

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

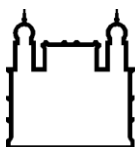
Aurea Virginia Andrade da Silva

Infecção natural de cães com *Leishmania infantum*: Correlação entre a resposta imune celular e o remodelamento da matriz extracelular esplênica

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo curso de Pós-graduação em biologia celular e molecular.

Orientadores: Prof. Dr. Fernanda Nazaré Morgado
Prof. Dr. Renato Porrozi de Almeida

RIO DE JANEIRO
2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: Aurea Virginia Andrade da Silva

INFECÇÃO NATURAL DE CÃES COM *Leishmania (L.) infantum*: CORRELAÇÃO ENTRE A RESPOSTA IMUNE CELULAR E O REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR ESPLÊNICA

ORIENTADORES: Prof. Dr. Fernanda Nazaré Morgado
Prof. Dr. Renato Porrozzini de Almeida

Aprovada em: 18/01/2021

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Fátima da Conceição Silva-Membro/Presidente
Prof. Dr. Lúcia Helena Pinto da Silva-Membro
Prof. Dr. Vinícius Cotta de Almeida-Membro
Prof. Dra. Flávia Lima Ribeiro Gomes-Suplente
Prof. Dra. Juliana Perroni Bezerra de Menezes Fullan-Suplente

Rio de Janeiro, 18 de Janeiro de 2021

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por me dar forças e manter meu espírito sempre empolgado com a ciência.

Dedico em especial à minha família, pelo suporte e amor incondicional.

Andrade da Silva, Aurea Virginia .

Infecção natural de cães com *Leishmania infantum*: Correlação entre a resposta imune celular e o remodelamento da matriz extracelular esplênica / Aurea Virginia Andrade da Silva. - Rio de Janeiro, 2021.

183 f.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2021.

Orientadora: Fernanda Nazaré Morgado.

Co-orientadora: Renato Porrozi de Almeida.

Bibliografia: f. 119-150

1. *Leishmania (L.) infantum*. 2. Leishmaniose visceral canina. 3. Infecção natural. 4. Matriz extracelular esplênica. 5. Desorganização da matriz extracelular esplênica. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

Agradeço a Deus sempre. Não é uma tarefa fácil chegar até aqui, ainda mais chegar até aqui fazendo ciências. Deus manteve meu espírito animado e encantado com cada experimento, sendo cada resultado motivo de muita comemoração para mim. A ciência deve ser usada para a sociedade, nunca para obtenção de um título. Título é uma consequência, muito importante, mas consequência. Pense no que você está fazendo, compartilhe conhecimento, mude vidas. Se entregue por inteiro.

Agradeço aos meus orientadores, Dra. Fernanda Morgado e Dr. Renato Porrozzi, muito obrigada por cada ensinamento. Obrigada por abrirem as portas da Fundação para mim e por me permitirem ser a aluna que sou. Que eu possa representa-los com orgulho daqui pra frente. Obrigada Fê por não desistir e me ajudar quando eu precisei de apoio e por me incentivar a crescer. Quero muito poder ser o que você foi para mim, como orientadora e amiga, aos meus futuros alunos. Ao Renato, embora eu nunca tenha verbalizado, você sempre foi um exemplo pra mim e com muita importância. Sempre irei olhar para trás e lembrar de cada ensinamento. “*Ao mestre com carinho*”.

A equipe do Laboratório de pesquisa em Leishmaniose, Dr^a Elisa, que desde que cheguei em 2011 foi um exemplo para mim de mulher, cientista e chefe. Sua trajetória me inspira muito. A toda equipe do LPL, Dudú, Dra Rosane, Dra Mariana, Msc. Hellen, Dra Patrícia, Bárbara, Nathália, Renata, Jonathan, Selma, Henrique, Caroline e Camilina. Viver em grupo não é uma tarefa fácil, mas este é o sentido da vida, saber viver e conviver. Obrigada por tudo gente.

Agradeço em especial à minha querida Verônica, mulher simples, mas dona de uma verdade e um amor que só mães têm. Vevêzinha, meu eterno agradecimento.

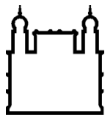
Agradeço à minha coordenadora Dra. Leila Mendonça e secretária Julimar Ferreira. Minha eterna gratidão à querida Julimar que sabe entender nossos momentos com paciência.

Agradeço a minha primeira casa, meu Instituto com “I” maiúsculo, irei te representar com orgulho, levantar a bandeira da FIOCRUZ e sempre honrar minha casa científica.

Agradeço em especial à minha família, sem eles eu não conseguiria. Minha mãe JERCILENE que me ensinou a amar o que eu faço e me ensinou a ser uma mulher de fibra, de valores e de honra. Aos meus Irmãos Alessandra, Alex e Victor que dizem que sou o orgulho deles, mas eles são os meus também. A minha amada Vó que sempre orou pedindo a Deus para que meus neurônios se multiplicassem...Haja cérebro. A minha *bestie friend*, Mayla Abraham, a gente chegou até aqui, obrigada por cada mensagem de apoio e força!!

Não te mandei eu? Sê forte e corajoso; não temas, nem te espantes, porque o SENHOR, teu Deus, é contigo por onde quer que andares.

Bíblia, Josué 1:9



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

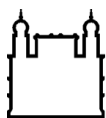
INFECÇÃO NATURAL DE CÃES COM *Leishmania (L.) infantum*: CORRELAÇÃO ENTRE A RESPOSTA IMUNE CELULAR E O REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR ESPLÊNICA

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Aurea Virginia Andrade da Silva

O baço é um dos principais órgãos afetados na Leishmaniose visceral canina (LVC) e a desorganização de sua microarquitetura tem sido associada à progressão da doença. No presente estudo, demonstramos a desorganização e redução da polpa branca esplênica acompanhada pelo aumento da carga parasitária, além da redução de linfócitos T CD4⁺. Além disso, verificamos alterações no microambiente tímico, principal sítio de maturação dos linfócitos TCD4⁺, de onde tem sido descrita a saída de linfócitos T imaturos e apoptose em infecções experimentais com *Leishmania (L.) infantum*. A redução dos linfócitos T CD4⁺ no baço poderia estar associada à saída precoce de linfócitos T imaturos do timo e também a um déficit migratório devido tanto às alterações do microambiente esplênico quanto à falha na capacidade responsiva aos estímulos quimiotáticos e/ou antigênicos. Assim, analisamos a correlação entre a desorganização da microarquitetura esplênica e a capacidade de migração de células mononucleares de sangue periférico (CMSP), esplenócitos e células de linfonodo de cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) infantum*. De uma forma geral o potencial migratório celular estava preservado, onde a migração basal de esplenócitos foi maior quando comparados às células isoladas do linfonodo. Esplenócitos tiveram maior atividade migratória quando comparados aos demais órgãos na presença do antígeno de *Leishmania (L.) infantum* (AgLi) e na presença de CXCL13 e CCL19. Uma vez que o potencial migratório *in vitro* se mostrou preservado, analisamos os componentes do sistema de condutas, que são canais que transportam moléculas de pequeno peso molecular como as quimiocinas. Assim, observamos redução dos fibroblastos reticulares que revestem e mantêm os condutas em animais com médio escore clínico. E observamos aumento de colágeno I/III que preenchem o cerne dos canais de condutas em animais com alta carga parasitária e com polpa branca desorganizada. Hipotetizamos que com o impedimento da migração de células pelas alterações de matriz extracelular e rede de condutas, poderia haver um déficit nos processos de ativação de linfócitos T levando ao quadro de imunossupressão comumente observado nos animais com LVC. Assim, investigamos o processo de ativação celular através da imunomarcagem das moléculas CD40/CD40L. Demonstramos a redução da expressão de CD40L em animais com médio escore clínico. Por fim, observamos redução da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) relacionada a desorganização da polpa branca esplênica. É possível que a desorganização da polpa branca esplênica observada nos cães naturalmente infectados seja o reflexo do comprometimento do sistema de condutas, do transporte e reconhecimento de quimiocinas e citocinas resultando em um déficit recrutamento, interação e ativação dos linfócitos e macrófagos que atuam na resposta imune mediada por células. Como consequência ocorreria falha no controle da carga parasitária que poderia contribuir para a imunossupressão e progressão da doença.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

NATURAL INFECTION OF DOGS WITH *Leishmania (L.) infantum*: CORRELATION BETWEEN THE IMMUNE CELLULAR RESPONSE AND THE REMODELING OF THE SPLENIC EXTRACELLULAR MATRIX

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Aurea Virginia Andrade da Silva

The spleen is one of the main organs affected in canine visceral leishmaniasis (CVL) and the disorganization of its microarchitecture has been associated with the progression of the disease. In the present study, we demonstrated the disorganization and reduction of the splenic white pulp accompanied by increased parasitic load, in addition to the reduction of CD4⁺ T lymphocytes. In addition, we observed alterations in thymic microenvironment, the main maturation site of TCD4⁺ lymphocytes, where the exit of immature T lymphocytes and their apoptosis has been described in experimental infections with *Leishmania (L.) infantum*. The reduction of CD4⁺ T lymphocytes in the spleen could be associated with the early exit of immature T lymphocytes from thymus and also with a migratory deficit due both to changes in the splenic microenvironment and to the failure in the cellular responsiveness to chemotactic and/or antigenic stimuli. Thus, we analyzed the correlation between the disorganization of the splenic microarchitecture and the migration capacity of peripheral blood mononuclear cells (PBMC), splenocytes and lymph node cells of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. In general, the cellular migratory potential was preserved, where basal splenocyte migration was greater when compared to isolated lymph node cells. Splenocytes had greater migratory activity when compared to other organs in the presence of *Leishmania (L.) infantum* antigen (LiAg) and in the presence of CXCL13 and CCL19. Once the in vitro migratory potential was preserved, we analyzed the components of the conduit system, which are channels that carry small molecular weight molecules such as chemokines. Thus, we observed a reduction in reticular fibroblasts that line and maintain conduits in animals with a medium clinical score. We observed an increase in collagen I/III that fill the core of conduit channels in animals with high parasitic load and with disorganized white pulp. We hypothesized that with the impediment of cell migration due to changes in the extracellular matrix and network of conduits, there could be a deficit in the activation processes of T lymphocytes leading to the immunosuppression commonly observed in animals with LVC. Thus, we investigated the cell activation process through the immunostaining of CD40/CD40L molecules. We demonstrated a reduction in CD40L expression in animals with a medium clinical score. Finally, we observed a reduction in the expression of the enzyme inducible nitric oxide synthase (iNOS) related to the disorganization of the splenic white pulp. It is possible that the disorganization of the splenic white pulp observed in naturally infected dogs is a reflection of the impairment of the conduit system, transport and recognition of chemokines and cytokines resulting in a deficit in recruitment, interaction and activation of lymphocytes and macrophages that act on the immune response cell-mediated. As a consequence, there would be a failure to control the parasitic burden that could contribute to immunosuppression and disease progression.

Sumário

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE FIGURAS APLICADAS NA INTRODUÇÃO	XI
LISTA DE ABREVIACÕES	XIV
LISTA DE TABELAS	XV
APÊNDICE.....	XVI
1.0 INTRODUÇÃO	1
1.1 As Leishmanioses	1
1.2 Agente etiológico das Leishmanioses.....	2
1.3 Vetor e Ciclo biológico da Leishmaniose	4
1.4 Reservatório do parasita <i>Leishmania (L.) infantum</i> causadora das formas viscerais da Leishmaniose ..	7
1.5 Leishmaniose visceral	8
1.5.1 Leishmaniose visceral canina.....	8
1.5.2 Diagnóstico da Leishmaniose visceral canina (LVC).....	10
1.5.3 Tratamento da Leishmaniose visceral canina.....	12
1.5.4 Vacinas para a Leishmaniose visceral canina.....	13
1.6 Interação parasita-hospedeiro.....	13
1.6.1 Acometimento dos órgãos e interação parasita-hospedeiro.....	13
1.6.2 Interação parasitária com mecanismos imunológicos na derme e migração para os órgãos linfoides secundários.....	14
1.6.3 Colonização dos órgãos linfoides.....	17
1.6.4 Impacto da <i>Leishmania (L.) infantum</i> no microambiente Tímico.....	20
1.7 Acometimento do tecido esplênico	25
1.7.1 Anatomia e composição do tecido esplênico.....	25
1.7.2 Matriz extracelular esplênica.....	27
1.7.4 Remodelamento da matriz extracelular esplênica de cães naturalmente infectados com <i>L. (L.) infantum</i>	37
2.0 JUSTIFICATIVA	44
3.0 OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo Geral	45
3.2 Objetivos específicos	45
4.0 RESULTADOS	46
4.1 RESULTADOS PUBLICADOS.....	46
Artigo I: Detection of amastigotes and histopathological alterations in the thymus of <i>Leishmania infantum</i> -infected dog.....	46
Artigo II: Morphophysiological changes in the splenic extracellular matrix of <i>Leishmania infantum</i> -naturally infected dogs is associated with alterations in lymphoid niches and the CD4 ⁺ T cell frequency in spleens	61
Artigo III: Infectious Diseases and the Lymphoid Extracellular Matrix Remodeling: A Focus on Conduit System.....	79
4.2 RESULTADOS NÃO PUBLICADOS	93

4.2.1 Metodologia.....	93
4.2.2 Resultados	98
5.0 DISCUSSÃO GERAL	110
6.0 CONCLUSÃO.....	119
7.0 REFERÊNCIAS.....	120

Lista de figuras aplicadas na introdução

Figura 1.3- Esquema ilustrativo do ciclo biológico da *Leishmania* sp. no vetor e no hospedeiro mamífero. 1) Fêmeas do inseto vetor realizam o repasto sanguíneo para o amadurecimento do seu ciclo gonodotrófico regurgitando as formas promastigotas metacíclica na derme do mamífero. 2) As formas promastigotas são fagocitadas por células do sistema fagocitário. 3) As formas promastigotas no interior de macrófagos se diferenciam em amastigotas. 4) No interior dos macrófagos, as formas amastigotas realizam divisão binária e lisam os macrófagos. 5) Ao realizarem repasto sanguíneo, fêmeas do inseto vetor ingerem macrófagos de demais células do sistema fagocitário infectados com as formas amastigotas. 6) Já no intestino do inseto vetor, as formas amastigotas lisam os macrófagos. 7) As formas amastigotas livres se diferenciam em promastigotas. 8) As formas promastigotas migram para a probócite do inseto e se diferenciam nas formas infectantes, as promastigotas metacíclica que serão regurgitadas na derme do mamífero. Site: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/commodificações>.....06

Figura 1.6.3- Representação de amastigotas de *Leishmania (L.) infantum* no baço e linfonodo de cães naturalmente infectados. Microscopia de luz em tecido parafinado e corado com hematoxilina e eosina. As setas indicam a presença de ninhos de amastigotas no A) linfonodo e B) no baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) infantum*. Aumento de 25 µm e objetiva de 40x. Arquivo pessoal.....19

Figura 1.6.4- Histologia do timo. Corte histológico do timo corado com hematoxilina e eosina em aumento de 500µm. Através da coloração por hematoxilina e eosina podemos delimitar a região córtex que apresenta coloração mais escura. Além da região córtex, a região medular é a região mais interna do timo, tendo coloração mais clara devido a diversidade celular neste local. A região da capsula reveste os lóbulos do timo.....24

Figura 1.7.1 Compartimentalização do tecido esplênico. O baço é um órgão linfóide sistêmico formado por polpa branca esplênica a partir das regiões da bainha linfóide periarteriolar que envolvem a arteríola central, região de linfócitos B que quando ativadas formam a região do centro germinativo, e zona marginal. A polpa vermelha é constituída por sinusóides, conduítes e trabéculas formadas por tecido conjuntivo. Microscopia de luz. Coloração por hematoxilina e eosina. Aumento de 100µm. Objetiva de 10x. Imagem acervo

pessoal.....24

Figura 1.7.2- Esquema ilustrativo da composição do sistema de condúites. O lúmem do condúite é formado por colágeno do tipo I, III e IV inseridos na matriz basal, formando uma substância amorfa. No lúmem do condúite são transportados de forma ativa muitas proteínas, inclusive as quimiocinas que serão capturadas pelas células durante o processo de migração celular. Os fibroblastos são células que secretam diversas proteínas da matriz, entre elas a laminina e o colágeno que juntos formam o sistema de condúites. Além do seu papel de secretar essas proteínas estruturais, os fibroblastos entram em contato com as células migrantes. Esquema ilustrativo publicado por.....29

Figura 1.7.4- Esquema ilustrativo do microambiente esplênico. (A) Baço organizado: nesta ilustração é possível visualizar um baço organizado com polpa e compartimentação esplênica, como centro germinativo e bainha periarteriolar linfática, zona marginal e cápsula para exercer seu papel fisiológico. Conforme representado, a matriz extracelular mantém sua composição normal. (B) Baço desorganizado: Esquema ilustrativo de um microambiente cronicamente inflamado do tecido do baço. Durante a inflamação crônica, a matriz extracelular sofre remodelação, favorecendo a entrada de novas células inflamatórias. Na inflamação persistente, a matriz extracelular perde seu controle de remodelação mostrando um aumento de citocinas como Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e Fator de Crescimento Transformador- β (TGF- β) juntamente com alta produção de metalopeptidases de matriz e moléculas microbidas como espécies reativas de nitrogênio (RNS), espécies reativas de oxigênio (ROS) e enzimas lisossomais. Esses eventos levam a danos nos tecidos ao quebrar ou acumular algumas proteínas estruturais como a laminina e o colágeno. Nessa situação, comumente ocorre redução das células e atrofia da polpa branca.....37

