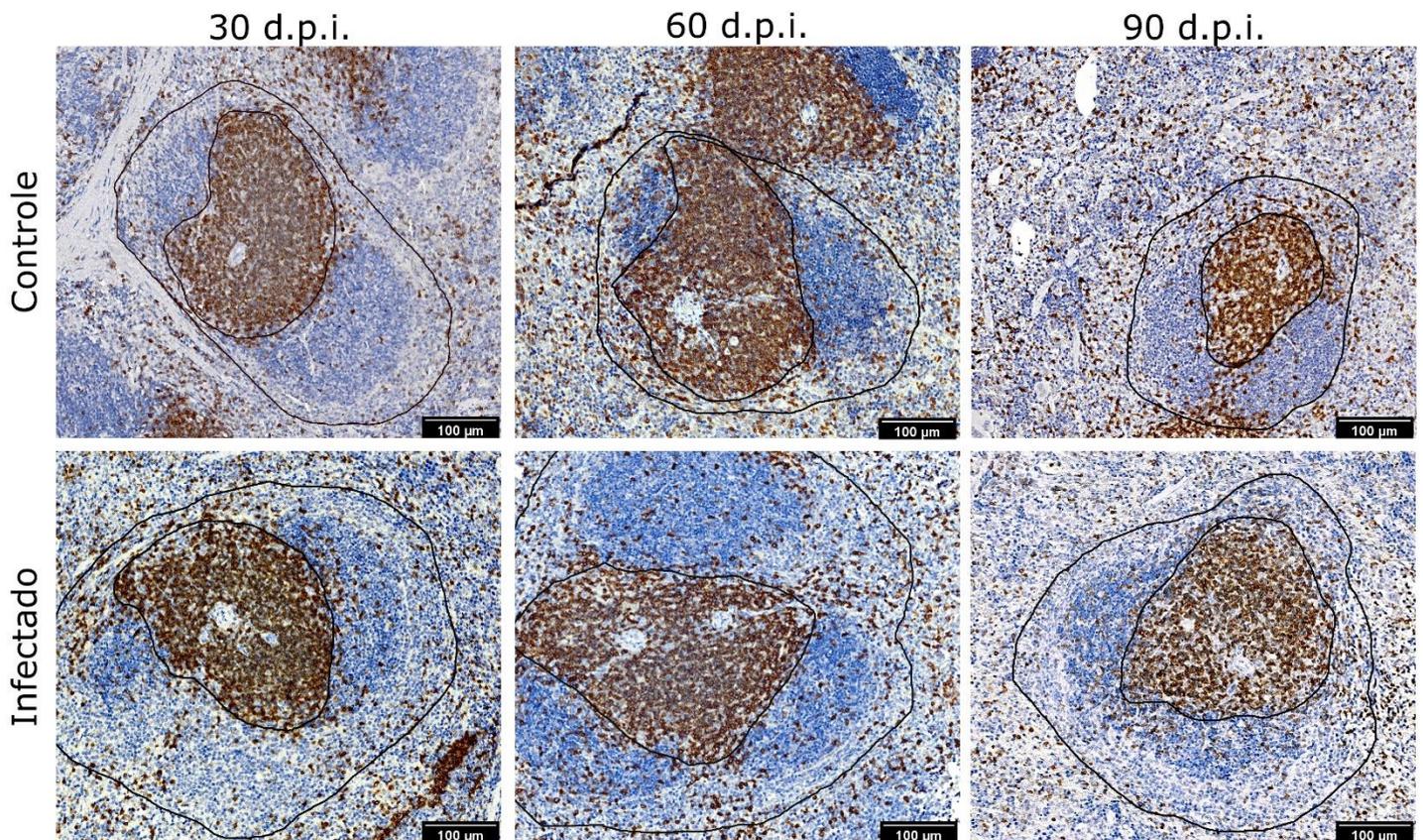


Figura 8. Distribuição dos LT na PB. Micrografias representativas das secções da PB marcadas com CD3 nos tecidos esplênicos de animais controles e infectados, em 30, 60 e 90 dpi. A área mais interna delimitada representa a PALS, e a externa a PB total. Aumento 100x; Barra=100 μm.

5.4.2 Linfócitos B CD20⁺

No 30^o dpi, animais infectados apresentam maior proporção de LB na PV do que os animais controle (Fig. 9a; $p=0,03$ teste Mann-Whitney). Enquanto 60 dpi e 90 dpi, a proporção de LB foi menor nos animais infectados (Fig. 9a; 60 dpi: $p=0,004$, teste Mann-Whitney; 90 dpi: $p<0,0001$, teste t). Ao avaliar a cinética da infecção, observa-se que houve menor proporção de LB em 90 dpi comparado ao 30^o dpi (Fig. 9b; $p=0,0003$, Kruskal-Wallis e pós teste Dunn).

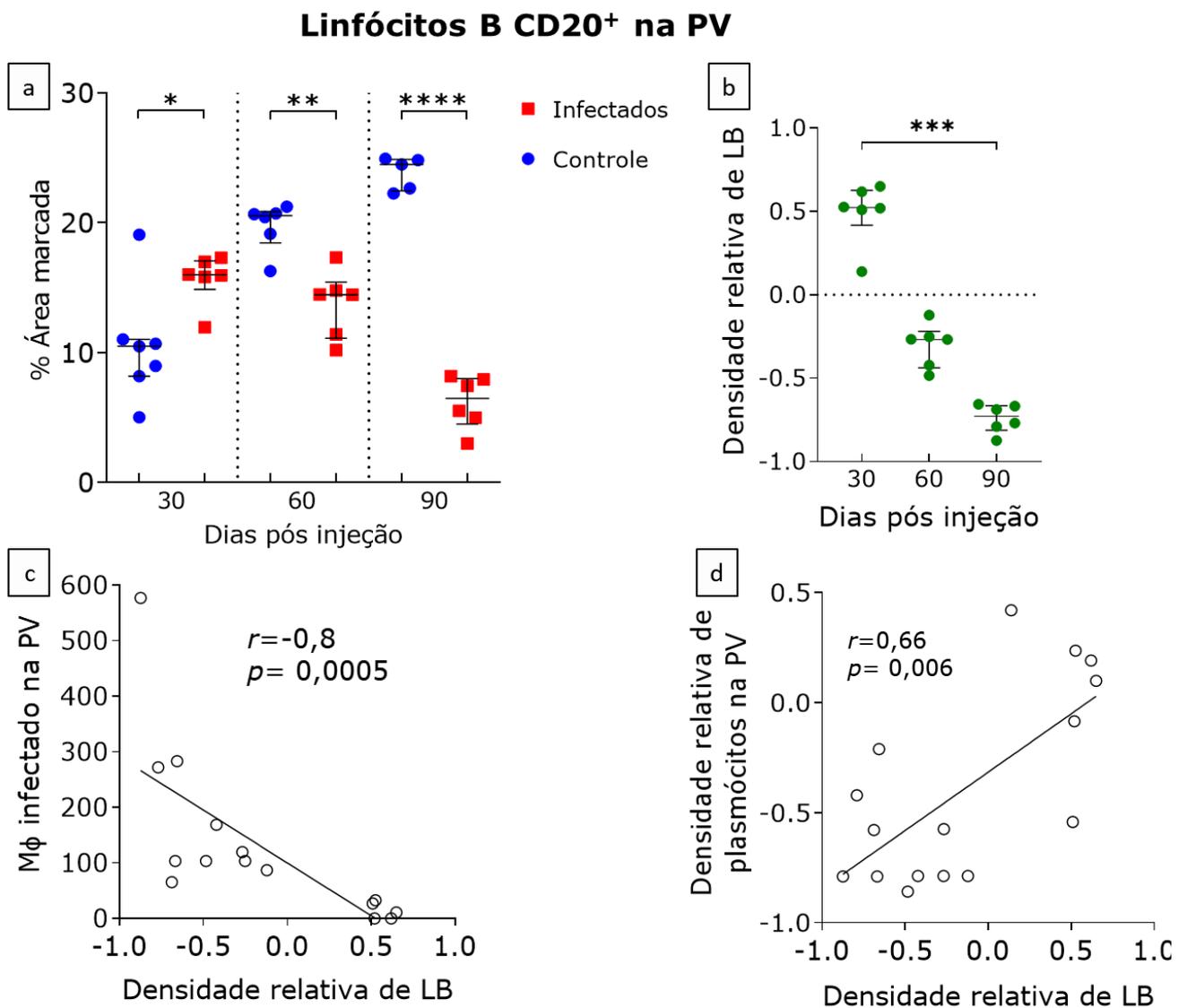


Figura 9. Densidade de LB na PV. a: Número de células CD20⁺ na PV dos grupos controles e infectados, nos diferentes pontos de avaliação; b: comparação da densidade relativa de LB na cinética de avaliação. c: correlação entre a densidade relativa de LB da PV com número de macrófagos infectados na PV; d: correlação entre densidade relativa de LB da PV com densidade relativa de plasmócitos da PV. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$; ****= $p \leq 0,0001$. Representação em medianas e intervalos interquartis [p25-p75].

Há uma relação inversa entre a densidade relativa de LB e número de MΦ infectados (Fig. 9c; IC -0,9356 a -0,4902, teste Spearman r) na PV. Entretanto observamos correlação positiva entre densidade relativa de LB e densidade de plasmócitos na PV (Fig. 9d; IC 0,2286 a 0,8745, teste Spearman r). Na figura 10 estão representadas as marcações para CD20 na PV.

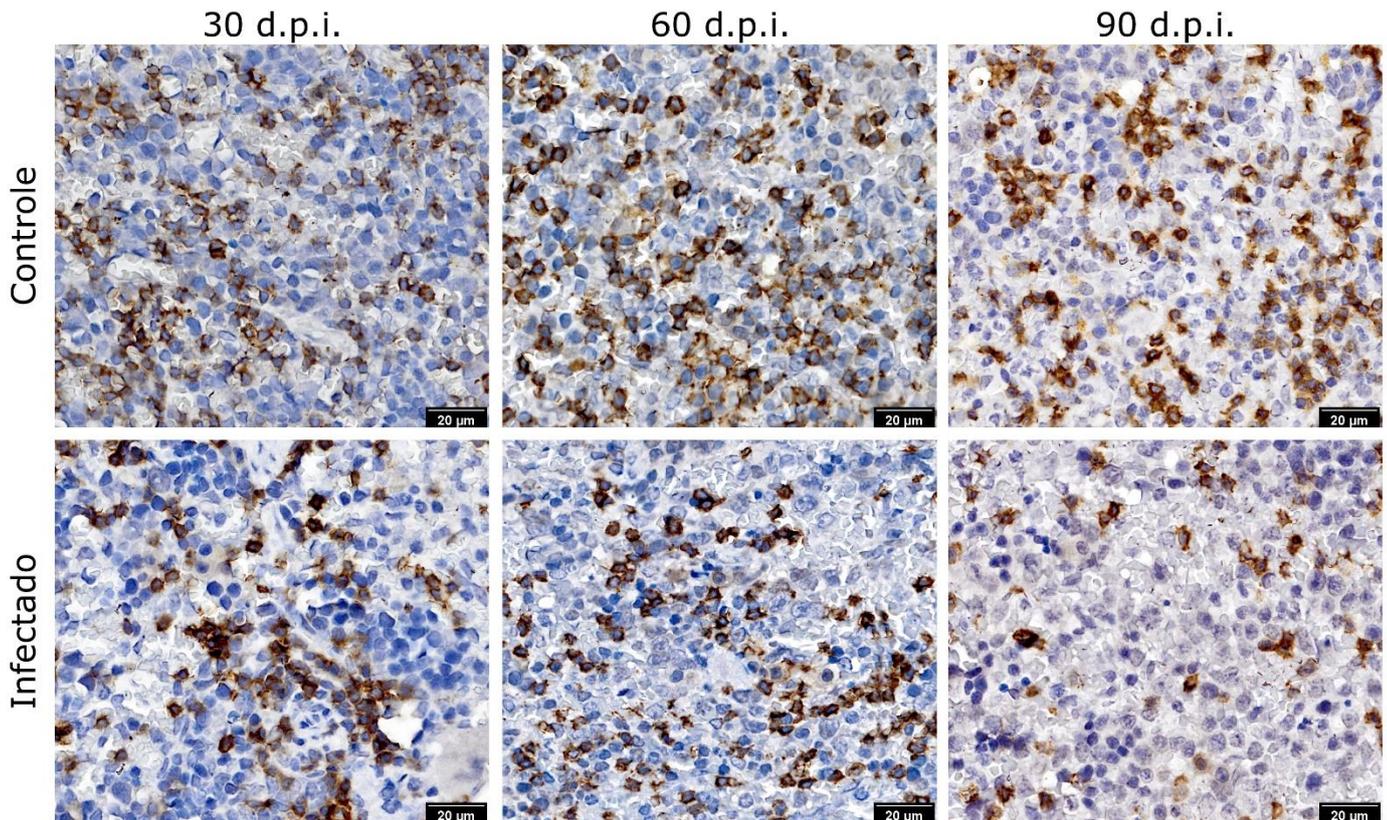


Figura 10. Distribuição dos LB na PV. Micrografias representativas das secções da PV marcadas com CD20 nos tecidos esplênicos de animais controles e infectados em 30, 60 e 90 dpi. Aumento 400x; barra= 20 μ m.

Não houve diferença na densidade de LB da PB entre os grupos (Fig. 11a), assim como na análise da densidade relativa (Fig. 11b). Imagens representativas das marcações para CD20 da PB na figura 12.

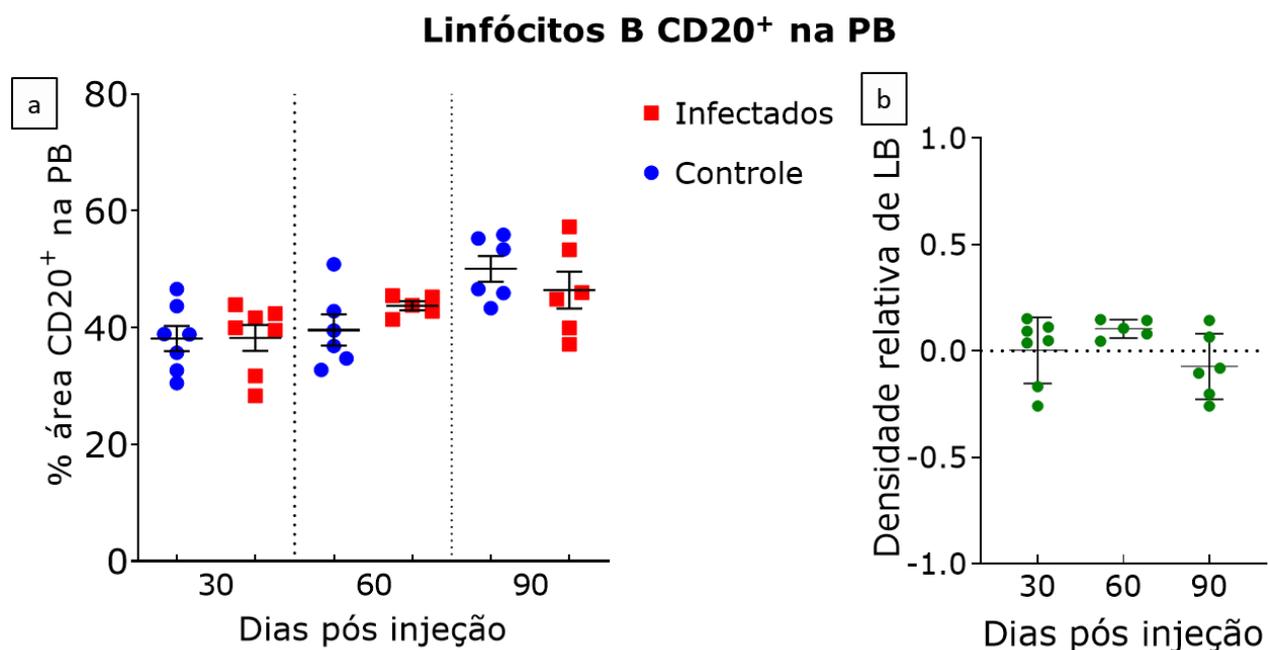


Figura 11. Densidade de LB na PB. a: Número de células CD20⁺ na PB dos grupos controles e infectados, nos diferentes pontos de avaliação; b: comparação da densidade relativa de LB na cinética de avaliação. Representação em medianas e intervalos interquartis [p25-p75].