Figura 1.7.4- Fluxograma: Matriz extracelular e alterações no tecido linfoide durante processos infecciosos agudos e crônicos. Ao detectar a presença de patógeno, nosso sistema imunológico inato é ativado e como consequência desta ativação ocorre uma cascata de eventos, principalmente mediados pelo sistema complemento, que culminam com o recrutamento de células importantes para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Já no órgão linfoide, o aumento do seu tamanho é associado à alteração da microarquitetura tecidual e assim a eliminação do patógeno. No entanto, devido a alguns fatores, o patógeno pode permanecer no

tecido e a sua persistência gera a quebra na homeostase tecidual e assim o órgão perde sua capacidade de coordenar muitas funções como por exemplo o desenvolvimento da resposta imune adaptativa causando uma imunossupressão e falha no controle da infecção. Com adaptações.....40

Lista de abreviações

ACP/DS- Animais com alta carga parasitária e polpa branca desorganizada

AgLi- Antígeno solúvel de *Leishmania (L.) infantum*

APCs- Células apresentadoras de antígenos

BCP/DS- Baixa carga parasitária e polpa branca desorganizada

BCP/OR- Animais com baixa carga parasitária e polpa branca organizada

BSA- Albumina de soro bovino

CD- Cluster de diferenciação

CMSP- Células mononucleares do sangue periférico

DS- Animais com polpa branca desorganizada

EPN- Esplenócito

ER-TR7- Marcador biológico de fibroblastos reticulares

HIGH- Alta carga parasitária

HPRT- Enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase

ID- Polpa branca intenso desorganizada

IL- Isoleucina

iNOS- Enzima óxido nítrico sintase induzida

LN- Linfonodo

LOW- Baixa carga parasitária

LPS- Lipopolissacarídeo de membrana bacteriana

MD- Polpa branca médio desorganizada

MEC- Matriz extracelular esplênica

OR- Polpa branca organizada

PBE- Polpa branca esplênica

PBS- Salina tamponada com fosfato

PD- Polpa branca pouco desorganizada

SFB- Soro fetal bovino

ssrRNA- RNA da Pequena subunidade ribossomal

TNF- Fator de necrose tumoral

Lista de tabelas

Tabela 4.2.2.1: Dados quantitativos da marcação dos alvos imunohistoquímicos aplicados no estudo.....	106
Tabela 4.2.2.2: Ddaos quantitativos do ensaio de migração in vitro por ensaio em transwell.....	107

Apêndice

Anexo 1- Pro-cellular exhaustion Markers are Associated with Splenic Microarchitecture Disorganization and parasite Load in Dogs with Visceral Leishmaniasis.....	150
--	-----

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 As Leishmanioses

As Leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas com amplo espectro clínico estando distribuídas em 5 continentes e endêmicas em pelo menos 102 Países. As Leishmanioses estão inseridas entre as 5 principais doenças parasitárias estando em terceiro lugar entre as doenças tropicais negligenciadas, antecedidas por malária e doença de Chagas (1) respectivamente. Atualmente, estima-se que são registrados 1,3 milhões de novos casos de Leishmanioses dos quais 20.000-30.000 evoluem para óbito a cada ano (1–4). A distribuição das Leishmanioses ocorre em países de todos os continentes, dos quais destacam-se Etiópia, Índia, Sudão, Kênia, Afeganistão, Irã, Síria e Brasil (3,5), totalizando 90% dos casos de Leishmaniose visceral e 70% dos casos de Leishmaniose tegumentar (3). Atualmente, 1 milhão de pessoas vivem em áreas endêmicas e correm risco de contrair a infecção, e estimam-se que anualmente ocorra o registro de 1 milhão de casos da Leishmaniose tegumentar e 300 mil casos da Leishmaniose visceral, forma grave das Leishmanioses (6,7). No Brasil observam-se tanto casos de Leishmaniose tegumentar, quanto visceral.

Esta zoonose tem como agente etiológico o protozoário do gênero *Leishmania* sp. apresentando pelo menos 30 espécies que causam os diferentes espectros clínicos das Leishmanioses. Dentre elas, destacam-se no Brasil as espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum*, agentes da Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral, respectivamente (8,9). As Leishmanioses apresentam amplo espectro clínico que podem ser determinados pela espécie envolvida, pelo estado imunológico do hospedeiro e pela presença de comorbidades (10–12). Variam desde formas cutâneas auto resolutivas, passando por lesões tegumentares de evolução variável conhecidas como: Leishmaniose cutânea (LC- lesões autolimitadas de pele), Leishmaniose difusa (LD- lesões cutâneas vegetantes, usualmente resistentes ao tratamento) e Leishmaniose Mucosa (LM caracterizadas por lesão em tecidos mucosos principalmente das vias aerodigestivas superiores) (2), até acometimento de vísceras principalmente do sistema linfohematopoiético denominada Leishmaniose visceral (LV). Esta última é a forma mais grave das Leishmanioses sendo marcada pela disseminação sistêmica do

parasita, evolução do quadro clínico para fase crônica e óbito quando não tratada adequadamente (13).

A Leishmaniose visceral difere das demais Leishmanioses por sua evolução clínica com acometimento de vísceras e comprometimento geral das funções biológicas do hospedeiro. Os principais órgãos afetados são aqueles ricos em células do sistema fagocítico mononuclear, como baço, linfonodos, medula óssea e fígado. No ambiente urbano, cães são implicados como reservatórios do parasita e fonte de infecção para os vetores flebotomíneos. Seu papel no ciclo de transmissão é importante, pois o surgimento de casos caninos precede a detecção de casos humanos (10,14). Além do mais, as profilaxias aplicadas no controle e no tratamento da Leishmaniose visceral canina não apresentam resultados satisfatórios e muitas das vezes são aplicadas de forma indiscriminada, levando assim, ao crescimento do número de casos caninos e conseqüentemente de casos humanos (15–17). Desta forma, a Leishmaniose visceral é uma zoonose com elevada importância sanitária.

1.2 Agente etiológico das Leishmanioses

As diferentes formas clínicas das Leishmanioses são resultantes de dois fatores: da diversidade de espécies capazes de infectar o hospedeiro, sendo descritas aproximadamente 30 espécies infectantes aos mamíferos que, quando comparadas entre si, mostram uma singularidade espécie-específica (8,18) e da capacidade de resposta imune do hospedeiro(19). Assim sendo, o quadro clínico do hospedeiro em resposta à infecção por *Leishmania* sp irá depender da interação parasita-hospedeiro(10,11,20). Em relação à diversidade do parasita, as Leishmanioses possuem como agente etiológico o parasita do gênero *Leishmania* que é representado por dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*. O subgênero *Leishmania* comporta as espécies *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) tropica*, *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) aethiópica*, *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) mexicana*. Já o subgênero *Viannia* comporta as espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, entre outras (8,21,22). Os subgêneros foram classificados assim uma vez que as espécies agrupadas no subgênero *Leishmania* apresentam multiplicação no intestino anterior e intestino médio do

flebotomíneo. Já as espécies agrupadas no subgênero *Viannia* apresentam desenvolvimento no intestino posterior do inseto (22,23).

Cupolillo et al (22) propuseram uma organização do gênero *Leishmania* em sessões *Euleishmania* e *Paraleishmania*, em que as espécies agrupadas no subgênero *Leishmania* e *Viannia* estão inseridas na sessão *Euleishmania*. A organização dos subgêneros em *Euleishmania* e *Paraleishmania* pode ser realizada através das técnicas moleculares, como por exemplo, a eletroforese de enzima multilocus (MLEE), o polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) e espaço interno transcrito (ITS-1). Tais ferramentas utilizadas para a classificação desta organização são importantes, uma vez que abrem caminho para a identificação da espécie infectante (10,11).

Além da classificação quanto as formas de identificação das espécies, é usual distribuir geograficamente as espécies de *Leishmania* quanto a sua circulação no velho e novo mundo. No velho mundo há a circulação das espécies *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) major*, *L. (L.) aethiopica* e *L. (L.) tropica*. Já no novo mundo, as espécies circulantes são *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) guyanensis*, entre outras (21,23).

De uma forma geral, os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam duas formas evolutivas, a forma amastigota e a forma promastigota (24). As formas amastigotas são observadas no interior de células do sistema fagocitário mononuclear do mamífero apresentando flagelo não exteriorizado e corpo arredondado (25). No entanto, estas formas podem também ser observadas livres nos tecidos como resultado do rompimento de macrófagos (26). Já as formas promastigotas apresentam flagelo livre e corpo alongado sendo muito móveis, e são observadas no interior do tubo digestivo do vetor e em culturas a 26°C. No inseto vetor, as formas promastigotas realizam a metaciclogênese, caracterizada pela diferenciação das promastigotas nas formas procíclica, nectomona, leptomona e por último a forma infectante: a promastigota metacíclica (27,28). A metaciclogênese pode ocorrer também em culturas em meios específicos, e é dependente de mudanças bioquímicas, moleculares e morfológicas que impactam no perfil infectivo das promastigotas (29,30).

1.3 Vetor e Ciclo biológico da Leishmaniose

As fêmeas do inseto da subfamília Phlebotominae realizam o repasto sanguíneo, uma vez que necessitam das proteínas presentes no sangue de mamíferos para completar seu ciclo gonadotrófico e realizar a postura de ovos, em média 3-5 dias após a ingestão de sangue (31–34). As fêmeas do inseto vetor durante o repasto sanguíneo podem tanto regurgitar a forma promastigota metacíclica na derme do mamífero quanto ingerir novas células de sistema fagocitário infectadas com formas amastigotas (35–37). A subfamília Phlebotominae é agrupada em 5 gêneros: *Phlebotomus*, *Lutzomyia*, *Brumptomyia*, *Sergentomyia* e *Warileya* (38,39) onde destacam-se no Brasil o gênero *Lutzomyia*, no qual apresenta maior distribuição geográfica, apresenta elevada capacidade vetorial e é o principal vetor da espécie *Leishmania (L.) infantum* (40,41).

A presença do parasita no vetor pode influenciar a sobrevivência do inseto. As formas promastigotas metacíclicas acumulam-se na porção anterior do estômago e o proventrículo do inseto vetor e esse acúmulo pode afetar o processo de repasto sanguíneo, pois dificultam a passagem do sangue ingerido (42). As fêmeas do vetor então regurgitam na derme do mamífero uma massa contendo as formas promastigotas metacíclicas e saliva, e essa ação pode ocorrer mais de uma vez enquanto durar o processo de repasto sanguíneo (27,34). A saliva do inseto vetor contém uma importante proteína, a Maxidilam (43,44), que auxilia no recrutamento das células do sistema fagocitário, e portanto contribui para o estabelecimento da infecção no mamífero (33,35).

Macrófagos, neutrófilos e células dendríticas são importantes células do sistema reticuloendotelial (SRE), também conhecido por sistema mononuclear fagocitário, que atuam na varredura dos tecidos a procura de patógenos, antígenos e fragmentos celulares no organismo de mamíferos realizando um screening do tecido em um evento natural na manutenção e defesa do micromambiente (45,46). Assim, durante este processo natural de varredura dos tecidos, as células do sistema reticuloendotelial encontram fatores associados ao parasita infectante, ou até mesmo o próprio parasita, recrutando outras células deste sistema para o ambiente infectado (45). A interação das células do sistema reticuloendotelial com as formas promastigota de *Leishmania* sp. através de receptores de manose, receptores do tipo Tol (TRL) e seus respectivos ligantes resulta na fagocitose destes parasitas (45). Cada célula do sistema reticuloendotelial apresentará individualidades na interação, processamento e eliminação do parasita intracelular (45,47–50), assim, para fim de

exemplificação do ciclo biológico será dada ênfase no mecanismo de interação entre macrófagos e promastigota de *Leishmania* sp. Uma vez no interior dos macrófagos, a fusão entre o vacúolo parasitóforo e vacúolo lisossomal resulta na criação de um microambiente intracelular ácido estimulando a diferenciação das formas promastigotas em amastigotas, que são formas resistentes ao microambiente ácido formado através da alteração do pH e outros fatores bioquímicos no vacúolo parasitóforo(51,52). Após a fagocitose e diferenciação das formas promastigotas em amastigotas, o parasita inicia seu processo de replicação o que induzirá na lise da membrana extracelular dos macrófagos infectados e na liberação das formas amastigotas que sobreviveram ao microambiente ácido, assim, estas formas livres serão novamente infectadas por outras células do sistema reticuloendotelial.

A fagocitose do parasita pelas células reticuloendoteliais são importantes mecanismos para a limpeza do sitio de infecção, além disso, as células mononucleares infectadas deixam o sitio de infecção e migram em direção aos órgãos linfoides secundários que são importantes órgãos onde haverá a apresentação antigênica de epitopos de *Leishmania* sp. para os linfócitos T e B. Vale destacar que neste transito migratório em direção aos órgãos linfoides, o sistema circulatório tanto linfático quanto sanguíneo desempenham importante papel (24,53,54). Durante o repasto sanguíneo, fêmeas do flebotômio podem ingerir o sangue do mamífero contendo células mononucleares infectadas e assim infectando um novo vetor, onde as células infectadas sofrerão lise de sua membrana liberando as formas amastigotas que rapidamente se diferenciam nas formas promastigotas (55–59) e tais formas se diferenciam, metaciclogênese, que consiste na diferenciação de promastigotas em promastigotas procíclicas, nectomonas, haptomonas e metacíclicas e essas diferenciações impactam na capacidade é devido a adaptação bioquímica do parasita no interior do vetor (60). O ciclo biológico do parasita no vetor e no mamífero está exemplificado na figura 1.3.

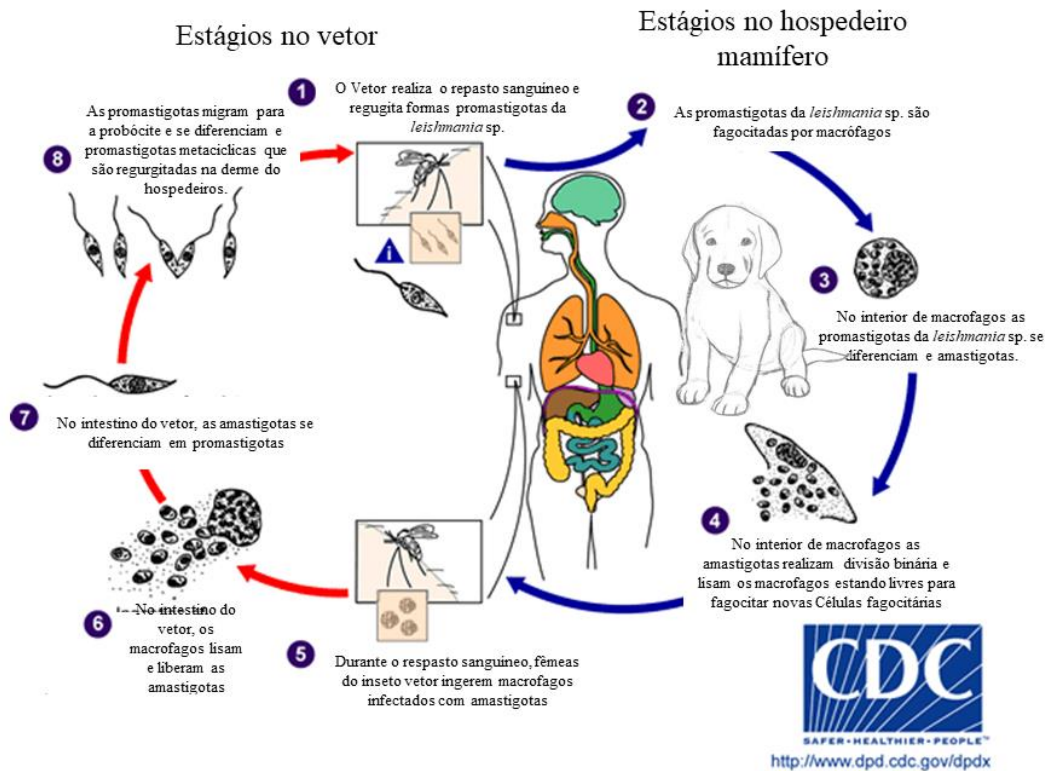


Figura 1.3- Esquema ilustrativo do ciclo biológico da *Leishmania sp.* no vetor e no hospedeiro mamífero. 1) Fêmeas do inseto vetor realizam o repasto sanguíneo para o amadurecimento do seu ciclo gonodotrófico e regurgitam as formas promastigotas metacíclicas na derme do mamífero. 2) As formas promastigotas são fagocitadas por células do sistema fagocitário. 3) As formas promastigotas no interior de macrófagos se diferenciam em amastigotas. 4) No interior dos macrófagos, as amastigotas realizam divisão binária e ocorre a lise dos macrófagos. 5) Ao realizarem repasto sanguíneo, fêmeas do inseto vetor ingerem macrófagos e demais células do sistema fagocitário infectados com as formas amastigotas. 6) Já no intestino do inseto vetor, as formas amastigotas são liberadas. 7) As formas amastigotas livres se diferenciam em promastigotas e iniciam processo de replicação. 8) As formas promastigotas migram para a porção anterior do estômago e proventrículo do inseto e amadurecem nas formas infectantes (promastigotas metacíclicas) que serão regurgitadas na derme do mamífero. Site: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/> com modificações.

1.4 Reservatório do parasita *Leishmania (L.) infantum* causadora das formas viscerais da Leishmaniose

Reservatórios são animais vertebrados capazes de manter o ciclo de vida do parasita e de participarem da transmissão do parasita ao vetor (39). Segundo Roque & Jansen (61), a classificação de um mamífero em um reservatório vai depender de 3 vias: 1) Fatores biológicos do mamífero, tais como espécies, coinfeções, comorbidades, sexo, idade e padrão comportamental; 2) Características relacionadas ao parasita: espécie infectante, forma infectante, tempo de geração, características bioquímicas e moleculares e tamanho do inóculo; por último, 3) Capacidade vetorial, que é a medida da infectividade e transmissibilidade entre o mamífero e o inseto vetor, a capacidade de propagar o parasita. A capacidade vetorial vai depender tanto das condições ambientais quanto da influência da presença do parasita no organismo do inseto vetor, que será discutido na sessão parasita-hospedeiro (61–63). O parasita *L. infantum* tem como hospedeiros diferentes mamíferos domésticos e selvagens, mas nem todos os hospedeiros atendem aos critérios de classificação como reservatórios.

Assim, quando observamos o ambiente rural, periurbano e urbano, temos o cão como mamífero considerado reservatório da *Leishmania. (L.) infantum.* (40,64,65), uma vez que este mamífero apresenta intensa carga parasitária na pele e no sangue e tem sido descrito na literatura a infecção do vetor através do repasto sanguíneo em cães tanto com baixa quanto com alta carga parasitária (66–68). Assim, pode-se observar que o cão, juntamente com o inseto vetor, pode estar associado ao processo de dispersão do parasita nos ambientes rurais, periurbanos e urbanos. Além disso, o número de casos canino precede o número de casos humanos, inferindo o papel do cão como reservatório do parasita nestes ambientes (69).

Apesar da associação entre os casos humanos e caninos de Leishmaniose visceral, muitos dados ainda são controversos, gerando uma discussão sobre papel do cão como reservatório. Desta forma, Rocha e colaboradores (70) descreveram momentos diferentes entre os casos de Leishmaniose visceral em humanos e cães: no período de 2007-2012 em Alagoas-Nordeste do Brasil, houve maior índice de casos caninos e no período entre 2011-2013 houve maior número de casos humanos quando comparados com casos caninos. A intercessão entre os casos aconteceu em 2011 quando o número de casos caninos era menor e o número de casos humanos era maior. Estes dados corroboram para fortificar as vias de classificação do cão como possível reservatório. Além

disso, esse estudo ressalta a importância da vigilância epidemiológica, para que sejam direcionadas melhores propostas e ferramentas, para o controle tanto do reservatório quanto do vetor, que tem sido negligenciado. (32). Para o controle do reservatório, os centros de zoonoses são responsáveis pela investigação de casos, principalmente em regiões endêmicas para a Leishmaniose visceral e a remoção dos reservatórios positivos para a infecção por *L. (L.) infantum* (65).

A eutanásia de cães infectados com *L. (L.) infantum* tem sido questionada, uma vez que a remoção somente do reservatório não tem demonstrado dados satisfatórios que permitam o controle dos casos humanos (65,71,72). Isso é em parte devido ao tempo longo entre o diagnóstico e a eutanásia do animal. Além disso, temos que levar em consideração que o controle do vetor é uma tarefa extremamente difícil, o que contribui para a manutenção da circulação do parasita. Assim, a eutanásia como medida de controle isolada tem sido revisada, por apresentarem efeitos controversos na redução de casos e devido a ligação afetiva entre os tutores e seus cães domésticos, que muitas vezes fornecem suporte emocional. Ademais, a remoção do animal infectado é normalmente acompanhada pela inserção de um novo animal no ambiente, comumente jovem e mais suscetível (73,74). Tal comportamento fortifica a necessidade de somar medidas de controle do vetor às medidas de controle do reservatório, que devem ser mais ágeis e eficientes, e educação da população frente ao combate das Leishmanioses.

1.5 Leishmaniose visceral

A Leishmaniose visceral é caracterizada pelo acometimento múltiplo de órgãos como cérebro, intestino, rins, linfonodo, baço e fígado (9,55,59,75–77). No novo mundo, a *L. (L.) infantum* é o principal agente etiológico da Leishmaniose visceral e tem o cão como animal reservatório desta espécie no ambiente urbano (67).

1.5.1 Leishmaniose visceral canina

A Leishmaniose visceral canina é caracterizada pelo acometimento de diversos órgãos levando a sinais clínicos variados. Os principais sinais clínicos observados são: onicogribose, lesão ocular, dermatite, emagrecimento, ceratoconjuntivite, linfadenopatia, esplenomegalia e

hepatomegalia (55,77–79). Apesar da descrição desses sinais clínicos em infecções caninas experimentais (36,78), não é possível afirmar que estes sinais são resultantes da infecção pelo parasita em questão, porém, cães positivos para a infecção por *Leishmania. (L.) infantum* apresentam com grande frequência pelo menos um desses sinais clínicos (9,55,77).

O quadro clínico do animal é uma importante ferramenta visual que, ao ser somado aos parâmetros hematológicos e bioquímicos como exemplo, leucopenia, linfopenia, alterações de enzimas hepáticas, hipergamaglobulinemia, comprometimento dos progenitores mielóides e anemia (78,80–83) podem auxiliar no diagnóstico da Leishmaniose visceral canina. Além disso, os parâmetros hematológicos e bioquímicos podem ser usados para direcionar o tratamento e o prognóstico da doença, ou em casos de prognóstico desfavorável a aplicação da eutanásia (65,84,85).

Em cães naturalmente infectados com *Leishmania. (L.) infantum* tem sido descrito um quadro imunológico de resistência e susceptibilidade à infecção. No perfil de resistência à infecção é observada a atuação conjunta entre as respostas mediadas por linfócitos Th1 e Th2 com a prevalência da resposta Th1/Th17, linfócitos TCD4⁺ e expressão de citocinas como TNF- α , IFN- γ , IL-2 e RNAm de IL-17 (86–88). No entanto, no perfil de susceptibilidade à infecção é observado o predomínio da resposta imune mediada por linfócitos Th2 e com a expressão de citocinas como IL-5, IL-10, TGF- β (86–88). Vale destacar aqui que um cão com perfil de resistência à infecção pode evoluir para o perfil susceptível à infecção. Santana e colaboradores (77) descreveram que, em cães naturalmente infectados com *Leishmania. (L.) infantum*, o perfil de resistência à infecção é associado a presença do parasita na derme, mas não cultura parasitológica de aspirado do baço o que pode inferir controle da carga parasitária. Ao passo que no perfil de susceptibilidade à infecção foi observada a presença do parasita tanto na derme quanto na cultura parasitológica de aspirado do baço, indicando uma possível falha no controle da carga parasitária.

Em infecção natural canina com perfil susceptível tem sido descrito o quadro de imunossupressão da resposta imune celular mediada por linfócitos Th1 e predomínio da atividade de linfócitos Th2 (89). Este quadro de imunossupressão é marcado pela presença de granulomas contendo macrófagos e parasitas íntegros principalmente na pele, linfonodo e baço, além da descrição da apoptose de linfócitos T (89,90). A imunossupressão da resposta Th1 está associado ao aumento da resposta imune do perfil Th2 com a produção de citocinas imunoregulatórias, além

da produção de imunoglobulinas que não são eficazes na eliminação do parasita *Leishmania* favorecendo o quadro de falha no controle da carga parasitária e progressão da doença. Assim o animal resistente evolui para o perfil de susceptibilidade acarretando alterações histológicas variadas nos órgãos linfoides secundários, como linfonodo e baço caracterizando a progressão da doença (59,77,79,87,88,90).

1.5.2 Diagnóstico da Leishmaniose visceral canina (LVC)

Para o diagnóstico da LVC é recomendada a detecção de anticorpos contra parasitas (métodos imunológicos), a visualização do parasita (métodos parasitológicos), ou a detecção do material genético específico da *Leishmania* sp. em investigação (métodos moleculares) (91). As ferramentas de diagnóstico aplicadas no Brasil são: investigação da presença de anticorpos pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunofluorescência indireta (IFI), e cultura parasitológica ou diagnóstico citológico de biópsia e aspirado de baço, medula óssea ou linfonodo. Além disso, recentemente o Ministério da Saúde preconizou que seja feita uma triagem de casos, principalmente em áreas endêmicas, com teste cromatográfico sorológico rápido de plataforma dupla (DPP®) e a confirmação do resultado com o teste sorológico ELISA (16,92,93).

A LVC tem uma importante característica no seu perfil clínico, onde muitos animais apresentam forte resposta imune mediada por células, baixa carga parasitária e baixa produção de imunoglobulinas e tal fator pode influenciar no resultado do diagnóstico quando o mesmo for sorológico (83,94,95). Os testes sorológicos são produzidos a partir da utilização de antígenos brutos ou recombinantes de *Leishmania* sp. Nos testes compostos por antígenos recombinantes há a combinação de diferentes porções antigênicas em uma única recombinação e a sua utilização em testes sorológicos como ELISA e teste imunocromatográfico rápido (DPP® Biomanguinhos) aumenta a especificidade do teste, uma vez que é feito a partir da recombinação de diferentes proteínas do parasita *Leishmania (L.) infantum*. Atualmente tem sido utilizado o antígeno recombinante K28, feito a partir da recombinação das proteínas K9, K26 e K39 do complexo *Leishmania donovani* o que elevou a sensibilidade destes testes em cães (96–100).

Um importante ponto a ser ressaltado é o fato de que cães infectados com *Leishmania (L.) infantum* podem ser classificados em dois importantes grupos: cães com ausência de sinais

clínicos e cães com a presença de sinais clínicos. Em geral, animais assintomáticos apresentam baixa produção de imunoglobulinas e carga parasitária mais controlada (77,101). Por outro lado, animais sintomáticos frequentemente mostram alta produção de imunoglobulinas do tipo IgG (IgG1 e IgG2) e alta carga parasitária (95). Assim, para a aplicação dos testes sorológicos deve-se levar em consideração o quadro clínico deste animal, uma vez que animais assintomáticos podem apresentar resultados falso-negativos aos testes sorológicos. A sensibilidade destes testes varia de 50-80% (94,102,103) nestes animais. Uma importante forma de complementar o diagnóstico sorológico é aplicação de métodos parasitológicos para o diagnóstico da LVC.

Desta forma, a cultura parasitológica é considerada um padrão ouro para diagnóstico pelo Ministério da Saúde (24). Para a realização do diagnóstico de cultura parasitológica é necessária a coleta de material biológico do animal, como aspirado de linfonodo, baço, medula óssea ou swab de lesão. Após a coleta deste material, o mesmo é adicionado em tubos contendo meio sólido Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) e meio líquido Scheneider e condicionados em estufa de CO₂ à 26°C. Após um período entre 7 a 30 dias, é possível observar a presença das formas promastigotas na fase líquida do meio de cultivo.

Outro método parasitológico que pode ser utilizado no diagnóstico da LVC é o exame direto, no qual são observadas formas amastigotas em amostras clínicas obtidas de medula óssea, linfonodo e baço (91). As amostras clínicas são fixadas em lâminas de microscopia e coradas com corantes do tipo Romanowsky como giemsa, wright ou panótico rápido. Neste, é possível observar amastigotas no interior de células do sistema fagocítico ou livres no meio extracelular devido ao rompimento de macrófagos infectados (91,92). Vale ressaltar que a carga parasitária nestes órgãos pode ser muito variável influenciando no resultado do teste e tornando o diagnóstico da LVC um desafio (97,104), uma vez que, independente da carga parasitária nos órgãos linfoides, os cães podem apresentar as formas amastigotas na derme e assim serem fontes de infecção ao inseto vetor (68).

As ferramentas moleculares têm sido aplicadas para o diagnóstico da LVC com o objetivo de investigar a presença de material genético da *L. (L.) infantum* em amostras biológicas. Os alvos mais aplicados no diagnóstico baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR) são DNA de cinetoplasto (kDNA), espaço interno transcrito -1 (ITS-1), proteína de shock térmico (HSP-70) para PCR convencional. Também é utilizado o gene que codifica a proteína da pequena subunidade

ribossomal (ssuRNA) de *L. (L.) infantum* para amplificação e quantificação por PCR em tempo real do (10,52,53, 102).

1.5.3 Tratamento da Leishmaniose visceral canina

No Brasil, a aplicação de fármacos para o tratamento da Leishmaniose visceral canina foi liberada recentemente (64), podendo-se destacar dois fármacos, miltefosina e alopurino, que são administrados em conjunto para o tratamento da Leishmaniose visceral canina. No velho mundo a miltefosina tem sido administrada para tratamento de cães com infecção comprovada (64,105–107).

Apesar do fármaco em questão estar sendo aplicado no tratamento da Leishmaniose visceral canina, ainda pouco se sabe sobre o efeito da miltefosina sobre o parasita. Estudos usando a espécie *Leishmania (L.) donovani* indicam que o fármaco miltefosina induz a quebra da homeostase do fluxo de cálcio (108), resultando na alcalinização de organelas do parasita. Além disso, a miltefosina tem efeito inibitório na síntese de lipídeos em parasitas da ordem Kinetoplastida. Assim, a miltefosina juntamente com alopurinol tem efeito alquil-lisofosfolípídeo interferindo na ação da enzima citocromo C oxidase em mitocôndrias do parasita, resultando na redução da produção de oxigênio e níveis de adenosina trifosfato (ATP) levando o parasita a morte por apoptose (108–110).

Nogueira e colaboradores (64) descreveram a remissão dos sinais clínicos de cães naturalmente infectados com *L. (L.) infantum* em São Paulo-Brasil após 60 dias do tratamento com miltefosina, no entanto, após 90 dias de tratamento, os animais ainda mantinham carga parasitária detectável apesar de apresentarem redução do potencial de infecção do vetor avaliado por xenodiagnóstico.

Embora esses dados sejam promissores, é importante destacar que o tratamento não elimina totalmente a presença do parasita e a recidiva é frequente, sendo necessário o acompanhamento periódico do animal e com a possibilidade de refazer o uso dos fármacos (109,111,112). Outro ponto importante de se destacar é que o tratamento é citotóxico e apresenta efeitos colaterais nocivos ao animal (109,113,114), além de ser caro e a doença ter predominância em regiões carentes fazendo com que haja a frequente interrupção do tratamento favorecendo o

surgimento de cepas resistentes (115,116). Tais fatores somados ao fato de que a miltefosina é aplicada no tratamento humano, levanta o debate da aplicação deste e de outros fármacos em tratamento canino, que só poderiam ser considerados eficazes quando fosse capaz de promover a eliminação total do parasita (109,117–119).

1.5.4 Vacinas para a Leishmaniose visceral canina

Existem 4 modelos de vacinas que foram liberadas como medida preventiva contra a Leishmaniose visceral canina: a Leishmune®, CaniLeish®, LeishTec® e Letifend®(120). Destas, as vacinas CaniLeish® e Letifend® são utilizadas na Europa, Argentina e Paraguai. Já a LeishTec® é aplicada no Brasil. A Leishmune®, que era aplicada no Brasil, foi retirada de comercialização (120,121), pois não atendeu todos os critérios de eficácia segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e retornou para a fase III de estudo. Além disso, não era possível diferenciar cães vacinados de cães infectados pelo teste ELISA o que gerava resultados falso positivos e a remoção equivocada e desnecessária de animais (93,122). Assim, a vacina comercializada no Brasil tem sido a LeishTec®, sendo aplicada em 3 doses com intervalo de 21 dias e sua taxa de proteção é de aproximadamente 71% e apresenta baixa taxa de reação cruzada com o ELISA (122).

Existe uma ampla discussão entre a eficácia, eficiência e taxa de soroconversão entre a Leishmune® e LeishTec® (93,99,123). Porém, é importante destacar que a *Leishmania* sp. é um parasita intracelular obrigatório e que a resposta humoral, ou seja, baseada na produção de anticorpos não é o ideal, uma vez que, os anticorpos não atuam no interior da célula infectada, mas sim na neutralização do parasita livre no ambiente extracelular (124–129). Desta forma, espera-se de uma vacina que ela seja composta por epítomos imunogênicos capazes de induzir uma resposta celular contra o parasita *Leishmania* sp.