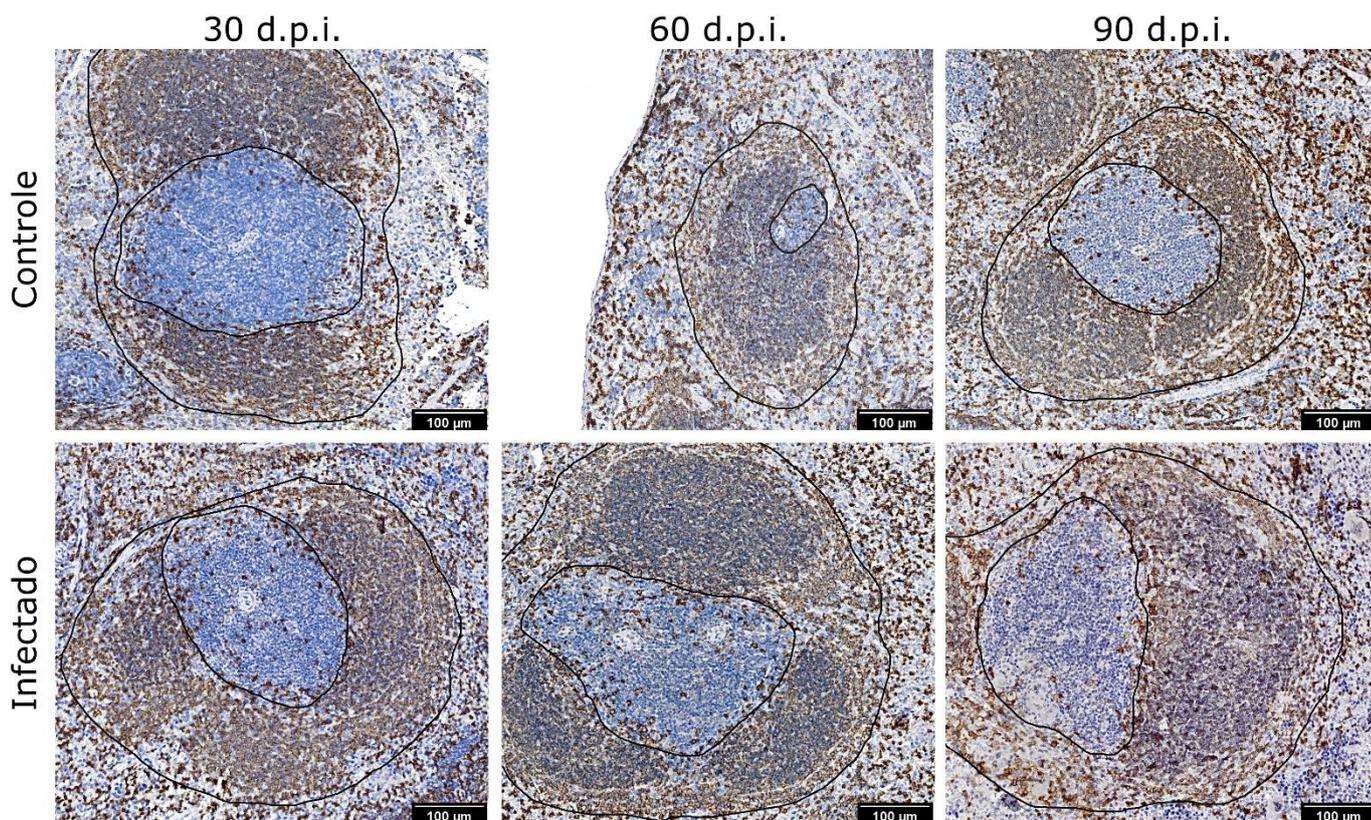


Figura 12. Distribuição dos LB na PB. Micrografias representativas das seções da PB marcadas com CD20 nos tecidos esplênicos de animais controles e infectados em 30, 60 e 90 dpi. A área mais interna circundada representa a PALS, e a externa PB total. Aumento 100x; barra= 100 μm. externa a PB total. Aumento 200x; barra= 100 μm.

5.4.3 Plasmócitos CD138⁺

Houve tendência ao aumento do número de plasmócitos 30 dpi na PV em camundongos infectados, que diminui 60 dpi ($p=0,02$, teste Mann-Whitney) e 90 dpi ($p=0,01$, teste t) comparados ao grupo controle (Fig. 13a). Houve redução do número de plasmócitos entre 30 e 60 dpi ($p=0,009$, Kruskal-Wallis e pós teste Dunn) que persiste até 90 dpi ($p=0,04$, Kruskal-Wallis e pós teste Dunn) (Fig. 13b). Imagens representativas das marcações para CD138 da PV na figura 14.

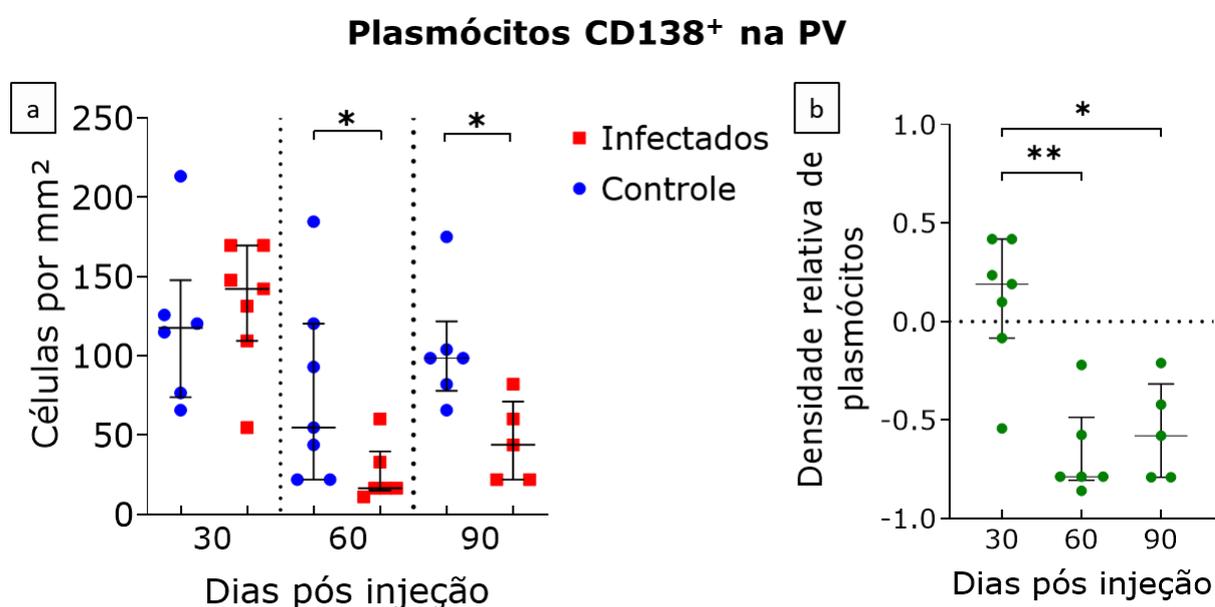


Figura 13. Densidade de plasmócitos na PV. a: Número de células CD138⁺ na PV dos grupos controles e infectados, nos diferentes pontos de avaliação; b: comparação da densidade relativa de plasmócitos na cinética de avaliação. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$. Representação em medianas e intervalos interquartis [p25-p75].

Durante a análise foram observadas regiões perivasculares com agregados de células positivas para CD138. Possivelmente essas regiões são ramificações da arteríola central, que diminuem o diâmetro e deixam de ser cercada pela bainha linfóide, se estendendo além da PB e terminando na PV (CESTA, 2006; SATODATE *et al.*, 1986). Devido a importância como possível sítio de acúmulo e trânsito dos plasmócitos, essas regiões foram consideradas nas contagens. Os 5 maiores aglomerados adjacentes a vasos foram selecionados e contagens manuais foram procedidas.

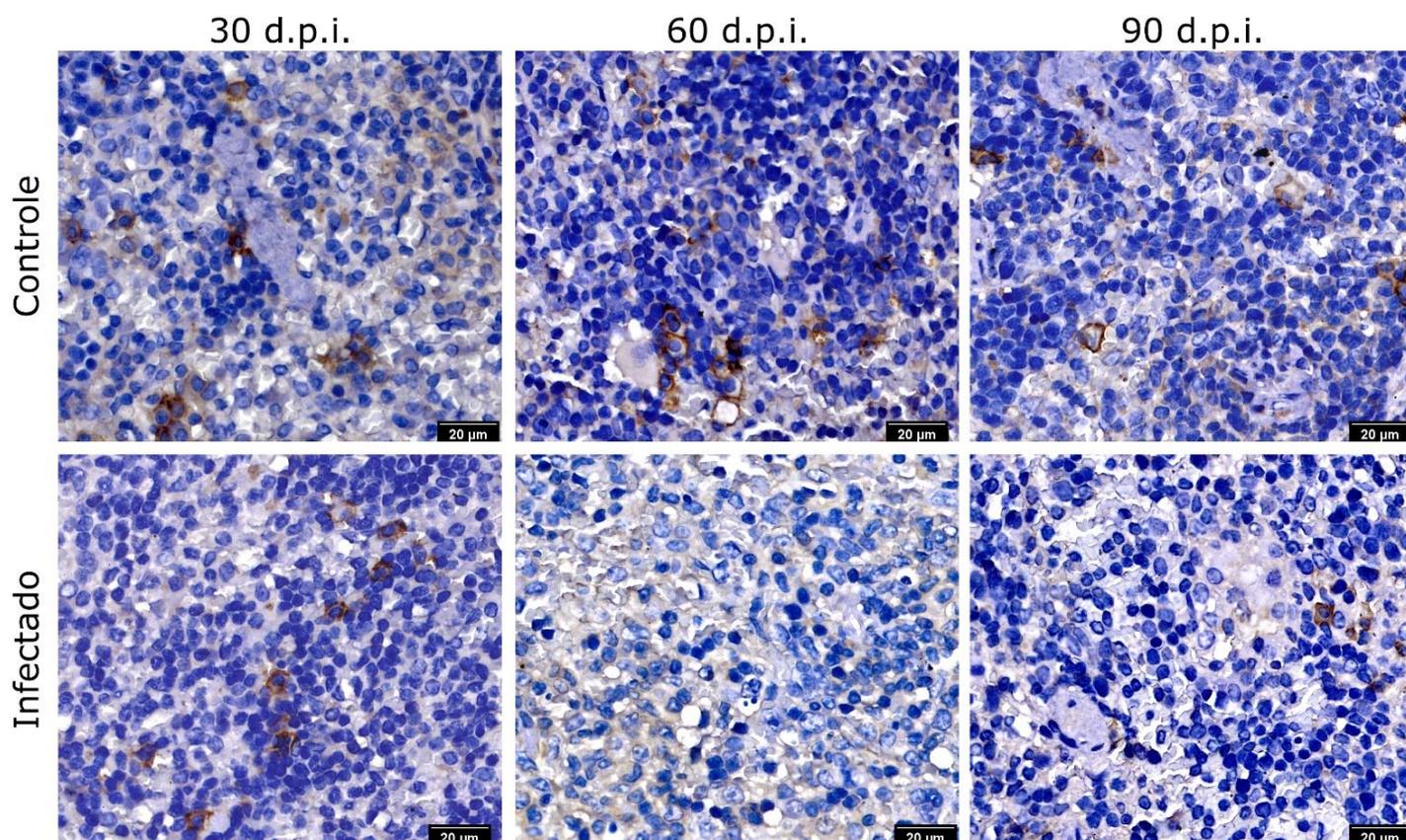


Figura 14. Distribuição dos plasmócitos na PV. Micrografias representativas das secções da PV marcadas com CD138 nos tecidos esplênicos de animais controles e infectados em 30, 60 e 90 dpi. Aumento 400x; barra= 20 µm. dpi.

Similar a PV, nas regiões perivasculares há redução de plasmócitos nos animais infectados em 60 ($p=0,009$, teste t) e 90 dpi ($p=0,04$, teste t) em comparação ao grupo controle (Fig. 15a). No curso da infecção há redução do número de plasmócitos 60 dpi comparados ao 30º dpi (Fig. 15b; $p=0,04$, ANOVA e pós teste Tukey). As marcações para CD138 foram representadas na figura 16.

Plasmócitos CD138⁺ perivascularares

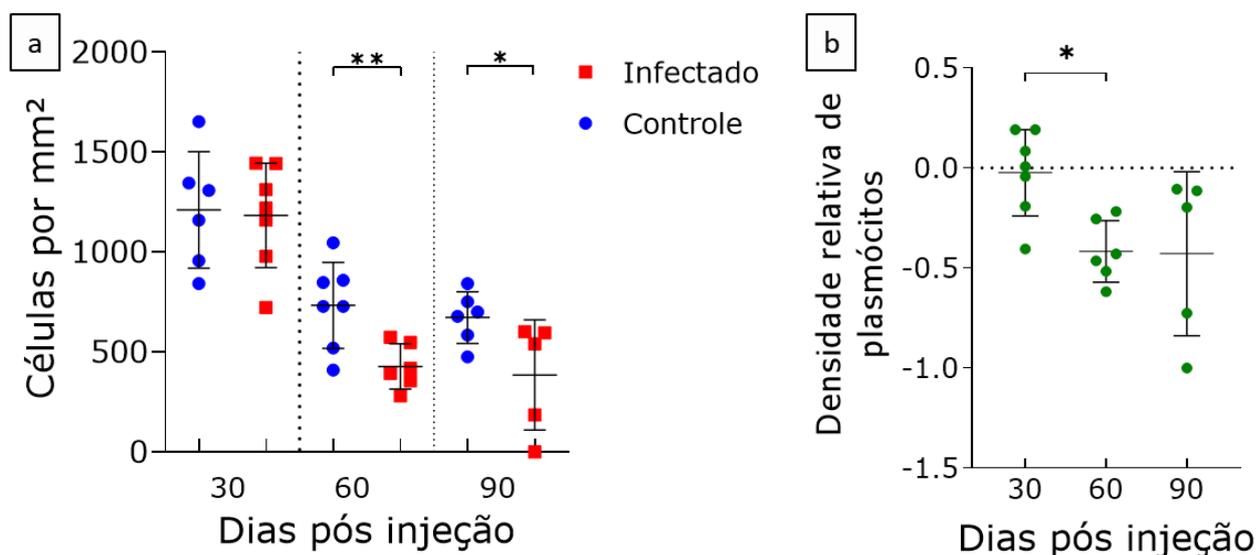


Figura 15. Densidade de plasmócitos perivascularares em agrupados na PV. a: Número de células CD138⁺ em agrupados na PV dos grupos controles e infectados, nos diferentes pontos de avaliação; b: comparação da densidade relativa de plasmócitos na cinética de avaliação. *= $p \leq 0,05$. Representação em medianas e intervalos interquartis [p25-p75].

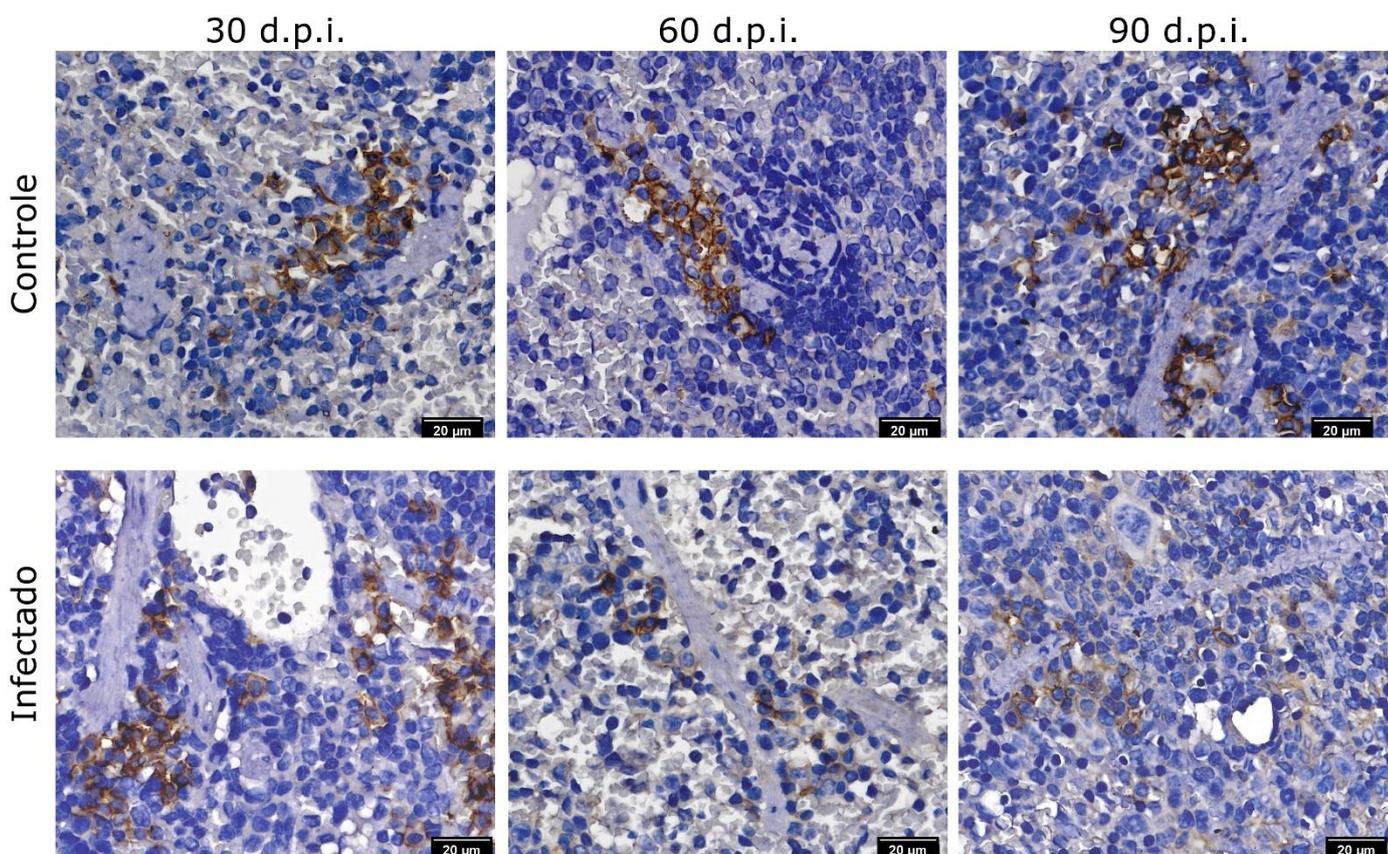


Figura 16. Distribuição dos plasmócitos em agrupados perivascularares na PV. Micrografias representativas das secções de agrupados perivascularares marcadas com CD138 nos tecidos esplênicos de animais controles e infectados em 30, 60 e 90 dpi. Aumento 400x; barra= 20 µm.