1.6 Interação parasita-hospedeiro

1.6.1 Acometimento dos órgãos e interação parasita-hospedeiro

A possibilidade do estudo da infecção natural canina tem permitido o entendimento dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na interação parasita-hospedeiro em diferentes órgãos bem como o impacto desta interação no microambiente tecidual (9,10,55,59,130–132). O parasita pode induzir modificações neste microambiente, como exemplo o remodelamento da matriz extracelular que permite a livre circulação de células importantes para o desenvolvimento da resposta imunológica frente ao parasita *Leishmania (L.) infantum* (133). O remodelamento da matriz extracelular durante um processo infeccioso pode originar diferentes produtos da degradação dos seus componentes estruturais através de ação enzimática. Os segmentos interconectados (ICS) são exemplos de produtos da degradação de fibronectina da matriz extracelular, e podem intensificar o processo de fagocitose de *Leishmania* spp. por macrófagos, uma vez que ligam-se na superfície do parasita que assim são reconhecidos aumentando o potencial de fagocitose (134). Vale ressaltar também, que esses fragmentos de fibronectina, degradados pela metaloprotease GP63 inibem a atividade microbicida mediada pela produção de espécies reativas de oxigênio pelos macrófagos, favorecendo a sobrevivência do parasita nestas células (135,136).

Desta forma é possível observar a importância dos estudos imunopatológicos envolvidos na interação parasita-hospedeiro levando em consideração a interação do parasita com a matriz extracelular do tecido infectado uma vez que é neste ambiente em que será organizada a resposta imunológica frente ao parasita (137–139).

1.6.2 Interação parasitária com mecanismos imunológicos na derme e migração para os órgãos linfóides secundários

A junção dermo-epidérmica consiste no sítio de infecção e nela ocorre a primeira linha de defesa contra a *Leishmania* sp (140). A resposta imune inata é iniciada na pele e conta com a ação de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos residentes, células dendríticas resistentes, citocinas e sistema complemento (48,139,141). Assim, as espécies viscerotrópicas apresentam mecanismos de evasão para vencer esta primeira linha de resposta imune (25). A pele é o maior sistema/órgão do corpo de mamíferos e recobre todo o sistema corpóreo. A pele protege o organismo da perda de água, diversos traumas como físicos e químicos, além de proteger contra a infecção por diferentes microrganismos como bactérias e fungos que vivem na microbiota cutânea e contra patógenos que

são inoculados diretamente nas camadas internas da pele, como os patógenos transmitidos por vetores (142,143).

A pele é subdividida em 2 camadas, a epiderme e a derme (142). A epiderme é a camada mais superficial da pele. Nela, é possível observar a presença de queratinócitos, melanócitos, células de Merkel e células de Langerhans (144). Já a derme, é formada por tecido conjuntivo colágeno denso não modelado, colonizado por diferentes células, dentre elas destacam-se principalmente fibrócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos T ativados (142). A derme acomoda toda a parte fluída fechada da pele, tais como os vasos sanguíneos e linfáticos (142–144).

Durante o repasto sanguíneo, o *Lutzomyia longipalpis* regurgita na junção dermo-epidérmica as formas promastigotas metacíclicas da *Leishmania. (L.) infantum* juntamente com diversas proteínas, incluindo a proteína salivar maxidilan que atua como vasodilatadora, auxiliando no aumento do fluxo sanguíneo na região de repasto, auxilia nos mecanismos de evasão do parasita (145–147). Em modelo murino de infecção experimental com *L. (L.) major* e saliva do vetor houve uma resposta exacerbada quando comparado a infecções na ausência da saliva (146–148).

A interação do parasita com as proteínas da matriz extracelular somada ao processo de vasodilatação contribuem para a entrada de importantes componentes da resposta imune inata, como as proteínas do complemento (149), que podem recobrir toda a membrana das formas promastigotas metacíclicas lisando o parasita através da formação de poros devido a deposição de proteínas solúveis que formam o complexo de ataque a membrana (MAC). Porém, devido a mecanismo de evasão, os parasitas do gênero *Leishmania* conseguem neutralizar o sistema complemento a partir da expressão das proteínas transmembranares lipofosfoglicana (LPG) e metalopeptidase GP63 (142,150–152). Em cultura experimental usando soro humano e *Leishmania* sp. e na ausência dessas proteínas, as leishmanias são mais susceptíveis a lise pelo sistema complemento (142,150–152).

Em contrapartida, o produto da ação enzimática do complemento e a própria maxidilan recrutam fagócitos importantes para o sítio de infecção, como neutrófilos que fagocitam as formas promastigotas (153,154). Além da fagocitose, neutrófilos emitem redes de DNA, as NETs, contendo proteínas como histonas, elastinas e grânulos tóxicos que recobrem as leishmanias levando a contenção e lise dos parasitas. Este processo de morte é conhecido como NETose e é um importante mecanismo da resposta imune inata (155–158). No entanto, neutrófilos isolados de cães

naturalmente infectados com *L. (L.) infantum*, mostraram menor habilidade em controlar o parasita *in vitro* quando comparados com neutrófilos que foram isolados de animais não infectados. Produtos da interação entre a *Leishmania* sp. e neutrófilos como a expressão da proteína inflamatória de macrófago (MIP-1 β) e por corpos apoptóticos de neutrófilos são capazes de recrutar macrófagos (46). A interação entre *Leishmania* sp. e macrófagos se dá através da ligação dos receptores de complemento como CR1, MAC-1, receptor de fibronectina e receptor de manose com seus alvos presentes na superfície das *Leishmania* sp. (46,159) o que pode levar a ativação da ação microbicida de macrófagos.

Muitos fatores ativam os macrófagos, tais como INF- γ e TNF- α , além de outras citocinas (128,160,161) que somadas, ativam a função microbicida de macrófagos, mediada pela produção de intermediários reativos de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) através da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (156,162,163). Macrófagos exibem dois importantes perfis funcionais, são eles macrófagos M1 e M2. Em infecção por *Leishmania* sp. o perfil de resistência está associado à presença de macrófagos do perfil M1 na presença de citocinas como de IL-2, IL-12, IFN- γ , onde estes macrófagos irão ter a produção de óxido nítrico a partir da expressão e ativação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) que catalizará a transformação da arginina em óxido nítrico. Por outro lado, em presença de citocinas como IL-4 e IL-13, TGF- β e IL-10, macrófagos são ativados através da via alternativa e assim são polarizados em perfil M2 e tem a conversão de arginina em poliaminas através da catalização da enzima arginase. (163,164, 165,166) no interior dos macrófagos e essa ativação está associada ao perfil de susceptibilidade à infecção, uma vez que o produto da reação pela arginase não é eficaz contra o parasita intracelular favorecendo assim seu crescimento no interior dos macrófagos(166).

Dentre os mecanismos imunológicos de interação com o patógeno, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas desempenham papel fundamental na fagocitose e eliminação do parasita (46). No entanto, células dendríticas são fundamentais para a ativação de diversos mecanismos, inclusive da atividade microbicida em macrófagos (46,49,167). As células dendríticas apresentam pelo menos 3 subtipos, e na derme, as células de Langerhans (MHC II^{high}, CD11c⁺, CD11b^{low}, CD8 α ^{inter}, CD205^{high}, and Langerin⁺) são exemplos de células dendríticas e migram para os órgãos linfoides secundários onde irão ativar a resposta imune adaptativa juntamente com outros fatores (46).

As células dendríticas apresentam um papel peculiar quando comparados aos demais fagócitos, por exemplo, elas capturam as leishmanias na derme, processando-as e transportando-as para os órgãos linfoides secundários (164). Outro importante papel das células dendríticas dérmicas é a ativação dos linfócitos T CD4⁺ efetores presentes na derme e T CD4⁺ naive nos órgãos linfoides (46,168–170).

No timo, as células dendríticas apresentam epítomos próprios durante a maturação dos linfócitos T (171). Já nos órgãos linfoides secundários, as subpopulações de células dendríticas como células de Langerhans migrantes da derme apresentam epítomos de *Leishmania. (L.) major* para linfócitos T CD4⁺ ativando suas funções efectoras (46). Já as células dendríticas foliculares apresentam antígenos aos linfócitos B ativando-os (46). As células dendríticas da derme e macrófagos fagocitam as leishmanias que foram regurgitadas na derme e migram em direção aos órgãos linfoides. Ao chegarem nos órgãos linfoides, esses fagócitos iniciam o desenvolvimento da resposta imune adaptativa mediada por células (46,174,175).

1.6.3 Colonização dos órgãos linfoides

Após deixar a derme, os fagócitos migram em direção aos órgãos linfoides secundários para apresentar os antígenos aos linfócitos T e B e assim ativar o desenvolvimento da resposta imune adaptativa (173,174). Todo esse trânsito celular é coordenado por gradiente quimiotático que se concentra em torno dos vasos linfáticos e sanguíneos ainda na derme (175,176). Fagócitos infectados que entram na circulação linfática colonizam os linfonodos, ao passo que fagócitos infectados que entram nos vasos sanguíneos ganham a circulação sistêmica do hospedeiro, chegando inclusive no baço, local de resposta aos patógenos carregados pelo sangue (177–180).

Tanto linfonodos quanto o baço são órgãos linfoides secundários e apresentam tipos celulares com fenótipos semelhantes, por exemplo, ambos os órgãos linfoides abrigam linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, linfócitos B (55), diferentes fenótipos de macrófagos e células dendríticas que são agrupados em duas regiões distintas e atuam juntamente no desenvolvimento da resposta imune adaptativa (181–184).

Em órgãos linfoides secundários, fagócitos infectados migram em direção as compartimentalizações de linfócitos T e B de forma orientada através de gradiente quimiotático

(185) presente no interior de canais conhecidos por conduites (186). O sistema de conduites é composto por uma rede de canais constituída por proteínas da matriz extracelular como laminina tipo V, colágeno tipo I, III e IV (187,188) e outras proteínas não estruturais. Este canal é envolvido por células que expressam essas proteínas constitutivamente, os fibroblastos reticulares (186).

Desta forma, os fagócitos ou demais células que entram nos órgãos linfoides migram através da captura de quimiocinas presentes entre os tipos de colágenos que constituem o lúmen dos conduites e assim chegam nas regiões de segregação de linfócitos e iniciam o processo de interação fagócito infectado-células da resposta imune adaptativa (175,186,189). Na figura 1.6.3 é mostrada a presença de amastigotas no linfonodo e no baço.

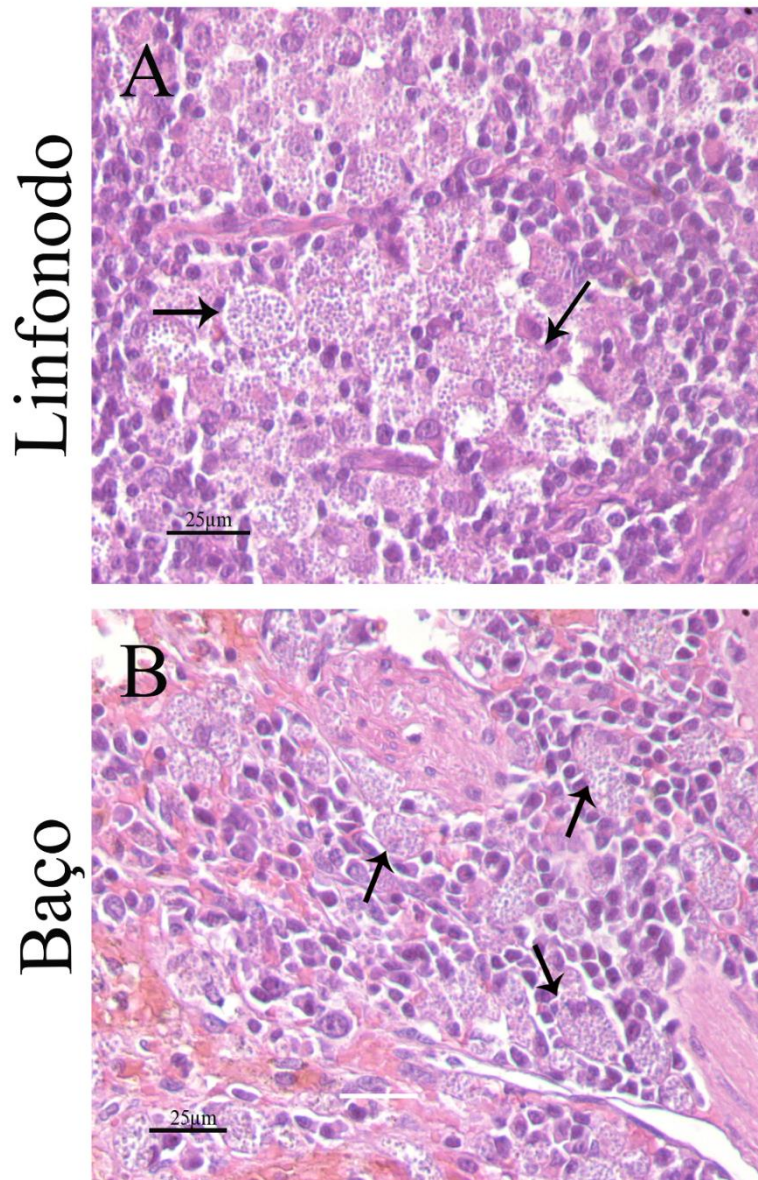


Figura 1.6.3- Representação de amastigotas de *Leishmania (L.) infantum* no baço e linfonodo de cães naturalmente infectados. Microscopia de luz em tecido parafinado e corado com hematoxilina e eosina. As setas indicam a presença de ninhos de amastigotas no A) linfonodo e B) no baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) infantum*. Aumento de 25 µm e objetiva de 40x. Arquivo pessoal.

1.6.4 Impacto da *Leishmania (L.) infantum* no microambiente Tímico

Os órgãos linfoides são classificados em órgãos linfoides primários ou centrais e órgãos linfoides secundários ou periféricos. A medula óssea e o timo são exemplos de órgãos linfoides geradores uma vez que neste órgão é realizado a maturação dos linfócitos T que irão colonizar o baço e linfonodos que são exemplos de órgãos linfoides secundários (184). A medula óssea é o sítio de geração dos progenitores de linfócitos T, que deixarão a medula em direção ao timo. Assim, o timo é o principal sítio de aturação dos linfócitos T do tipo CD4 e do tipo CD8. Diferentes patógenos apresentam elevada capacidade disseminatória podendo alcançar os órgãos linfoides primários e assim influenciar na função do órgão, dentre eles o timo e esse impacto funcional poderá na composição celular dos órgãos linfoides periféricos ditando o perfil de resistência e susceptibilidade à infecção (56,138,174,190–193).

O timo é um órgão bilobulado localizado na região anterior a cavidade torácica (184). Quanto a sua estrutura e forma, ele não diferencia em grande aspecto entre as espécies de mamíferos, além disso, sua principal função é compartilhada entre os mamíferos. O timo é revestido pelo tecido conjuntivo, formando a capsula. Seu interior é compartimentalizado em 3 regiões distintas entre si quanto a composição celular e a organização destas células(194) (Figura 1.6.4). Assim, o microambiente tímico é dividido em região córtex, junção córtex-medular e região medular, onde cada região irá fornecer estímulos quimiotáticos para a migração no interior do microambiente tímico, bem como estímulos para os eventos de rearranjo gênico, maturação e comprometimento com as linhagens do tipo CD4⁺ ou CD8⁺ (190).

Os compartimentos tímicos são sustentados por uma estrutura altamente dinâmica e composta por interações proteicas, que juntas, formam o arcabouço estrutural do microambiente tímico. Essa estrutura altamente dinâmica é a matrix extracelular, que além de fornecer o sustento estrutural do órgão, atua também na distribuição das moléculas sinalizadoras que são secretadas no ambiente extracelular tímico e que sinalizam diversas funções, como por exemplo, as quimiocinas que são necessárias para a induzir a migração dos precursores de linfócitos T através do estroma tímico(171).

A matriz extracelular tímica não tem sido explorada em sua composição e combinação bioquímica, assim, muitos estudos descrevem a organização celular funcional bem como

acominação destas células com produtos sinalizadores. Porém, o microambiente da matriz extracelular desempenha papel fundamental na comunicação e na mediação célula-célula e célula-fator sinalizatório. Poucas proteínas da matriz extracelular tímica têm sido descritas, tais como fibronectina que são glicoproteínas que atuam nos estímulos migratórios e são expressas por células epiteliais tímicas (TEC), células reticulares tímicas (CRT) e fibroblastos (195,196). A laminina é outra glicoproteína que compõe a matriz extracelular tímica e auxilia no processo migratório, ela está presente no timo através das isoformas laminina-1, 2 e 5 que são expressas principalmente pelas TEC e que exercem papel fundamental na interação timócitos e células epiteliais do microambiente tímico (196–198). Além da laminina, o colágeno tipo IV também auxilia no transito migratório dos timócitos e são expressos pelas células epiteliais tímicas (196).

A interação bioquímica entre laminina e colágeno IV tem sido descrito nos órgãos linfoides secundário formando estruturas semelhantes a canais, sistema de condutas que atuam na distribuição de quimionas e pequenas proteínas por todo o estroma e essa estrutura é mantida através de fibroblastos reticulares ER-TR7⁺ (186). A principal composição destes canais é por proteínas da matriz extracelular como laminina e colágeno e este sistema já foi descrito no microambiente tímico, exemplificando que a matriz extracelular e sua constituição exercem papel fundamental na mediação do transito migratório bem como na timopoíese (199). A migração celular de timócitos por todo o microambiente tímico é mediado por interações entre as glicoproteínas e por seus respectivos receptores, como por exemplo as integrinas expressas nas membranas celulares. Assim, a matriz extracelular exerce importante papel na comunicação entre timócitos e células do microambiente tímico, atuando nos estágios da timopoíese.

A timopoíese consiste nos eventos de maturação do timócitos em linfócitos T maduros, ou seja, comprometidos com a linhagem de linfócitos T CD4⁺ ou T CD8⁺ que deixarão o microambiente tímico em direção aos diferentes órgãos do sistema, dentre eles os linfonodos e o baço. Os eventos de timopoíese ocorrem quando progenitores de linfócitos T derivados da medula óssea entram no timo através da região córtico-medular. Este progenitor de linfócitos T não apresentam a expressão dos receptores de linfócitos T (TCR) e nem são comprometidos com a linhagem CD4 ou CD8, porém, durante os estágios da timopoíese ocorrerá os rearranjos gênicos necessários para a expressão do TCR e o comprometimento das linhagens em CD4 ou CD8 (200). Brevemente, Savino (2006) resume a timopoíese em duas etapas: Etapa da seleção negativa ocorre

na região do córtex, onde timócitos imaturos $\text{TCR}^- \text{CD4}^- \text{CD8}^-$ recebem estímulos para que haja o rearranjo gênico da cadeia β e α , passando a serem timócitos imaturos $\text{TCR}^{\text{low}} \text{CD4}^- \text{CD8}^-$. Nesta etapa, timócitos interagem com células dendríticas que apresentam antígenos próprios aos timócitos onde timócitos que reconhecerem esses antígenos próprios com forte avides sofrem indução de apoptose, uma vez que podem reconhecer antígenos próprios. A segunda etapa sumarizada por Savino (2006) (200) consiste na seleção positivas, que acontece na região medular, onde timócitos imaturos $\text{TCR}^{\text{low}} \text{CD4}^+ \text{CD8}^+$ se comprometem com a linhagem CD4^+ ou CD8^+ . Ao final da timopoiése, os timócitos T apresentam o genótipo $\text{TCR}^{\text{High}} \text{CD3}^+ \text{CD4}^+ \text{CD8}^-$ ou $\text{TCR}^{\text{High}} \text{CD3}^+ \text{CD4}^- \text{CD8}^+$.

A timopoiése é altamente regulada por células endoteliais, células dendríticas, citocinas e quimiocinas, além disso, pode-se destacar aqui o papel crucial dos elementos bioquímicos da matriz extracelular (200). O evento de migração associados as interações bioquímicas entre proteínas no microambiente tímico são coordenadas pela interação entre a laminina e integrinas e essa interação promovem estímulos de migração no interior do microambiente rumo a região de córtex e assim promovem a interação entre os timócitos com células dendríticas, células do complexo nourse, macrófagos e fibroblastos. Ao passo que a presença de fibronectina, galectina-3 podem estar associados ao processo de migração na região medular promovendo a interação dos timócitos com células dendríticas, células do complexo nourse e fibroblastos e assim estimulando os estágios finais da maturação dos timócitos bem como na indução dos eventos de saídas do timócitos maturos do microambiente tímico(201).

Assim, é possível observar a importância da composição e preservação dos compartimentos do timo, uma vez que cada região conta com um microambiente, celularidade específica e componentes quimiotáticos específicos (200). Além disso, para a maturação de linfócitos T, sejam eles CD4 ou CD8 , é necessária a interação tanto dos precursores de linfócitos T com as proteínas da matriz extracelular, como também dos precursores com as células que colonizam o timo, como por exemplo, fibroblastos, responsáveis por secretar as proteínas da matriz extracelular, e células dendríticas que expressam todos os epítomos via complexo principal de histocompatibilidade (MCH I ou II) contribuindo para o processo de seleção positiva e negativa (190,194,202,203).

Existem poucos estudos sobre o impacto da *L. (L.) infantum* sobre a microarquitetura do timo e o impacto desta infecção na timopoíese. Em cães naturalmente infectados com *L. (L.) infantum*, tem sido descrita a presença do parasita no tecido tímico e em outros órgãos, como pele, linfonodo e baço (9,10,55,130,204). Da silva e colaboradores (56), descreveram o aumento na deposição de fibronectina em timo de cães sintomáticos quando comparado aos animais assintomáticos. Além disso, foram observadas alterações histopatológicas caracterizadas pela presença de infiltrado inflamatório crônico granulomatoso e piogranulomatoso.

Em contrapartida aos estudos de infecção natural com *Leishmania. (L.) infantum*, em infecção experimental com *Trypanosoma cruzi*, foram descritas a atrofia do microambiente tímico e a depleção de timócitos duplo positivos em associação com a redução de IL-2 e aumento de IL-10 e INF- γ (205). Alterações semelhantes foram observadas em modelos de infecção com outros agentes etiológicos, como por exemplo *Schistosoma mansoni* e *Trichinella spiralis* em modelo murino (206,207). Nas infecções por *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium berghei* foi observada redução de timócitos associada a morte por apoptose (200).

O estudo da infecção de cães naturalmente infectados permite avaliar a resposta imunológica em função de coinfeções e comorbidades, como por exemplo a desnutrição, que afeta o perfil imunológico do hospedeiro frente a infecção, induzindo quadro de imunossupressão (208). Em modelo murino de desnutrição proteica e em infecção por *Leishmania. (L.) infantum*, foi observada a depleção de linfócitos T CD4⁺ CD8⁺ associado à morte por apoptose e desorganização da microarquitetura tímica. Além disso, ao avaliar os mecanismos migratórios, observou-se que a infecção afeta a expressão de importantes moléculas quimiotáticas, como por exemplo, as quimiocinas CXCL12, CXCL9 e CXCL10.

Losada-Barragan e colaboradores (26) observaram a redução do tamanho do timo de camundongos em infecção com *Leishmania. (L.) infantum* e o comprometimento das compartimentalizações e microambiente estrutural do mesmo (26). Assim, é possível que a presença e interação do parasita com o microambiente tímico resulte em mudanças estruturais associadas à um comprometimento funcional deste órgão, como por exemplo a timopoíese e a liberação de linfócitos imaturos para colonizar os demais órgãos, como o baço e linfonodo.

Assim, o timo e seu microambiente tem papel central na maturação dos linfócitos T (209–212) que são células chaves para o desencadeamento da resposta imune celular em diferentes órgãos

como o baço, por exemplo (213–215). Os produtos do timo são fundamentais ao longo da vida do animal. Após entrar nos órgãos linfoides, os linfócitos T CD4⁺, oriundos do timo, irão se diferenciar em uma diversidade fenotípica dependendo dos estímulos recebidos. O linfócito T CD4⁺ helper 1 (Th1) é estimulado na presença das citocinas IL-12 e IFN- γ ; enquanto linfócito T CD4⁺ helper 2 (Th2) em presença das citocinas IL-4 e TGF- β ; o linfócito T helper 17 (Th17) na presença das citocinas IL-1, IL-6, IL-23 e TGF- β e os linfócitos T reguladores (Tregs) na presença das citocinas TGF- β e IL-2(217). Assim, linfócitos Th1 atuam na ativação efetora das células apresentadoras de antígenos, além de induzir a ativação de linfócitos T CD8⁺ citotóxico (218). Por outro lado, linfócitos Th2 secretam citocinas que estimulam a sobrevivência de linfócitos B que irão se diferenciar em plasmócitos e secretar classes de imunoglobulinas como IgM, IgD, IgE, IgA e isotipos de IgG (216,217,219).

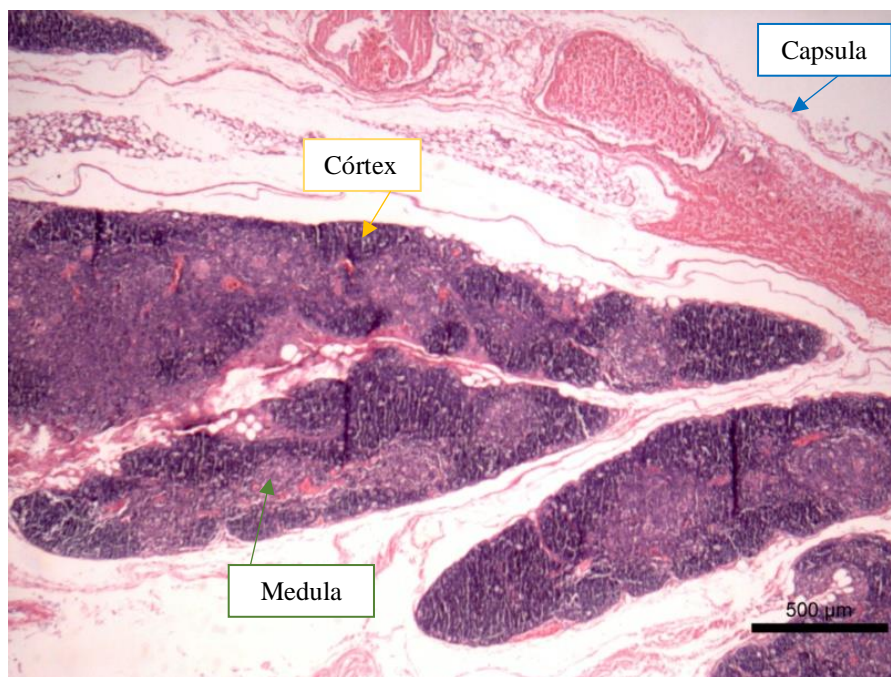


Figura 1.6.4- Histologia do timo. Corte histológico do timo corado com hematoxilina e eosina em aumento de 500 μ m. Através da coloração por hematoxilina e eosina podemos delimitar a região córtex que apresenta coloração mais escura. Além da região córtex, a região medular é a região mais interna do timo, tendo coloração mais clara devido a diversidade celular neste local. A região da capsula reveste os lóbulos do timo.

1.7 Acometimento do tecido esplênico

1.7.1 Anatomia e composição do tecido esplênico

Antes de se discutir o impacto da presença da *Leishmania. (L.) infantum* no baço é importante entender sua função e microambiente. O baço, juntamente com linfonodo e amídalas, forma a rede linfóide secundária que defende o organismo do hospedeiro contra agentes infecciosos oriundos do sangue e da linfa (183,184,220,221). O baço está localizado na região hipogástrica abdominal e apresenta coloração entre o tom vermelho vivo ou violáceo ao tom roxo escuro, tendo também um formato alongado e curvilíneo. Sua consistência é maciça e isso confere certa fragilidade a este órgão. Exteriormente, o baço é envolto por uma cápsula formada de tecido conjuntivo que em certos pontos adentram pelo tecido em estruturas chamadas de trabéculas que são vascularizadas (183,184).

O baço é dividido em duas importantes estruturas, a polpa vermelha e a polpa branca (Figura 1.7.1). A polpa vermelha é uma região de transição e abriga os sinusóides que são ramificações fenestradas dos vasos sanguíneos, onde há a interação do sangue e tudo o que ele carrega, por exemplo imunocomplexos, com as células residentes e atuantes na apresentação antigênica e resposta imune adaptativa como as células dendríticas, linfócitos e macrófago (183). Além disso, a polpa vermelha também é colonizada por células que são mantenedoras do arcabouço

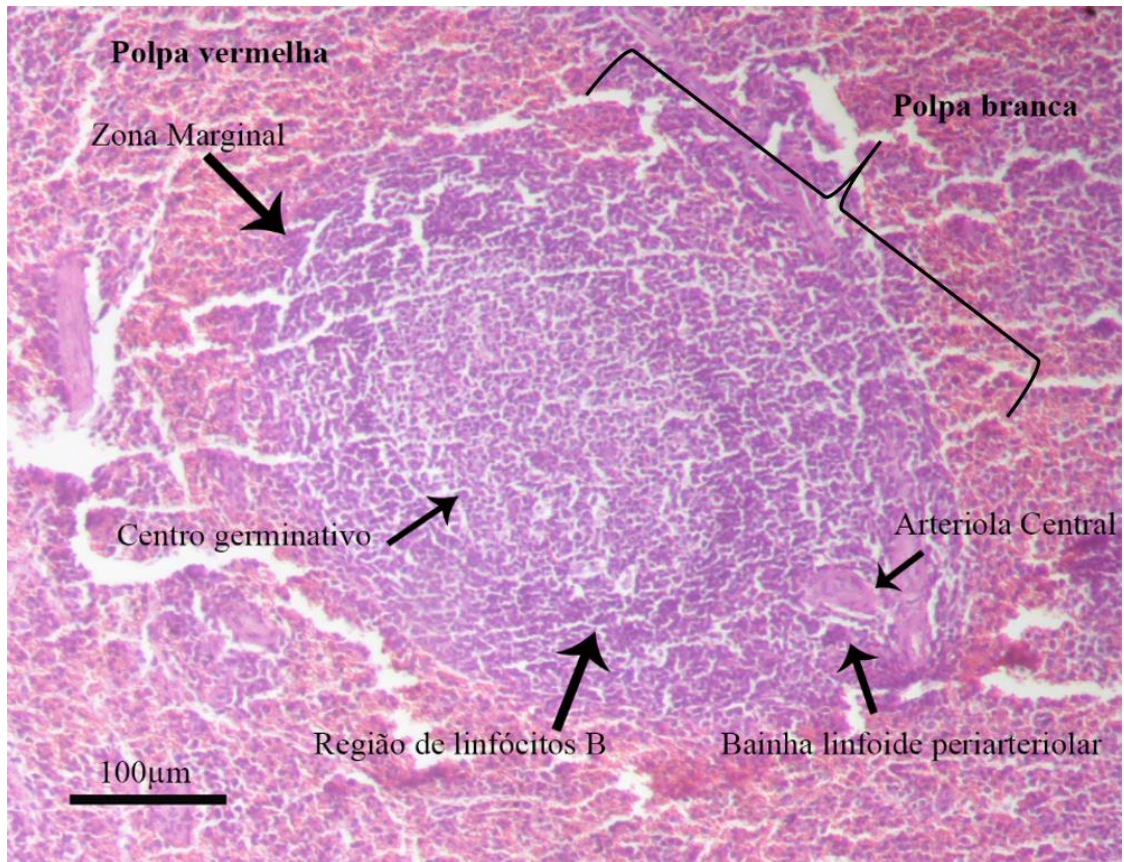


Figura 1.7.1- Compartimentalização do tecido esplênico. O baço é um órgão linfóide secundário formado por polpa branca constituída por bainha linfoide periarteriolar que envolve a arteriola central; folículo linfoide que é a região de linfócitos B e quando ativados formam o centro germinativo; e zona marginal. A polpa vermelha é constituída por sinusóides, conduítes e trabéculas formadas por tecido conjuntivo. Microscopia de luz. Coloração por hematoxilina e eosina. Aumento de 100µm. Objetiva de 10x. Imagem acervo pessoal. As setas indicam as regiões de compartimentalização da polpa branca esplênica como, zona marginal, região de linfócitos B, bainha linfoide periarteriolar, arteriola central e centro germinativo.

esplênico como por exemplo os fibroblastos e por células que auxiliam na contração como os miofibroblastos (220). A polpa vermelha é uma região de transição e contém elementos necessários para o suporte migracional dentro do microambiente esplênico que será detalhado mais adiante.

Outra importante estrutura do tecido esplênico é a polpa branca (Figura 1.7.1). Ela é composta por compartimentos que abrigam diferentes linhagens celulares. A zona marginal (Figura 1.7.1) é a compartimentalização mais externa da polpa branca, ela é o elemento de ligação entre a polpa branca e a polpa vermelha e é composta por células dendríticas, macrófagos da zona marginal

e alguns linfócitos T e B de transição. Nesta região ocorre a apresentação antigênica, ou seja, células apresentadoras de antígenos carregados pelo sangue apresentam seus epítomos antigênicos via interação MHC I/II para os TCR expressos em linfócitos T e B que estão localizados na zona marginal. Outra via de apresentação antigênica é a captura de antígenos de forma livre presente nos sinusóides pelas células dendríticas e macrófagos foliculares (183,184,222). Adjacente à zona marginal, existem duas outras importantes estruturas, a zona de linfócitos B (folículos linfoides) (Figura 1.7.1) que é formada basicamente por linfócitos B que quando ativados se diferenciam em plasmócitos formando uma região mais clara dentro do folículo, o centro germinativo (Figura 1.7.1). Por último, os linfócitos T estão localizados em volta da arteríola central dentro do folículo e formam a bainha periarteriolar de linfócitos T (183) (Figura 1.7.1).

Assim, é possível observar que a microarquitetura esplênica é altamente compartimentalizada e que a polpa branca é uma região que abriga pelo menos quatro tipos celulares chaves de forma organizada para a apresentação antigênica via interação MHC I/II e TCR e o desencadeamento da resposta imune adaptativa e humoral (223). Além disso, vale destacar que o tecido esplênico alberga o mais dinâmico microambiente de um órgão onde há a entrada e saída de múltiplas linhagens celulares e é um importante sítio de interação parasita-hospedeiro (222). Toda essa comunicação celular e seu resultado irá ditar como o hospedeiro se comportará frente a infecção. Desta forma, uma estrutura fundamental, a matriz extracelular esplênica, é a peça chave do microambiente esplênico, uma vez que ela mantém o arcabouço estrutural do baço que comporta as interações entre as células infectadas e as células do sistema imunológico hospedeiro, além de concentrar importantes moléculas sinalizadoras para a ativação das funções efetoras dos linfócitos e demais células atuantes na resposta imune mediada por células (55,183,220).