5.5 ANÁLISE INTEGRADA DOS DADOS DE FENOTIPAGEM

O mapa de calor possibilita a visualização integrada dos dados. Esses dados foram classificados por similaridade e analisados de forma não supervisionada. Nessa análise, houve formação de dois clusters, estando os animais do ponto de 60 e 90 dpi agrupados por apresentarem maior similaridade. Esse efeito pode ser explicado devido a maior densidade de linfócitos no baço dos animais infectados no primeiro ponto de avaliação. É possível observar que a evolução da LV em camundongos está associada a diminuição da densidade de linfócitos e plasmócitos na PV (Fig. 17). Esse efeito também é observado em CD3 na PB.

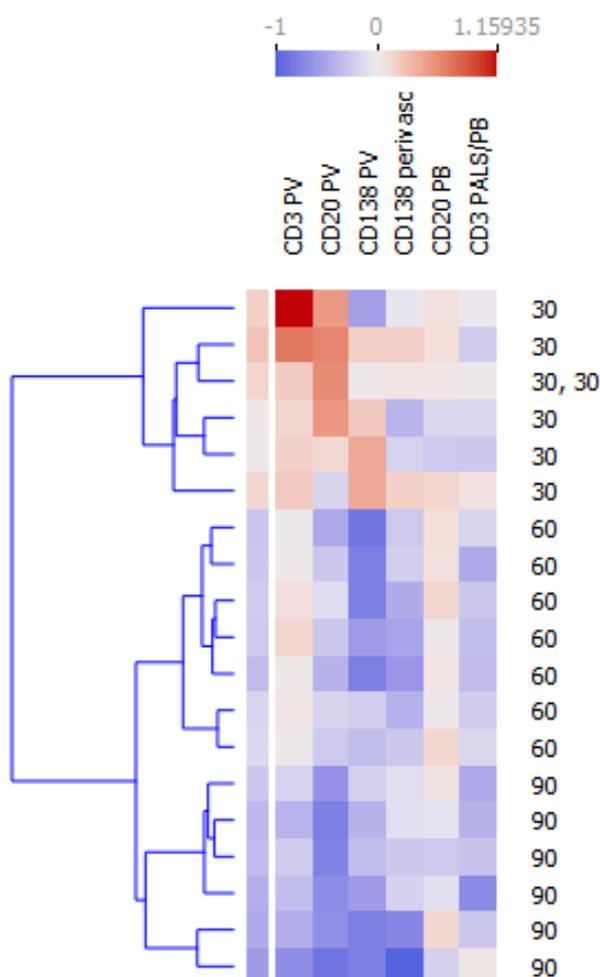


Figura 17. Mapa de calor da densidade de células. Dados de fenotipagem agrupados por similaridade de forma não supervisionada nos diferentes pontos de avaliação.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, examinamos sequencialmente as alterações esplênicas na LV murina. Para isso, identificamos LT, LB, plasmócitos e MΦ parasitados através do estudo imuno-histoquímico, avaliando a densidade e distribuição destas células nos diferentes compartimentos.

Na avaliação histológica os animais infectados apresentaram hiperplasia da PB 30 dpi, com atrofia 60 dpi, que normaliza 90 dpi. Veress e colaboradores (1983) observaram a sequência de hiperplasia seguido de atrofia da PB em hamster infectados experimentalmente, entretanto os animais evoluíam com desorganização dos compartimentos esplênicos. Este fenômeno é associado a formas graves da LV (DA SILVA *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2014; SANTANA *et al.*, 2008). Alguns estudos denotam a desorganização em modelo murino de infecção (ASHWIN *et al.*, 2019; CARRIÓN *et al.*, 2006; ENGWERDA *et al.*, 2002; KAYE *et al.*, 2004; SMELT *et al.*, 1997; YURDAKUL *et al.*, 2011). De fato, alterações celulares importantes ocorrem durante a LV de camundongos, mas são revertidas em pontos tardios da infecção (MELO *et al.*, 2020). As análises por IHQ neste trabalho mostram ausência da desorganização. Os animais tampouco desenvolveram LV grave, evidenciado pela ausência de sinais clínicos, exceto pela esplenomegalia. É possível que a manutenção da organização esplênica, apesar das alterações celulares que ocorre, esteja associada ao perfil brando da doença que observamos nos camundongos.

Mesmo na ausência de desorganização, houve aumento nas sub-regiões de folículo, CG e ZM 90 dpi, acompanhado de maior frequência de granulomas na PV. Na LV de camundongos, essas alterações na microarquitetura esplênica são relatadas, com perturbação nas sub-regiões da PB e remodelamento das populações de células estromais, importantes na manutenção da organização esplênica (ATO *et al.*, 2002; ENGWERDA *et al.*, 2002; MELO *et al.*, 2020; YURDAKUL *et al.*, 2011). O aumento das regiões surge simultâneo ao aumento do número de MΦ parasitados na PB, a apresentação antigênica e secreção de citocinas por células infectadas

podem levar a reatividade da PB, ocorrendo hiperplasia das células no local e formação de CG (CORBETT *et al.*, 1992; KEENAN *et al.*, 1984).

Observamos aumento do número de LT na PV 30 dpi. A proliferação de LT CD4⁺ específicos para antígenos de *Leishmania* ocorre desde a primeira semana pós infecção, com valores ainda aumentados ~28 dpi (BUNN *et al.*, 2014; MEDINA-COLORADO *et al.*, 2017). A hiperplasia dos LT ocorre em resposta aos estímulos antigênicos da *Leishmania* (JAWED; DUTTA; MAJUMDAR, 2019). Houve menor número de LT na PV 60 e 90 dpi, concomitante ao aumento de MΦ parasitados no baço. Sabemos que os LT são importantes na eliminação do parasita, porém suas funções dependem dos estímulos presentes no microambiente. A redução do número de LT na LV pode estar relacionada ao surgimento de LT regulatórios e ambiente supressor (BUNN *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2009). É descrito que na infecção por *L. infantum* os LT regulatórios estão presentes e são induzidas a secretar TGF-β, que restringe a proliferação e atividade efetora de linfócitos (HOFFMANN *et al.*, 2009; TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007).

Adicionalmente, o crescente parasitismo e a persistência do estímulo antigênico leva ao fenômeno de exaustão de LT, culminando com a apoptose dessas células (RODRIGUES *et al.*, 2016). Apesar de não ter sido avaliado em nosso estudo, sabe-se que tanto na LV experimental, quanto em infecções naturais de cães e seres humanos, há aumento da expressão de marcadores de exaustão por LT e de citocinas anti-inflamatórias, sendo um potencial mecanismo de manutenção da infecção crônica (AGALLOU *et al.*, 2019; DE SOUZA *et al.*, 2019; GAUTAM *et al.*, 2014; LOPEZ LOPEZ; PÉREZ-ANTÓN; THOMAS, 2019).

Com relação aos LB, observamos que há aumento na densidade 30 dpi na PV, com diminuição progressiva nos pontos subsequentes. Têm sido demonstrado que patógenos podem interagir e manipular as funções dessas células (NOTHELFER; SANSONETTI; PHALIPON, 2015), induzindo ativação policlonal e proliferação extrafolicular, inclusive em regiões de PV (AMEZCUA VESELY *et al.*, 2012; BERMEJO *et al.*, 2011). Após hiperativação e proliferação, os LB podem se diferenciar terminalmente em plasmócitos,

LB de memória ou assumir papel regulatório, com secreção de citocinas imunomoduladoras como IL-10 e TGF- β . Essas citocinas estão relacionadas à modulação de resposta de LT efetores e persistência da infecção. Além disso, o estímulo antigênico constante pode induzir a morte de LB, o que poderia explicar a redução na densidade dessas células observada em nosso estudo 60 e 90 dpi (DAYAKAR *et al.*, 2019; NOTHELFER; SANSONETTI; PHALIPON, 2015; SILVA-BARRIOS; CHARPENTIER; STÄGER, 2018).