1.7.2 Matriz extracelular esplênica

A matriz extracelular esplênica é formada por uma ampla gama de proteínas secretadas por células estromais, principalmente os fibroblastos que sintetizam e secretam proteínas estruturais como laminina; elastinas, fibronectina; colágeno (principalmente tipos I, III, IV) e vitronectina que juntamente com as demais proteínas como tenacina, heparan sulfato e nidogênio combinam entre

si para formar a estrutura tridimensional do arcabouço esplênico (224). A matriz extracelular é constituída por componentes da membrana basal e da membrana intersticial.

A membrana basal é um componente funcional, estrutural e regulatório do órgão e vaso/capilares sanguíneos (183). Essa estrutura amorfa é formada principalmente pela combinação de laminina, colágeno tipo IV, nidogênio e proteoglicano de heparan sulfato (183). Estas proteínas são expressas por fibroblastos, células epiteliais, endoteliais e mesenquimais e sua principal função é separar o endotélio da matriz intersticial, além de criar uma ligação entre a matriz intersticial e as células endoteliais (189). A membrana basal tem como função a ancoragem do tecido endotelial com a matriz extracelular (225).

A membrana basal se assemelha a uma folha e essa morfologia é conferida devido as ligações entre seus componentes, onde as células endoteliais, expressando receptores de integrinas, ligam-se através dos mesmos com fibronectina e laminina em associação com colágeno do tipo IV, formando assim uma fina camada, a membrana basal (225). Vale destacar que a membrana basal é subdividida em lâmina lúcida e lâmina densa, e essas duas subdivisões são compostas por proteínas como laminina e fibronectina (lâmina lúcida) e colágeno IV (lâmina densa) e que fazem essa união entre o endotélio e o tecido conjuntivo. As proteínas da membrana lúcida se ligam ao colágeno tipo IV presente na lâmina densa. O colágeno da lâmina densa interage com as fibras reticulares do tipo III que se ligam às fibrilas e placas de ancoragem formadas por colágeno tipo IV e VII presentes na matriz intersticial, interligando o endotélio ao tecido conjuntivo da matriz extracelular. Assim, a matriz extracelular é composta pela membrana basal e matriz intersticial e ligam-se através da interação entre as glicoproteínas e proteínas de ancoragem, como o colágeno IV e VII presente na matriz intersticial do tecido conjuntivo (189,226,227).

O tecido conjuntivo do baço é fundamental para a comunicação e entrega de nutrientes para o tecido epitelial. O tecido conjuntivo é formado por proteínas, fibras elásticas e reticulares que conferem ao baço não somente a resistência motora e elasticidade ao tecido, mas também é o ambiente para a interação célula-célula (224). Este tecido é formado por colágeno do tipo I, III, IV e XI, glicoproteínas como tenacina e laminina, fibronectina, vitronectina e proteoglicanas como condroitina, dermatan e keratan sulfato que ligam-se entre si e formam uma rede tridimensional oca que é preenchida por células estromais, fibroblastos, linfócitos T e B, macrófagos, células dendríticas e também por estruturas vasculares como as artérias, arteríolas, vasos e sinusóides

fenestrados (183). Assim, o tecido conjuntivo esplênico é uma estrutura que abriga tanto a diversidade celular esplênica já descrita como também fornece suporte celular e funcional para a atividade do órgão.

Vale ressaltar aqui que a divisão da matriz extracelular em membrana basal e matriz intersticial não impede que sejam encontradas laminina, fibronectina, proteoglicanas e elastinas na matriz intersticial, uma vez que elas são proteínas estruturais da matriz extracelular como um todo e desempenham importante papel em diversas funções biológicas tanto da homeostase tecidual quanto na interação parasita-hospedeiro (228).

Ao se pensar nos mecanismos de comunicação celular bem como no desenvolvimento da resposta imune deve-se pensar prioritariamente no ambiente em que essas células estão inseridas. No tecido esplênico não seria diferente, uma vez que é necessário todo o aparato esplênico para a comunicação, entrega e ativação de funções bioquímicas mediadas por células, como por exemplo, a própria ativação celular via moléculas ativadoras como as citocinas (183). A matriz extracelular esplênica necessita ser insolúvel e realmente é, caso contrário todas as moléculas como citocinas e quimiocinas poderiam ser perdidas dentro da matriz extracelular e isso reduziria a comunicação celular e o desenvolvimento de diversas funções de renovação tecidual (224).

Além de promover a sustentação e preenchimento, a matriz extracelular esplênica promove a entrega e a passagem seletiva de moléculas sinalizadoras por todo o microambiente esplênico através de uma importante estrutura formada por suas proteínas estruturais (183). Essa estrutura é conhecida como conduíte e forma um amplo sistema de distribuição presente nos órgãos linfoides secundários, o sistema de conduítes (186,189,229). Este sistema é formado por diferentes proteínas da membrana basal, por exemplo a laminina, colágeno e heparan sulfato.

De uma forma geral, os conduítes são formados por 3 segmentos distintos entre si. O lúmen do conduíte é a região mais interna deste canal, e é formado por três tipos de colágenos, O colágeno tipo I que é o mais abundante, seguido pelo colágeno tipo III e colágeno tipo IV. Estes tipos de colágenos estão inseridos dentro de uma matriz amorfa, o segundo segmento constitucional do conduíte, composta por proteínas da membrana basal e outras proteínas que juntas desempenham a função de mediar o transporte por dentro deste sistema (186). Estes dois segmentos dos conduítes são envoltos por fibroblastos reticulares, que são exemplos de células estromais e secretam as principais proteínas da matriz extracelular (230). Sua principal ação dentro do sistema

de conduites é de realizar a manutenção proteica deste sistema (231). Na figura 1.7.2 está representado o sistema de conduites, revisado por Morgado e colaboradores (186).

Pouco se sabe sobre a plasticidade biológica do sistema de conduites, no entanto, tem sido descrito que este sistema é responsável por distribuir moléculas sinalizadoras por toda a matriz extracelular dos órgãos linfoides (175,188,189,199,231,232). Assim, o potencial de distribuição destas moléculas sinalizadoras por todo o microambiente linfóide não é ao acaso, mas sim através de um transporte ativo baseado na interação bioquímica entre as moléculas sinalizadoras a serem transportadas com proteínas residente neste sistema, como as proteínas associadas a vesículas plasmáticas (PLVAP) (233). Além disso, outra importante função dos conduites é mediar a comunicação entre os produtos dos órgãos linfoides com a periferia, como a pele. Um produto dos órgãos linfoides é a proteína cochlin que é secretada por células dendríticas foliculares (234). Assim, a proteína cochlin no ambiente extracelular que é capturada pelo colágeno tipo VII, presente na matriz extracelular, e entrega a proteína ao colágeno tipo IV, presente dentro do lúmen do conduite e assim, a cochlin deixa os órgãos linfoides em direção ao sítio de infecção podendo ativar então muitos macrófagos e neutrófilos durante uma infecção aguda (226).

A partir da entrada de células apresentadoras de antígenos infectadas no ambiente esplênico rumo a apresentação de epítomos antigênicos via MHC I/II, TCR e receptor de células B (BCR) na zona marginal da polpa branca e em alguns momentos na polpa vermelha devido aos linfócitos T e B de transição, ocorre a ativação efetora tanto das células apresentadoras de antígenos quanto dos próprios linfócitos que secretam nesse ambiente moléculas sinalizadoras, como citocinas (172). A matriz extracelular esplênica retém essas moléculas sinalizadoras no seu ambiente e impede que elas se percam, devido a interação das citocinas e fatores de crescimento com proteoglicanas presentes na matriz extracelular, permitindo a permanência das citocinas no ambiente e aumentando o tempo de interação entre os receptores celulares de citocinas com as próprias citocinas (235).

Um importante fator produzido durante o desenvolvimento da resposta imune são as enzimas degradadoras da matriz extracelular e isso ocorre a partir da necessidade do remodelamento desta matriz para que o microambiente possa receber e comportar as células apresentadoras de antígenos e linfócitos vindos do sítio de infecção. Além disso, durante o processo de resposta imune ocorre a angiogênese, mecanismo no qual há o aumento do número de vasos

sanguíneos permitindo o aumento do fluxo sanguíneo e com isso o aumento de fibroblastos, células estromais, células endoteliais e células sanguíneas no microambiente (186,236). Vale destacar que este mecanismo resulta no aumento do tamanho do órgão e a matriz extracelular precisa comportar todas essas alterações de forma a não desequilibrar a homeostase do tecido (237).

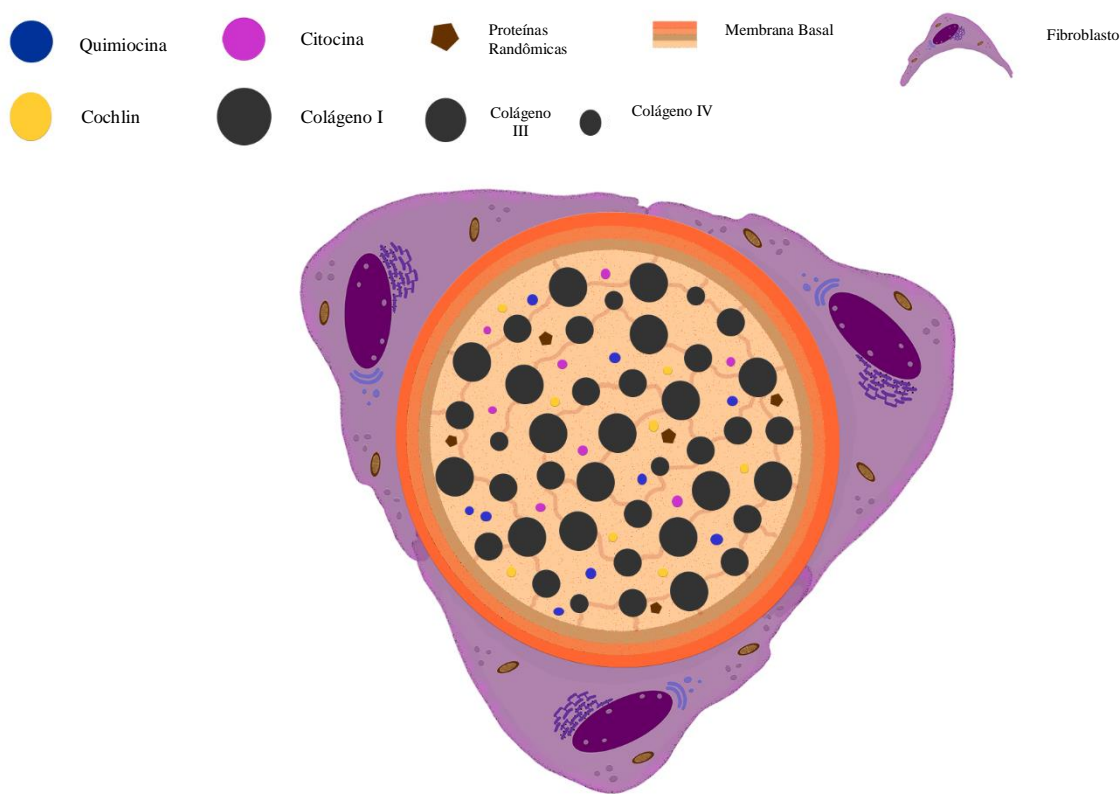


Figura 1.7.2- Esquema ilustrativo da composição do sistema de condúites. O lúmen do condúite é formado por colágeno do tipo I, III e IV inseridos na matriz basal, formando uma substancia amorfa. No lúmen do condúite, são transportadas de forma ativa muitas proteínas, inclusive as quimiocinas que são capturadas pelas células durante o processo de migração celular. Os fibroblastos são células que secretam diversas proteínas da matriz, entre elas a laminina e o colágeno que juntos formam o sistema de condúites. Além do seu papel de secretar essas proteínas estruturais, os fibroblastos entram em contato com as células migrantes. Esquema ilustrativo publicado por (186).

Dentre as enzimas degradadoras da matriz extracelular destacam-se as metaloproteases (MMPs) que atuam nos processos de remodelamento da matriz extracelular, na angiogênese e nos processos migracionais (228,238–240). Assim, as metaloproteases atuantes no processo de remodelamento da matriz extracelular mais avaliadas são: 1) MMP-1, MMP-7 e MMP-13 que são colagenases e atuam principalmente na pele e nas mucosas; 2) MMP-2 e MMP-9 que são metalogelatinases e atuam fortemente no processo de migração e são amplamente encontradas em diversos microambientes teciduais; 3) MMP-8 que é encontrada em fígado e pulmão e está associada ao processo de formação de fibrose; e 4) MMP-13 que é associada a limpeza da matriz extracelular em processos de infecções agudas (239,241–246). As MMPs podem ser secretadas via vesículas e também na sua forma inativa e fatores biológicos como TNF e TGF- β podem ativar as suas funções catalíticas, lembrando que TNF e TGF- β são produtos da resposta imune frente a uma infecção (245,246).

Todo o processo de remodelamento da matriz extracelular ocorre de forma dinâmica por vários mecanismos, principalmente os mecanismos de controle deste remodelamento. Assim, uma ação exacerbada da atividade de enzimas associadas ao remodelamento pode induzir sérios danos ao tecido. Para evitar isto, ao mesmo passo que as enzimas são secretadas e ativadas, também são expressas moléculas que atuam no controle da ação catalítica destas enzimas, as moléculas inibidoras de metaloprotease tecidual (TIMPs) (245,246). Apesar do processo de remodelamento acontecer de forma dinâmica e homeostática durante uma infecção aguda e ter mecanismos de controles como vistos na expressão inativa das enzimas ou a liberação das mesmas em vesículas, alguns fatores podem quebrar o potencial homeostático que controla o remodelamento da matriz extracelular, como por exemplo, a persistência do estímulo de infecção aguda, bem como a persistência parasitária principalmente em órgãos linfoides secundários (55,130,186).

1.7.3 Imunobiologia da interação *Leishmania infantum*-hospedeiro

O baço é um dos principais órgãos afetados pela *L. (L.) infantum* durante a Leishmaniose visceral canina (9,55,130,247,248). Este órgão recebe substâncias parasitárias ou bioquímicas oriundas do sangue e sua principal função está associada a remoção de hemácias senescentes e a

promoção da resposta imune adaptativa (183,184,249). Desta forma, as células apresentadoras de antígenos infectadas deixam o sítio de inoculação do parasita, a derme, e migram em direção aos órgãos linfoides para realizarem a apresentação antigênica (139). Essas células apresentadoras de antígenos podem entrar tanto em vasos linfáticos quanto em vasos sanguíneos presentes na derme e assim chegam, respectivamente, aos linfonodos e baço (184). Tal processo migratório de acesso aos órgãos linfoides é dinâmico e baseado no gradiente quimiotático (250). O linfonodo recebe tanto as células apresentadoras de antígeno infectadas vindas da derme como também as células vindas dos demais órgãos carreadas pelo sangue (251). E o baço pode receber as células apresentadoras de antígenos que migraram via vasos sanguíneos oriundas de vários locais (183).

Vale destacar aqui, que o linfonodo pode receber tanto antígeno de forma livre quanto as próprias células apresentadoras de antígenos ambos carreados pela linfa (251). Em infecção experimental com *Leishmania. (L.) donovani* e em modelo murino desnutrido, foi demonstrado que o linfonodo perdeu a sua capacidade de barreira imunológica mediada principalmente pelas células dendríticas foliculares que são responsáveis por reter as células apresentadoras de antígenos livres vindas principalmente da derme (251). Tal falha na barreira imunológica favorece a disseminação do parasita para demais órgãos do hospedeiro incluído o baço, que pode ter o seu sistema homeostático sobrecarregado, afetando o seu microambiente.

A matriz extracelular esplênica passa por uma série de modificações para criar um ambiente favorável para que os mecanismos imunológicos possam ocorrer de forma satisfatória (186). Quando o parasita deixa a derme, no interior de células do sistema fagocitário, essas células infectadas podem chegar a diversos órgãos e tecidos do organismo, incluindo o baço (248).

As células fagocitárias alcançam o tecido linfoide do baço via gradiente quimiotático presente no ambiente extracelular e chegam na polpa vermelha através dos sinusóides que em algumas regiões apresentam fenestrações e assim as células infectadas ganham o microambiente esplênico (252). Ao chegarem na polpa vermelha, as células apresentadoras de antígenos infectadas reconhecem, via interação com seus respectivos receptores quimiotáticos, as quimiocinas que estão presentes no lúmen do conduto (186). Pouco se sabe sobre como ocorre a interação entre as células migrantes com o sistema de conduto e o que tem sido descrito não é baseado em microambiente esplênico canino, mas sim em linfonodos e em modelos experimentais como o murino, porém,

sabe-se que os condutas são estruturas fundamentais para guiar as células migrantes no interior dos órgãos linfoides secundários (175,188,189,199,253).

De uma forma geral, ao chegarem na zona marginal esplênica, as células apresentadoras de antígenos infectadas apresentam epítomos antigênicos via MHC classe I ou classe II aos receptores de linfócitos T, o TCR, e assim desencadeiam todos os eventos relativos ao desenvolvimento da resposta imune adaptativa (254–256). As células apresentadoras de antígenos migram para os órgãos linfoides onde irão realizar a apresentação antigênica via interação MHC I/II e TCR. A interação do MCH II, B7 e CD40 expressos em APCs com TCR, CD28 e CD40L, respectivamente, expressos em linfócitos T CD4⁺ ativam a sua função efetora com a secreção de citocinas que irão ativar a função microbicida das células apresentadoras de antígenos (257). O perfil de secreção de citocinas é responsável por ditar o perfil de linfócito T CD4⁺. Como exemplo, na presença de IFN- γ e IL-12 o linfócito T CD4⁺ se diferencia em Th1 levando ao desenvolvimento da resposta imune mediada por células, ativação de macrófagos M1 e função microbicida mediada pela expressão da enzima iNOS (óxido nítrico sintase induzida) (164,258,259). A iNOS catalisará a produção de óxido nítrico, um produto da via Th1 importante para a eliminação do patógeno intracelular (164,258,259). Juntamente com a ativação da função efetora de linfócitos T CD4⁺, há a ativação de outro perfil de linfócitos, os T CD8⁺ citotóxico. A interação entre o MCH I e ICAM-1 com TCR e LFA-1, respectivamente, expressos em linfócitos T CD8⁺ ativam a função citotóxica e a liberação de granzimas e perforinas que irão induzir a lise das células apresentadoras de antígenos infectadas (218,260,261). Como resultado da ativação de T CD4⁺ e dos linfócitos TCD8⁺ ocorre a expressão de uma gama de citocinas como IFN- γ , IL-2 e TNF- α (262,263) e o desenvolvimento da resposta imune mediada por células.

Ao mesmo passo em que há o desenvolvimento da resposta imune mediada por células, pode haver também o desenvolvimento da resposta imune humoral. O processo de ativação da resposta humoral se inicia quando os linfócitos B reduzem a expressão de S1P1 e S1P3 passando a expressar CXCR5, receptor para quimiocinas CXCL13 que são produzidas por células dendríticas foliculares migrando para a região de linfócitos B foliculares (81). Após a ativação dos linfócitos T, os linfócitos B podem permanecer na sua compartimentalização no folículo ou migrar para a zona marginal (183). Uma outra via de ativação de linfócitos T CD4⁺ é através da sua interação com linfócitos B foliculares e essa interação ativa a função de linfócitos T e B, resultando na

expressão de IL-4 e IL-10, citocinas regulatórias expressas pela via de resposta Th2. Esta resposta é caracterizada pela produção de anticorpos como, por exemplo, IgG, imunoglobulina que tem função opsonizadora de patógenos e células em processo de apoptose (25,264,265). A resposta Th2 resulta, em última análise, na ativação da resposta imune humoral, através da diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos e assim na expressão das imunoglobulinas, como as IgG e seus isótipos, principalmente a IgG2 que são frequentes na Leishmaniose visceral canina (97,266). Apesar da via Th1 ser mais eficiente contra patógenos intracelulares devido sua ação mediada por macrófagos e IFN- γ que agem no citoplasma da célula infectada eliminando o parasita no vacúolo parasitóforo, um balanço entre a resposta Th1 e Th2 parece ser a resposta necessária para o controle da infecção (101). No entanto, em cães com LVC foram observados aumento da expressão do mRNA de IL-4, IL-10, IL-12, INF- γ e TNF- α quando comparados ao grupo não infectado. Além disso, observaram uma associação entre a expressão de maiores níveis de mRNA de IL-10 e o aumento da parasitemia quando comparados aos animais não infectados e baixa parasitemia (101).

Em conclusão, embora haja a expressão gênica e citocinas associadas ao perfil Th1 em cães naturalmente infectados, essa expressão é acompanhada por citocinas regulatórias, como IL-10 que é associada ao aumento da carga parasitária. Além disso, a citocina IFN- γ , que deveria estar associada a redução da parasitemia, uma vez que ativa a função microbicida de macrófagos via expressão de NO, foi associada ao aumento da parasitemia juntamente com IL-10 (101), sugerindo que, em cães com Leishmaniose visceral canina, as vias de interações moleculares e a ativação da função efetora de linfócitos T podem estar alteradas (267). Além disso, outros fatores podem estar associados ao aumento da parasitemia, incluindo a presença de macrófagos do fenótipo M2 com a produção de arginase que é associada ao crescimento da carpa parasitária e também a indução do processo de exaustão dos linfócitos T (165,166,268).

Alguns estudos sobre a imunopatogenia em cães infectados tem mostrado uma associação entre a presença de sinais clínicos e o perfil de resposta imune. Em cães assintomáticos tem-se observado a presença de células Th1 e Th2, porém com predominância de resposta Th1 e Th17 e expressão de citocinas TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-2 e de mRNA da citocina IL-17, participação de macrófagos do perfil M1, produção de óxido nítrico e controle da carga parasitária (9,86,87,89). Por outro lado, cães sintomáticos apresentam predominância de células de perfil Th2 e expressão de citocinas como IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β (86,87,269). Nestes animais, há a

polarização de macrófagos M2 com a estimulação de arginase, que a partir da L-arginina produzirá L-ornitina e poliaminas, eficazes na eliminação do parasita intracelular, pelo contrário, favorecem o seu crescimento (270). Além disso, há ativação policlonal de linfócitos B e produção de imunoglobulinas que não são específicas para epítomos da *Leishmania (L.) infantum*, e a carga parasitária não é controlada (9,263). Estudos em modelo natural da infecção canina nos permite ver que nem todos os animais seguem esse padrão imunológico e que esse perfil depende de fatores nutricionais, genéticos e/ou ambientais. Para que sejam produzidas todas essas citocinas e produtos como óxido nítrico é importante destacar a participação de moléculas coestimuladoras (271).

A interação entre moléculas coestimuladoras é necessária ao desenvolvimento da resposta imune adaptativa, pois intensificam a transdução de sinais intracelulares tanto das APCs quanto dos linfócitos T e B (259). Para que ocorra a interação entre as células apresentadoras de antígenos e os linfócitos T e ativação das suas funções efetoras é necessária a interação via complexo antígeno-MHC I/II e TCR e algumas moléculas sinalizadoras que chamamos de coestimuladoras ou moléculas de segundo sinal de ativação que irão desencadear a cascata de sinalização e fosforilação de receptores transmembranares tanto nas células apresentadoras de antígenos quanto nos linfócitos T (272). A molécula CD40 e seu ligante CD40L são exemplos de moléculas coestimuladoras, sendo a molécula CD40 pertencente à superfamília do TNF- α e é expressa em linfócitos B, macrófagos e células dendríticas. Já os linfócitos T, principalmente a subpopulação de linfócitos T CD4⁺ expressam os ligantes para essa molécula, o CD40L (273). Assim, a interação dessa molécula com seu receptor intensifica os sinais de ativação e também induz a expressão de uma outra molécula fundamental nessa via de segundo sinal de ativação, a B7 (274–276).

Além da via CD40/CD40L, existe outra via de coestimulação: a via B7/CD28 (276). Linfócitos T expressam o receptor CD28 que irá se ligar à molécula B7, expressa, por sua vez, em células apresentadoras de antígenos, dentre elas linfócitos B, macrófagos e células dendríticas. Essa interação resulta na expressão de BCL-X e BCL-2 que são fatores para a sobrevivência celular, IL-2 e IL-2R que estimulam a proliferação celular e múltiplas vias como a MAP quinase, JNK e RAC e ativação do fator de transcrição NF- κ B (277). No entanto, além de ativar as vias de sinalização para a função efetora dos linfócitos T sejam eles CD4⁺ ou CD8⁺, a interação da molécula B7 pode ocorrer com uma importante molécula reguladora, a molécula antígeno 4 de linfócitos citotóxicos (CTLA-4 presente em linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺) que induz um silenciamento celular

(273,276,277). A molécula CTLA-4 é uma molécula competitiva contra a molécula CD28 e que juntamente com a via PD1/PDL-1 ativam a via de silenciamento mediada pelo processo de exaustão celular (276,278).

Assim, durante a exaustão celular em cães naturalmente infectados com *Leishmania. (L.) infantum*, observamos que a expressão de CTLA-4 estava aumentada e que esse aumento foi associado à alta carga parasitária, exemplificando o papel de silenciamento efetor desta molécula sobre linfócitos T (130).

1.7.4 Remodelamento da matriz extracelular esplênica de cães naturalmente infectados com *L. (L.) infantum*

O microambiente esplênico precisa ser capaz de sustentar os mecanismos envolvidos na interação parasita-hospedeiro dentro deste órgão (9). Além disso, o resultado dessa interação por si já induz diversas modificações da microarquitetura esplênica, como a angiogênese (279). A matriz extracelular é o arcabouço estrutural que tem como função intermediar a comunicação célula apresentadora de antígeno-linfócitos T/B residentes no tecido esplênico (189). A matriz extracelular também participa do endereçamento de vesículas e moléculas sinalizadoras secretadas no microambiente através da interação destas com as proteínas da matriz extracelular, como colágeno, laminina, e fibronectina (186).

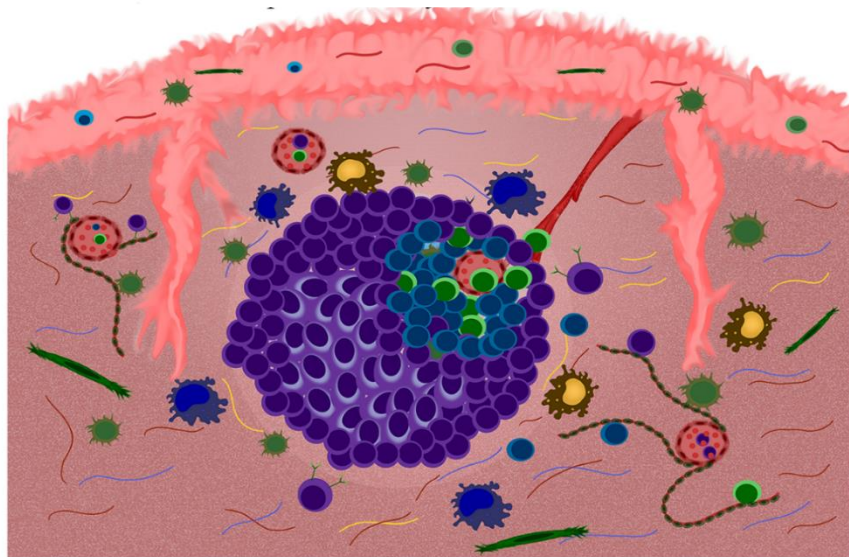
O estudo da interação do parasita com as células do sistema imune residentes no baço de cães naturalmente infectados e as consequências desta interação vem ganhando atenção uma vez que tem sido descrito que o baço é um dos órgãos mais afetado entre aqueles acometidos pela infecção por *Leishmania sp.*, (280) e é responsável por uma carga parasitária considerável.

Em infecção natural canina tem sido observada a desorganização da matriz extracelular esplênica. Na Figura 1.7.4 estão descritos os eventos de desorganização da matriz extracelular esplênica baseados na interação entre a *Leishmania. (L.) infantum* e o microambiente esplênico de cães naturalmente infectados (186). Santana e colaboradores (77) descreveram o efeito da resposta imune no microambiente esplênico e viram que nos cães do estudo houve perisplenite, caracterizada pela formação de infiltrado inflamatório celular na cápsula do tecido esplênico, acompanhada pela formação de fibrose mais frequentemente observadas em animais mais suscetíveis à infecção.

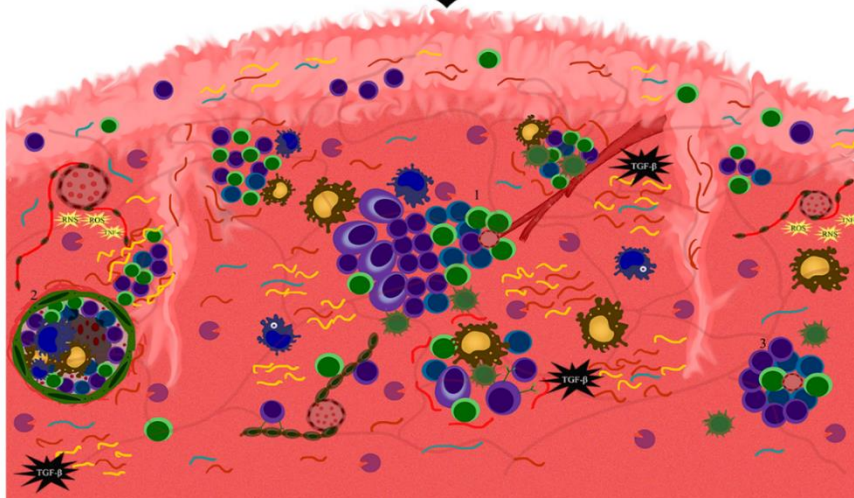
O remodelamento da matriz extracelular esplênica é um importante mecanismo homeostático e dinâmico que ocorre frequentemente neste órgão devido ao seu principal papel de remoção de produtos carregados pelo sangue (232). Assim, o estímulo contínuo de fatores imunológicos pro-inflamatórios bem como produtos secretados pelo próprio parasita e a sua persistência nesse microambiente podem induzir a quebra da homeostase e constante modificação da matriz extracelular esplênica (55,243,281).

Assim, ao analisar as alterações da polpa branca esplênica, é possível observar que ela é drasticamente afetada e suas compartimentalizações são perdidas, chegando a uma marcante atrofia do folículo em cães com Leishmaniose visceral avançada (9,55,77,130). Essa atrofia pode ser um importante fator que indica a quebra da homeostase tecidual da matriz extracelular esplênica (186). Da Silva e colaboradores (55) descreveram que a matriz extracelular esplênica sofre intenso remodelamento com o aumento dos seus componentes estruturais, como laminina e colágeno, que são fundamentais para o processo sustentação das estruturas esplênicas como a polpa branca e para o processo de migração celular.

Microambiente esplênico saudável



Infecção crônica



- | | | | | | | | | | |
|--|-----------------|--|---------------|--|-------------------|--|---------------------|--|-------------------------------|
| | Linfócito B | | Plasmí cito | | Macrófag o M2 | | Fibroblasto | | Matriz extracelular esplênica |
| | Linfócito T CD4 | | Vaso | | Célula dendrítica | | Macrófago infectado | | Conduíte |
| | Linfócito T CDS | | Macrófag o M1 | | TGF- β | | TGF- β | | |
| | | | | | TGF- β | | TGF- β | | Enzima degradadora |
- 1 Polpa branca esplênica desorganizada 2 Granuloma 3 Polpa branca esplênica atrofiada

Figura 1.7.4 - Esquema ilustrativo do microambiente esplênico. (A) Baço organizado: nesta ilustração há a representação de um baço organizado com polpa branca e compartimentação mantidas, como centro germinativo e bainha periarteriolar linfática, zona marginal e cápsula. Conforme representado, a matriz extracelular mantém sua composição normal. (B) Baço desorganizado: Esquema ilustrativo de um microambiente cronicamente inflamado do tecido do baço. Nele, é possível evidenciar o remodelamento da matriz extracelular caracterizada

por aumento de seus componentes proteicos (colágeno e laminina), metaloprotease-9 e desorganização da polpa branca esplênica.

Durante a inflamação crônica, a matriz extracelular sofre remodelação, favorecendo a entrada de novas células inflamatórias. Na inflamação persistente, a matriz extracelular perde seu controle de remodelamento mostrando um aumento de citocinas como TNF- α e TGF- β juntamente com alta produção de metalopeptidases de matriz extracelular e moléculas microbidas como espécies reativas de nitrogênio (RNS), espécies reativas de oxigênio (ROS) e enzimas lisossomais. Esses eventos levam a danos nos tecidos ao quebrar ou acumular algumas proteínas estruturais como a laminina e o colágeno. Nessa situação, comumente ocorre redução das células e atrofia da polpa branca esplênica (55,81,282).