Estudos mostram que na ausência de LB, há diminuição do parasitismo nos órgãos e aumento da resistência a infecção, enquanto a transferência passiva dos LB de camundongos cronicamente infectados restauram a susceptibilidade, reforçando a resposta disfuncional dos LB na LV e associação à patogênese (DEAK *et al.*, 2010; KUMAR; NYLÉN, 2012; RONET *et al.*, 2008; SMELT *et al.*, 2000). Em nosso estudo, vimos que a diminuição na densidade de LB está associada ao aumento de M Φ parasitados na PV. Apesar de diminuída, a disfunção dos LB ainda pode impactar na resposta imune do baço. Singh e colaboradores (2019) destacaram que mesmo com frequência diminuída em pacientes com LV, há aumento na expressão do fenótipo de exaustão por LB, que estimulava a produção de citocinas anti-inflamatórias e comprometia o processamento e a apresentação antigênica na doença.

A densidade de plasmócitos no baço tendem a aumentar 30 dpi, ponto em que LB estão aumentados, com redução nos pontos subsequentes, apresentando correlação positiva com os níveis de LB. Sabe-se que a plasmocitose na PV é um achado comum na LV, e está associada a distúrbios na manutenção de LB nos compartimentos da PB e ativação policlonal (SANTANA *et al.*, 2008; SILVA-O'HARE *et al.*, 2016; VERESS *et al.*, 1977). Durante a LV há redução de citocinas como CXCL13 na PB, fazendo com que os LB deixem os folículos e se acumulem na PV (SILVA *et al.*, 2012), podendo gerar plasmócitos (SILVA-BARRIOS; CHARPENTIER; STÄGER, 2018). Devido a correlação positiva encontrada, podemos supor que a diminuição de LB, que são precursoras de plasmócitos, está levando a diminuição na densidade dos plasmócitos. Não observamos diferença na

proporção de LB na PB. Talvez a PV destes animais não apresente alterações que favorecem a retenção e sobrevivência de plasmócitos. É possível que a plasmocitose observada em casos graves da LV seja dependente da desorganização esplênica e diferenciação anômala de LB dos folículos primariamente, não observada nos camundongos.

Mesmo com a diminuição das populações celulares, os animais apresentaram esplenomegalia e hiperplasia da PV. É relatado que a proliferação do parasito no baço induz à mielopoiese no órgão, o que leva ao aumento de granulócitos e monócitos com fenótipo de célula supressora reguladora, mais permissivos a infecção e replicação do parasito (ABIDIN *et al.*, 2017; COTTERELL; ENGWERDA; KAYE, 2000; OSORIO *et al.*, 2020). A eritropoiese extramedular também está associada a esplenomegalia na LV (PREHAM *et al.*, 2018). Apesar da hematopoiese extramedular ocorrer naturalmente no baço de camundongo idosos, situações inflamatórias podem acelerar e exacerbar o processo (LOUKOV *et al.*, 2016). O aumento das células precursoras e sua progênie durante a infecção por *Leishmania* denota um possível mecanismo para a esplenomegalia e hiper celularidade, como observada na mielofibrose, infecção por citomegalovírus e em camundongos envelhecidos (JORDAN *et al.*, 2013; LOUKOV *et al.*, 2016; SONG; PARK; UHM, 2018). É importante denotar que a hematopoiese extramedular pode aumentar a dispersão dos esplenócitos, o que poderia estar levando a diminuição na densidade de células por área observada nesse trabalho.

Diferente dos estudos que utilizam citometria como ferramenta para caracterização e quantificação de células, utilizamos a marcação por IHQ por possibilitar a visualização da célula no tecido e as estruturas adjacentes, facilitando a análise em diferentes compartimentos, tido como um dos objetivos desse trabalho (DE MATOS *et al.*, 2010; KALIYAPPAN *et al.*, 2012). Ao marcar células CD3⁺ foi possível visualizar e delinear a PALS, enquanto a marcação de CD20 destaca regiões de folículos e ZM, facilitando a delimitação da PB. As regiões do baço de camundongos possuem delimitações menos evidentes na coloração HE, portanto, a aplicação da

IHQ minimiza estes problemas observacionais. Adicionalmente, a marcação de CD138 revela plasmócitos, células menos frequentes em camundongos, que em cães e seres humanos. A utilização destes marcadores auxilia na caracterização das regiões do baço e podem ser aplicadas futuramente em outras condições. Este painel básico de colorações imuno-histoquímicas para CD20 e CD3 permite bom estudo inicial da PB esplênica, e pode ser considerado para observações em variadas situações. Uma das vantagens da utilização de IHQ é a possibilidade de visualizar estruturas marcadas sem perda substancial do contexto morfológico.

O estudo imuno-histoquímico possibilitou a definição das sub-regiões esplênicas, denotando a ausência da desorganização esplênica em camundongos infectados com *L. infantum*. As alterações histológicas apresentadas são brandas, mesmo com a alta concentração do inóculo, consistentes com modelo subclínico da doença. Entretanto, os animais infectados apresentaram esplenomegalia e diminuição importante na densidade de linfócitos e plasmócitos, que estavam associados a persistência do parasito.

7 CONCLUSÕES

- 1- Não houve desestruturação da polpa branca em camundongos infectados com *Leishmania infantum*;
- 2- Animais infectados possuem diminuição de linfócitos T, linfócitos B e plasmócitos na PV em pontos tardios da infecção;
- 3- A diminuição de linfócitos na polpa vermelha está relacionada ao aumento de macrófagos parasitados no baço.
- 4- As proporções de linfócitos B na PB são mantidas em todo curso da infecção;
- 5- Macrófagos parasitados aumentam progressivamente na cinética de infecção em todas as regiões do baço.

8 REFERÊNCIAS

ABIDIN, B. M. *et al.* Infection-adapted emergency hematopoiesis promotes visceral leishmaniasis. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 8, 1 ago. 2017.

AGALLOU, M. *et al.* Infection-adapted emergency hematopoiesis promotes visceral leishmaniasis. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 8, 1 ago. 2017.

AGALLOU, M. *et al.* Infection-adapted emergency hematopoiesis promotes visceral leishmaniasis. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 8, 1 ago. 2017.

AGALLOU, M. *et al.* Infection-adapted emergency hematopoiesis promotes visceral leishmaniasis. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 8, 1 ago. 2017.

AGALLOU, M. *et al.* Transcriptome Analysis Identifies Immune Markers Related to Visceral Leishmaniasis Establishment in the Experimental Model of BALB/c Mice. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2749, 26 nov. 2019.

AMEZCUA VESELY, M. C. *et al.* B-cell response during protozoan parasite infections. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012.

ASHWIN, H. *et al.* Tissue and host species-specific transcriptional changes in models of experimental visceral leishmaniasis [version 2; referees: 4 approved]. **Wellcome Open Research**, v. 3, 2019.

ATO, M. *et al.* Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. **Nature Immunology**, v. 3, n. 12, p. 1185–1191, 1 dez. 2002.

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, 1 jul. 2013.

AWASTHI, A.; MATHUR, R.; SAHA, B. Immune response to Leishmania infection. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 119, n. 6, p. 238–258, 1 jun. 2004.

BADARO, R. *et al.* New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 6, p. 1003–1011, 1986.

BARÇANTE, T. A. *et al.* Infection-adapted emergency hematopoiesis promotes visceral leishmaniasis. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 8, 1 ago. 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2017.

AGALLOU, M. *et al.* Transcriptome Analysis Identifies Immune Markers Related to Visceral Leishmaniasis Establishment in the Experimental Model of BALB/c Mice. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2749, 26 nov. 2019.

AMEZCUA VESELY, M. C. *et al.* B-cell response during protozoan parasite infections. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012.

ASHWIN, H. *et al.* Tissue and host species-specific transcriptional changes in models of experimental visceral leishmaniasis [version 2; referees: 4 approved]. **Wellcome Open Research**, v. 3, 2019.

ATO, M. *et al.* Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. **Nature Immunology**, v. 3, n. 12, p. 1185–1191, 1 dez. 2002.

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, 1 jul. 2013.

AWASTHI, A.; MATHUR, R.; SAHA, B. Immune response to Leishmania infection. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 119, n. 6, p. 238–258, 1 jun. 2004.

BADARO, R. *et al.* New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 6, p. 1003–1011, 1986.

BARÇANTE, T. A. *et al.* First report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz, Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in southern Minas Gerais State, Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v. 40, n. 2, p. 412–414, 1 dez. 2015.

BARROUIN-MELO, S. M. *et al.* Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 195–197, 2004.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 1 ago. 2007.

BELO, V. S. *et al.* Risk Factors for Adverse Prognosis and Death in American Visceral Leishmaniasis: A Meta-analysis. **PLOS Neglected**

Tropical Diseases, v. 8, n. 7, p. e2982, 2014.

BERMEJO, D. A. *et al.* Trypanosoma cruzi infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a high source of non-parasite-specific antibodies. **Immunology**, v. 132, n. 1, p. 123–133, 1 jan. 2011.

BLUE, J.; WEISS, L. Vascular pathways in nonsinusal red pulp—an electron microscope study of the cat spleen. **American Journal of Anatomy**, v. 161, n. 2, p. 135–168, jun. 1981.

BRONTE, V.; PITTET, M. J. The Spleen in Local and Systemic Regulation of Immunity. **Immunity**, v. 39, n. 5, p. 806–818, 14 nov. 2013.

BROUSSE, V.; BUFFET, P.; REES, D. The spleen and sickle cell disease: the sick(led) spleen. **British Journal of Haematology**, v. 166, n. 2, p. 165–176, 1 jul. 2014.

BUNN, P. T. *et al.* Tissue Requirements for Establishing Long-Term CD4 + T Cell-Mediated Immunity following Leishmania donovani Infection . **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 8, p. 3709–3718, 15 abr. 2014.

BURKE, J. S.; OSBORNE, B. M. Localized reactive lymphoid hyperplasia of the spleen simulating malignant lymphoma. A report of seven cases. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 7, n. 4, p. 373–380, 1983.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 15 set. 2018.

CARRION, J. *et al.* Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 5, p. 173–183, 1 maio 2006.

CARRIÓN, J. *et al.* Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 5, p. 173–183, 1 maio 2006.

CERUTTI, A.; COLS, M.; PUGA, I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 2, p. 118–132, 25 jan. 2013.

CESTA, M. F. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. **Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 5, p. 455–465, 25 ago. 2006.

CHANDRA, H.; CHANDRA, S.; KAUSHIK, R. M. Visceral leishmaniasis with associated common, uncommon, and atypical morphological features on

bone marrow aspirate cytology in nonendemic region. **Journal of Tropical Medicine**, 2013.

CHEN, X. Q. *et al.* Profiling of the perturbed metabolomic state of mouse spleen during acute and chronic toxoplasmosis. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 18 jul. 2017.

CHEYNIER, R. *et al.* HIV and T cell expansion in splenic white pulps is accompanied by infiltration of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. **Cell**, v. 78, n. 3, p. 373–387, 12 ago. 1994.

COFFEY, W.; BALASUBRAMANYA, R. **Spleen Imaging**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2021.

CORBETT, C. E. *et al.* Histopathology of lymphoid organs in experimental leishmaniasis. **International journal of experimental pathology**, v. 73, n. 4, p. 417–33, ago. 1992.

COSENZA-CONTRERAS, M. *et al.* The schistosomiasis SpleenOME: Unveiling the proteomic landscape of splenomegaly using label-free mass spectrometry. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JAN, p. 3137, 22 jan. 2019.

COTTERELL, S. E. J.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Enhanced hematopoietic activity accompanies parasite expansion in the spleen and bone marrow of mice infected with *Leishmania donovani*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 1840–1848, abr. 2000.

CROFT, S. L.; YARDLEY, V. Animal Models of Visceral Leishmaniasis. In: **Handbook of Animal Models of Infection**. [s.l.] Elsevier, 1999. p. 783–787.

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, 20 abr. 2018.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3–4, p. 139–146, 10 nov. 2007.

DAYAKAR, A. *et al.* Cytokines: Key Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis: Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. APR, p. 670, 5 abr. 2019.

DE ARAÚJO, V. E. M. *et al.* Early clinical manifestations associated with death from visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, fev. 2012.

DE FREITAS, E. O. *et al.* The Contribution of Immune Evasive Mechanisms to Parasite Persistence in Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. APR, p. 153, 22 abr. 2016.

DE MATOS, L. L. *et al.* Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice. **Biomarker Insights**, v. 2010, n. 5, p. 9–20, 9 fev. 2010.

DE SOUZA, T. L. *et al.* Pro-Cellular Exhaustion Markers are Associated with Splenic Microarchitecture Disorganization and Parasite Load in Dogs with Visceral Leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 1 dez. 2019.

DEAK, E. *et al.* Murine visceral leishmaniasis: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 5, p. 1355–1368, 1 maio 2010.

DEN HAAN, J. M. M.; KRAAL, G. Innate Immune Functions of Macrophage Subpopulations in the Spleen. **Journal of Innate Immunity**, v. 4, n. 5–6, p. 437–445, ago. 2012.

DHINGRA *et al.* Morphological findings in bone marrow biopsy and aspirate smears of visceral kala azar: A review. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 96, 1 jan. 2010.

DI SABATINO, A. *et al.* Is it worth investigating splenic function in patients with celiac disease? **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 15, p. 2313–2318, 21 abr. 2013.

DJOKIC, V.; AKOOLLO, L.; PARVEEN, N. Babesia microti infection changes host spleen architecture and is cleared by a Th1 immune response. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JAN, 31 jan. 2018.

DOS-SANTOS, W. L. C. *et al.* Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 3–4, p. 251–259, 15 jun. 2008.

EISENBARTH, S. C. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 2, p. 89–103, 21 nov. 2018.

EL SHIKH, M. E. M.; PITZALIS, C. Follicular dendritic cells in health and disease. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. SEP, p. 292, 21 set. 2012.
ENGWERDA, C. R. *et al.* A role for tumor necrosis factor- α in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. **American Journal of Pathology**, v. 161, n. 2, p. 429–437, 2002.

FALEIRO, R. J. *et al.* Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 2014.

FISHMAN, D.; ISENBERG, D. A. Splenic involvement in rheumatic diseases. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 27, n. 3, p. 141–155, 1997.

FORESTIER, C. L. Imaging host-leishmania interactions: Significance in visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 35, n. 9–10, p. 256–266, set. 2013.

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

GANZ, T. Macrophages and Iron Metabolism. In: **Myeloid Cells in Health and Disease**. [s.l.] American Society of Microbiology, 2016. v. 4p. 803–812.

GAUTAM, S. *et al.* CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 2, p. 290–299, 15 jan. 2014.

GLEICHMANN, E.; VAN ELVEN, E. H.; VAN DER VEEN, J. P. W. A systemic lupus erythematosus (SLE)-like disease in mice induced by abnormal T-B cell cooperation. Preferential formation of autoantibodies characteristic of SLE. **European Journal of Immunology**, v. 12, n. 2, p. 152–159, 1982.

GOTO, H.; PRIANTI, M. DAS G. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, p. 241–246, 2009.

GROSSI, C. E.; LYDYARD, P. M. **Encyclopedia of immunology** . Second Edition ed. London: Academic Press, 1998. v. 1

GUPTA, G.; OGHUMU, S.; SATOSKAR, A. R. Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. In: **Advances in Applied Microbiology**. [s.l.] Academic Press Inc., 2013. v. 82p. 155–184.

GUPTA; NISHI. Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug discovery. **Indian Journal of Medical Research**, v. 133, n. 1, p. 27, jan. 2011.

GURUNG, P.; KANNEGANTI, T.-D. Innate immunity against Leishmania infections. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 9, p. 1286–1294, 1 set. 2015.

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.

HOFFMANN, J. L. *et al.* Experimental infection with Leishmania chagasi in immunosuppressed Balb/c mice: Cytokines and parasite burdens. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 15, n. 3, p. 391–410, 2009.

IDRIS, M.; FARID, J.; GUL, N. Morphology Of Bone Marrow In Visceral Leishmaniasis. **Journal of Ayub Medical College**, v. 30, n. 3, p. 342–344, 1 jul. 2018.

JAWED, J. J.; DUTTA, S.; MAJUMDAR, S. Functional aspects of T cell diversity in visceral leishmaniasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 117, p. 109098–109098, 10 jun. 2019.

JIMÉNEZ-ANTÓN, M. D. *et al.* Syrian Hamster as an Advanced Experimental Model for Visceral Leishmaniasis. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press Inc., 2019. v. 1971p. 303–314.

JORDAN, S. *et al.* Natural killer cells are required for extramedullary hematopoiesis following murine cytomegalovirus infection. **Cell Host and Microbe**, v. 13, n. 5, p. 535–545, 15 maio 2013.

KALIYAPPAN, K. *et al.* Applications of immunohistochemistry. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 4, n. 6, p. 307, 2012.

KAPILA, V.; WEHRLE, C. J.; TUMA, F. **Physiology, Spleen**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2020.

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

KEENAN, C. M. *et al.* Visceral Leishmaniasis in the German Shepherd Dog. I. Infection, Clinical Disease, and Clinical Pathology: **Veterinary Pathology**, v. 21, n. 1, p. 74–79, 26 jun. 2016.

KUMAR, P. V. *et al.* Visceral leishmaniasis: Bone marrow biopsy findings. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 29, n. 2, p. 77–80, fev. 2007.

- KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. AUG, p. 251, 14 ago. 2012.
- KUPANI, M.; PANDEY, R. K.; MEHROTRA, S. Neutrophils and Visceral Leishmaniasis: Impact on innate immune response and cross-talks with macrophages and dendritic cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 236, n. 4, p. 2255–2267, 1 abr. 2021.
- LEITE FREITAS, C. R. *et al.* Pathology of the Spleen in Hepatosplenic Schistosomiasis. Morphometric Evaluation and Extracellular Matrix Changes. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 6, p. 815–822, 1999.
- LEWIS, S. M.; WILLIAMS, A.; EISENBARTH, S. C. Structure and function of the immune system in the spleen. **Science Immunology**, v. 4, n. 33, p. 6085, 1 mar. 2019.
- LI, N. *et al.* Pathologic diagnosis of spontaneous splenic rupture in systemic lupus erythematosus. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 6, n. 2, p. 273–280, 2013.
- LIDANI, K. C. F. *et al.* Visceral Leishmaniasis and Natural Infection Rates of Leishmania in Lutzomyia longipalpis in Latin America. In: **The Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis**. [s.l.] InTech, 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.
- 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, 3 fev. 2014.
- LOPEZ LOPEZ, M. C.; PÉREZ-ANTÓN, E.; THOMAS, M. C. Proceso de agotamiento de las células T durante la infección crónica causada por tripanosomátidos intracelulares. **Ars Pharmaceutica (Internet)**, v. 60, n. 2, p. 65–78, 6 jun. 2019.
- LORÍA-CERVERA, E. N.; ANDRADE-NARVÁEZ, F. J. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 1–11, 2014.
- LOUKOV, D. *et al.* Tumor necrosis factor drives increased splenic monopoiesis in old mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 100, n. 1, p. 121–129, 1 jul. 2016.
- LV, Y. *et al.* Hypersplenism: History and current status (Review).

Experimental and Therapeutic Medicine, v. 12, n. 4, p. 2377–2382, 1 out. 2016.

MCCALL, L.-I.; ZHANG, W.-W.; MATLASHEWSKI, G. Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. **PLOS Pathogens**, v. 9, n. 1, p. e1003053, jan. 2013.

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, 1 jan. 2017.

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, 1 fev. 2001.

MELO, C. V. B. DE *et al.* Phenotypical Characterization of Spleen Remodeling in Murine Experimental Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 653, 15 abr. 2020.

NIETO, A. *et al.* Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 1–13, 23 fev. 2011.

NOTHELFER, K.; SANSONETTI, P. J.; PHALIPON, A. Pathogen manipulation of B cells: the best defence is a good offence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 173–184, 9 fev. 2015.

OKŁA, H. *et al.* Rat spleen in the course of babesia microti invasion: Histological and submicroscopic studies. **Acta Protozoologica**, v. 56, n. 2, p. 129–137, 24 nov. 2017.

ONG, H. B. *et al.* Establishment, optimisation and quantitation of a bioluminescent murine infection model of visceral leishmaniasis for systematic vaccine screening. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 1 dez. 2020.

OSORIO, E. Y. *et al.* In-situ proliferation contributes to the accumulation of myeloid cells in the spleen during progressive experimental visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 15, n. 11 November, p. e0242337, 1 nov. 2020.

PEREIRA, A. V. *et al.* Toxoplasma gondii causes lipofuscinosis,

collagenopathy and spleen and white pulp atrophy during the acute phase of infection. **Pathogens and Disease**, v. 77, n. 9, 18 fev. 2020.

PISCOPO, T. V; AZZOPARDI, C. M. Leishmaniasis. **Postgraduate Medical Journal**, v. 83, n. 976, p. 649–657, 1 fev. 2007.

PIVKIN, I. V. *et al.* Biomechanics of red blood cells in human spleen and consequences for physiology and disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 28, p. 7804–7809, 12 jul. 2016.

POULAKI, A.; PIPERAKI, E.-T.; VOULGARELIS, M. Effects of Visceralising Leishmania on the Spleen, Liver, and Bone Marrow: A Pathophysiological Perspective. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 759, 5 abr. 2021.

PREHAM, O. *et al.* CD4+ T Cells Alter the Stromal Microenvironment and Repress Medullary Erythropoiesis in Murine Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2958, 18 dez. 2018.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, n. 1, p. 147–154, 3 maio 2014.

RODRIGUES, O. R. *et al.* Identification of regulatory T cells during experimental Leishmania infantum infection. **Immunobiology**, v. 214, n. 2, p. 101–111, fev. 2009.

RODRIGUES, V. *et al.* Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 1 mar. 2016.

RONET, C. *et al.* Leishmania major -Specific B Cells Are Necessary for Th2 Cell Development and Susceptibility to L. major LV39 in BALB/c Mice . **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 7, p. 4825–4835, 1 abr. 2008.

SAINI, S.; RAI, A. K. Hamster, a close model for visceral leishmaniasis: Opportunities and challenges. **Parasite Immunology**, v. 42, n. 10, p. e12768, 1 out. 2020.

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.

SAPORITO, L. *et al.* Visceral leishmaniasis: host–parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. e572–e576, 1 ago. 2013.

SATODATE, R. *et al.* Scanning electron microscopical studies of the arterial

terminals in the red pulp of the rat spleen. **The Anatomical Record**, v. 215, n. 3, p. 214–216, jul. 1986.

SILVA-BARRIOS, S.; CHARPENTIER, T.; STÄGER, S. The Deadly Dance of B Cells with Trypanosomatids. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 155–171, 1 fev. 2018.

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, 1 maio 2016.

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, 5 jan. 2012.

SINGH, B. *et al.* Abnormal b-cell subset and blimp-1-mediated humoral responses associated with visceral leishmaniasis pathogenesis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 4, p. 816–821, 2019.

SMELT, S. C. *et al.* Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 8, 1997.

SMELT, S. C. *et al.* B Cell-Deficient Mice Are Highly Resistant to *Leishmania donovani* Infection, but Develop Neutrophil-Mediated Tissue Pathology. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 7, p. 3681–3688, 1 abr. 2000.

SONG, M.-K.; PARK, B.-B.; UHM, J.-E. Understanding Splenomegaly in Myelofibrosis: Association with Molecular Pathogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 898, 18 mar. 2018.

STÄGER, S.; BANKOTI, R. Differential regulation of the immune response in the spleen and liver of mice infected with *leishmania donovani*. **Journal of Tropical Medicine**, 2012.

STEINIGER, B. S. Human spleen microanatomy: Why mice do not suffice. **Immunology**, v. 145, n. 3, p. 334–346, 1 jul. 2015.

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open Biology**, v. 7, n. 9, 1 set. 2017.

SZCZEPANEK, S. M. *et al.* Splenic morphological changes are accompanied by altered baseline immunity in a mouse model of sickle-cell disease. **American Journal of Pathology**, v. 181, n. 5, p. 1725–1734, 1 nov. 2012.

TORRES-GUERRERO, E. *et al.* Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 750, 26 maio 2017.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 229–242, 1 nov. 2007.

URBAN, B. C. *et al.* Fatal Plasmodium falciparum malaria causes specific patterns of splenic architectural disorganization. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 1986–1994, 1 abr. 2005.

VAN KRIEKEN, J. H. J. M. Histology of the spleen: Structure and cellular distribution in the normal spleen. **Current Diagnostic Pathology**, v. 4, n. 2, p. 100–105, 1 jun. 1997.

VARMA, N.; NASEEM, S. Hematologic Changes in Visceral Leishmaniasis/Kala Azar. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v. 26, n. 3, p. 78–82, 30 set. 2010.

VERESS, B. *et al.* Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. **Immunology**, v. 33, n. 5, p. 605–10, nov. 1977.

VERESS, B.; ABDALLA, R. E.; EL HASSAN, 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, 1983.

WAHBA, M. G. F.; MESSIHA, B. A. S.; ABO-SAIF, A. A. Protective effects of fenofibrate and resveratrol in an aggressive model of rheumatoid arthritis in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 9, p. 1705–1715, 1 set. 2016.

WILKINS, B. S. *et al.* Splenic marginal zone atrophy and progressive CD8+ T-cell lymphocytosis in HIV infection: A study of adult post-mortem spleens from Côte d'Ivoire. **Histopathology**, v. 42, n. 2, p. 173–185, 1 fev. 2003.

WU, C.; HUA, Q.; ZHENG, L. Generation of Myeloid Cells in Cancer: The Spleen Matters. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1126, 5 jun. 2020.

YADAGIRI, G.; SINGH, P. P. Chemotherapy and experimental models of visceral leishmaniasis. In: **Infectious Diseases and Your Health**. Singapore: Springer Singapore, 2018. p. 63–97.

YURDAKUL, P. *et al.* Compartment-specific remodeling of splenic micro-architecture during experimental visceral leishmaniasis. **American**

Journal of Pathology, v. 179, n. 1, p. 23–29, jul. 2011.

ZHANG, W. W. *et al.* Genetic Analysis of *Leishmania donovani* Tropism Using a Naturally Attenuated Cutaneous Strain. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 7, p. 1004244, 2014.

ZHANG, W. W. *et al.* Genetic Analysis of *Leishmania donovani* Tropism Using a Naturally Attenuated Cutaneous Strain. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 7, p. 1004244, 2014.