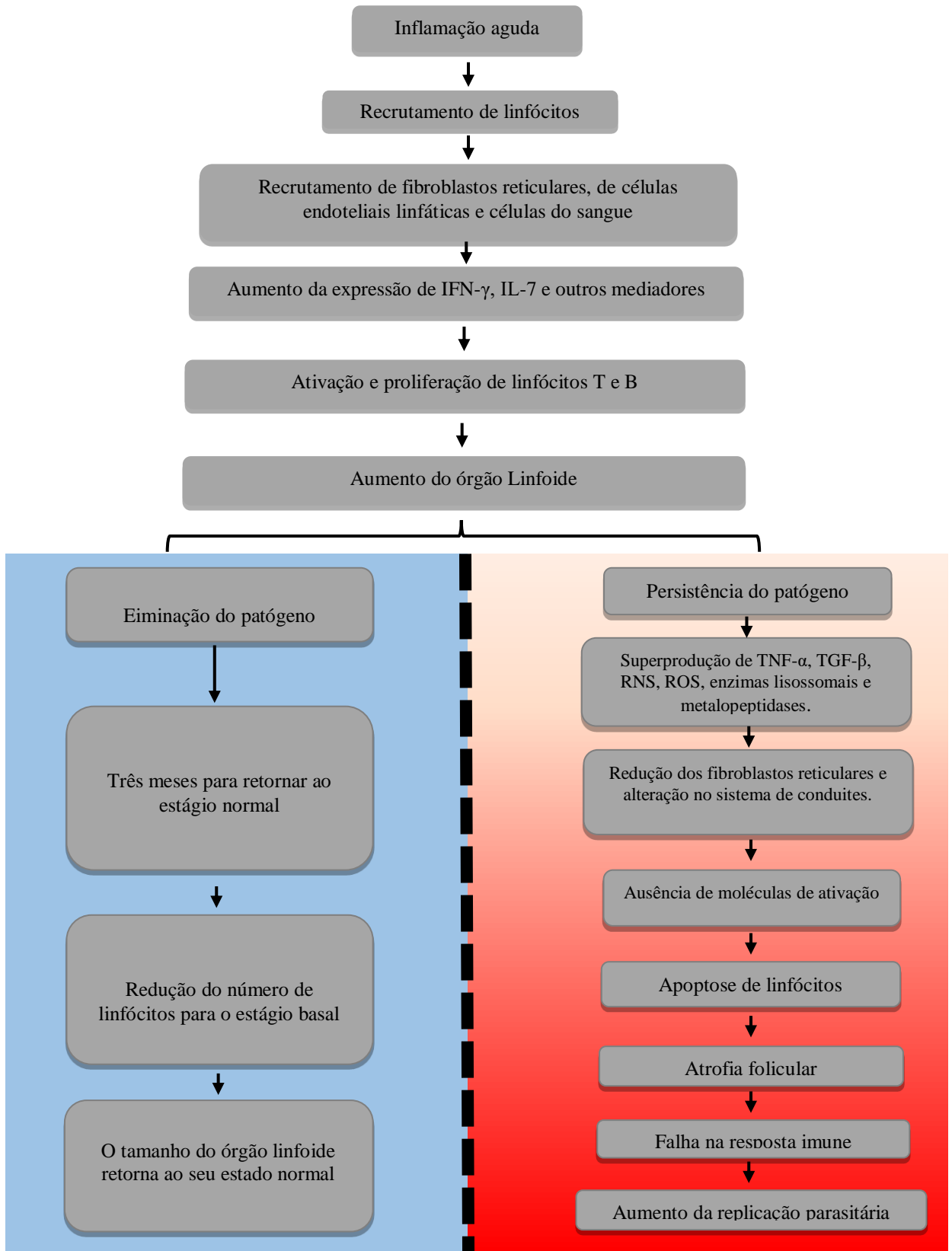
Ao associar a atrofia da polpa branca esplênica com o remodelamento da matriz extracelular deve-se pensar na região de transição celular, a polpa vermelha e suas estruturas, como o sistema de conduites. Assim, com o aumento das proteínas de matriz extracelular e aumento da enzima MMP-9 é possível que haja a formação de barreiras migracionais pela polpa vermelha, aprisionando as células na matriz extracelular e impedindo que essas células cheguem em suas áreas de compartimentalização específica (186). Além disso, outro fator que pode influenciar na atrofia folicular é a redução da expressão de RNAm de quimiocinas e seus receptores que são fundamentais para o processo migracional, como por exemplo a CXCL13 e seu receptor (81).

A desorganização da polpa branca esplênica seguida pela sua atrofia pode ser devido também a morte por apoptose de importantes células como linfócitos. Em estudo prévio, observou-se a associação entre a expressão de CTLA-4, apoptose e a atrofia da bainha linfática periarteriolar (130). Assim, a morte desses linfócitos, principalmente dos residentes da bainha periarteriolar, pode favorecer o quadro de imunossupressão que é bem característico da Leishmaniose visceral canina, uma vez que linfócitos residentes na bainha periarteriolar são células chaves para o desencadeamento da resposta imune adaptativa (77,248,283).

Em cães naturalmente infectados com *Leishmania. (L.) infantum*, o quadro de desorganização da polpa branca esplênica é associado à depleção dos linfócitos T CD4⁺ quando a carga parasitária ainda é baixa (55). No entanto, o número de linfócitos T CD4⁺ retorna aos valores semelhantes aos animais com baixa carga parasitária e polpa branca organizada. Um dos principais

sinais clínicos observados em cães com Leishmaniose visceral é o aumento do baço, a esplenomegalia. Assim, o aumento do baço pode ser associado a uma intensa proliferação celular, devido a ativação policlonal de Linfócitos B, plasmocitose e ainda, acúmulo de células vermelhas e plaquetas. A desorganização da matriz extracelular levaria a disfunção do baço.

O aumento do tamanho do baço e o aumento de linfócitos T CD4⁺, principalmente quando há a desorganização e atrofia da polpa branca e alta carga parasitária, pode indicar dano na capacidade migracional celular e imunossupressão. O dano na capacidade migracional pode estar associado a dois fatores: Redução dos RNAm de quimiocinas e seus receptores como também por dano no microambiente, como por exemplo, no sistema de conduite (186,284). Assim, as células não conseguem chegar nas suas áreas de compartimentalização específica e a falta de interação celular levam a um déficit de ativação. Como resultado, os linfócitos entram num processo de exaustão celular que culmina com a falha no controle da carga parasitária, quadro de imunossupressão e progressão da doença. Desta forma, é possível que o quadro de imunossupressão observado em cães com LV esteja associado com falhas no processo de migração celular, uma vez que a quebra da arquitetura esplênica precede a perda do controle da carga parasitária e se correlaciona com o aumento da intensidade dos sinais clínicos resultando em baixa ativação celular e perda da capacidade de controle da carga parasitária e progressão da doença. No fluxograma 1.7.4 estão sumarizados os eventos associados ao comprometimento da microarquitetura esplênica.



fluxograma 4.0- matriz extracelular e alterações no tecido linfoide durante processos infecciosos agudos e crônicos. Ao detectar a presença de patógeno, nosso sistema imunológico inato é ativado e como consequência desta ativação ocorre uma cascata de eventos, que culminam com o recrutamento de células importantes para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa. O aumento do tamanho do órgão é associado à alteração da microarquitetura tecidual e da composição celular, assim levando a eliminação do patógeno. No entanto, devido a alguns fatores do parasita ou de seu hospedeiro, o patógeno pode permanecer no tecido, e a sua persistência leva a quebra na homeostase tecidual e a perda da capacidade do órgão de coordenar muitas funções como, por exemplo, o desenvolvimento da resposta imune adaptativa causando uma imunossupressão e falha no controle da infecção. O Fluxograma foi adaptado de Morgado e colaboradores (186).

2.0 Justificativa

Em cães naturalmente infectados com *L. (L.) infantum* tem sido descrita a persistência do parasita no tecido esplênico. Além disso, a imunossupressão observada na LVC pode estar associada a alterações no processo de maturação intratímica, uma vez que este órgão apresenta importante papel na formação do repertório imunológico. Sendo o baço um dos principais alvos da infecção por *L. (L.) infantum* na LVC e órgão responsável por grande parte da carga parasitária do animal infectado, é importante estudar o impacto da infecção também no tecido esplênico. Durante o processo infeccioso, a matriz extracelular esplênica passa pelo processo natural de remodelamento para criar um ambiente propício para a comunicação, migração e interação das células envolvidas na apresentação antigênica, bem como na resposta imune mediada por células, sendo este processo dinâmico e natural. A persistência do parasita e o constante estímulo antigênico neste microambiente levaria a quebra da organização da matriz extracelular e alterações na composição do arcabouço estrutural do baço, influenciando na dinâmica migracional das células residentes e circulantes neste microambiente. Tal alteração do arcabouço esplênico afetaria diretamente a constituição do sistema de conduites, responsável por distribuir quimiocinas e orientar o deslocamento celular neste órgão resultando na perda da capacidade de orientação e migração celular. É possível que neste microambiente, a desorganização da polpa branca esplênica e depleção de linfócitos T CD4⁺ seja um reflexo da alteração da composição estrutural da matriz extracelular que somadas poderiam estar associadas ao quadro de imunossupressão da resposta imune celular e falha no controle da carga parasitária.

3.0 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar as alterações histológicas na microarquitetura tímica e investigar alguns mecanismos imunopatológicos no tecido esplênico que possam estar associados ao processo de desorganização da polpa branca em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) infantum*, levando em consideração o remodelamento da matriz extracelular e a dinâmica migratória de linfócitos T e B.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a infecção do timo de cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*, descrevendo as principais alterações induzidas, como: infiltrado inflamatório, alterações da microarquitetura do órgão e as alterações na deposição de componentes da matriz extracelular, correlacionando com a evolução do quadro clínico;

Examinar por imunohistoquímica e por análise histológica, possíveis alterações da matriz extracelular esplênica de cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* como a deposição de colágeno, laminina e fibronectina, a expressão de metalopeptidases (MMP-9 e ADAM-10) bem como, a distribuição e quantidade de Linfócitos T e B e expressão de marcadores de proliferação celular (Ki-67) e citocinas (IFN- γ e IL-10);

Descrever, com base na literatura, a estrutura e função da matriz extracelular de linfonodos e do baço saudáveis, assim como as consequentes alterações e remodelamento destes órgãos causados pela presença de infecções;

Avaliar por imunohistoquímica a organização dos componentes do sistema de conduítes do baço de cães infectados com *L. infantum* e a capacidade migratória por ensaio de migração *in vitro* dos esplenócitos comparados com células oriundas de linfonodos e do sangue;

Investigar, por imunohistoquímica, o processo de ativação celular através da detecção e quantificação de células CD40⁺ e seu ligante CD40L⁺, bem como de marcadores de ativação da função microbicida mediada por macrófagos através da imunomarcagem de TNF- γ e enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS).

4.0 Resultados

Este trabalho apresentará resultados que já foram publicados em 3 artigos (seção 4.1), e dados que ainda não foram publicados (seção 4.2).

4.1 Resultados publicados

Artigo I: Detection of amastigotes and histopathological alterations in the thymus of *Leishmania infantum*-infected dog.

Aurea V. A. da Silva¹ | Tainã L. de Souza¹ | Artur A. V. Mendes Jr.³ | Luiz C. Ferreira⁴ | Fabiano B. Figueiredo² | Camila P. B. Filgueira¹ | Patricia Cuervo¹ | Renato Porrozzini¹ | Rodrigo C. Menezes³ | Fernanda N. Morgado¹

¹Laboratório de Pesquisa em Leishmanioses, IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil

²Laboratório de Biologia Celular, Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Curitiba, Paraná, Brasil

³Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos, INI/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil

⁴Serviço de Anatomia Patológica, INI/ FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil

Na Leishmaniose visceral canina (LVC), foram demonstradas linfopenia e desorganização de órgãos linfóides, como baço e nódulos linfáticos. No entanto, o envolvimento do timo na LVC não foi avaliado até agora. Neste artigo investigamos se o timo pode ser colonizado por *L. (L.) infantum* em cães naturalmente infectados. Foram obtidos 16 fragmentos de timo de cães infectados e as amostras deste órgão foram submetidas à imunohistoquímica para detecção de laminina e fibronectina. Para a análise das alterações histológicas e detecção de amastigotas foi realizada a análise histopatológica em cortes corados com hematoxilina e eosina. A detecção molecular de amastigotas, bem como a indentificação das espécies infectantes foram feitas pelas técnicas de hibridização *in situ* e reação em cadeia da polimerase (PCR) visando o gene que codifica a região intergênica 1 (Internal transcribed space ITS-1). Além disso, foram obtidas amostras de baço, pele e linfonodos poplíteos para a cultura parasitológica seguida de eletroforese enzimática multilocus. *L. (L.) infantum* foi identificada em todos os cães. DNA e formas amastigotas de *L. (L.) infantum* foram detectadas no timo de 16 cães por PCR e em oito por imunohistoquímica, respectivamente. Além do timo, parasitas foram detectados no baço, nódulos linfáticos e pele. Uma tímite granulomatosa ou piogranulomatosa foi observada em oito cães associado a presença de formas


amastigotas intactas no tecido. A deposição de fibronectina no timo foi maior em cães com mais sinais clínicos. Esses resultados demonstram que o timo de cães pode ser parasitado por *L. (L.) infantum*, o que pode gerar reações inflamatórias levando a alterações na microarquitetura do timo. Esses dados em conjunto demonstram que o microambiente tímico sofre modificações estruturais o que poderia impactar negativamente na sua função de maturação dos linfócitos T.

Received: 4 October 2019 | Revised: 22 December 2019 | Accepted: 27 December 2019

DOI: 10.1002/iid3.285

ORIGINAL RESEARCH

Detection of amastigotes and histopathological alterations in the thymus of *Leishmania infantum*-infected dog

Aurea V. A. da Silva¹ | Tainã L. de Souza¹ | Artur A. V. Mendes Jr.³ | Luiz C. Ferreira⁴ | Fabiano B. Figueiredo² | Camila P. B. Filgueira¹ | Patricia Cuervo¹ | Renato Porrozi¹ | Rodrigo C. Menezes³ | Fernanda N. Morgado¹ 

¹Laboratório de Pesquisa em Leishmanioses, IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil

²Laboratório de Biologia Celular, Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Curitiba, Paraná, Brasil

³Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos, INI/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil

⁴Serviço de Anatomia Patológica, INI/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil

Correspondence

Fernanda Nazaré Morgado, Laboratório de Pesquisa em Leishmanioses, IOC/FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro, RJ 21040-900, Brasil.
Email: morgado@ioc.fiocruz.br

Funding information

PAEF-Fiocruz; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Rio de Janeiro, Grant/Award Number: E-26/010.001018/2016; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Number: 421223/2018-9; Programa Print-Capes

Abstract

Introduction: In canine visceral leishmaniasis (CVL), lymphopenia, and the disorganization of lymphoid organs such as spleen and lymph nodes have been demonstrated. However, the involvement of thymus in CVL has not been evaluated so far. Herein, we investigated whether the thymus can be colonized by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs.

Methods: Thymus were obtained from 16 of 58 dogs and samples of this organ were submitted to immunohistochemistry for laminin and fibronectin detection, histopathology, in situ hybridization and polymerase chain reaction (PCR) targeting the gene ITS-1 for *Leishmania* and sequenced. Samples of spleen, skin and popliteal lymph nodes were collected and submitted to immunohistochemistry and parasitological culture followed by multilocus enzyme electrophoresis. **Results:** *L. infantum* was identified in all dogs. DNA and amastigote forms of *Leishmania* were detected in the thymus from 16 dogs by PCR and in eight by immunohistochemistry. Besides thymus, parasites were detected in spleen, lymph nodes, and skin. A granulomatous or pyogranulomatous thymitis was observed in eight dogs associated to intact amastigotes forms of this parasite. Fibronectin deposition in thymus was higher in dogs with more clinical signs. **Conclusions:** These results demonstrate that the thymus of dogs can be parasitized by *L. infantum*, which may generate inflammatory reactions leading to alterations in thymic microarchitecture.

KEYWORDS

canine visceral leishmaniasis, clinical signs, extracellular matrix, histopathology, *Leishmania infantum*, parasite load, thymus

1 | INTRODUCTION

Visceral leishmaniasis (VL) is a neglected zoonotic disease caused by the protozoan *Leishmania infantum*

Rodrigo C. Menezes and Fernanda N. Morgado contributed equally to this work.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. © 2020 The Authors. *Immunity, Inflammation and Disease* published by John Wiley & Sons Ltd

in the Americas.¹ Dogs play an important role as domestic reservoirs of VL in the urban space since they harbor parasites available for sand fly vectors even in the healthy skin.² *L. infantum* infects macrophages and can spread systemically to all canine tissues leading to the appearance of multiple clinical signs.³ Among the most commonly infected organs are the spleen and lymph nodes, which are essential to antigen presentation and the adequate development of a specific immune re-sponse.⁴ The disruption of splenic microarchitecture has been described in canine VL,⁵ as well as a pyogranulo-matous or granulomatous inflammatory infiltrate, high parasite load and hypertrophy.^{6,7} These alterations in the spleen are associated with the deposition of collagen, the impairment in cytokine messenger RNA expression and uncontrolled parasite growth in infected dogs.^{5,8-10}

In the lymph node, another secondary lymphoid organ, higher parasite load and higher expression of inducible nitric oxide synthases have been reported in symptomatic dogs when compared with asymptomatic animals.¹¹ Histopathological alterations such as pyo-granulomatous or granulomatous inflammation, hypertrophy, and hyperplasia of cortical and medullary zones^{7,12,13} and collagen deposition have been reported.⁸ Both, spleen and lymph nodes are important sites for the development of the specific immune response¹³ once they receive the majority of mature T lymphocytes from the thymus and form a delicate compartmentalization based on chemotaxis and an intrinsic antigen presentation.^{9,14,15}

Although the association between parasitism and histological lesions has been frequently described in the spleen and lymph node of dogs infected by *L. infantum*, little is known about the parasite occurrence and pathogenesis in the thymus in these cases. The thymus is a primary lymphoid organ that plays a role in T-cell homeostasis maintenance, and its product can dictate the immunological profile of individuals.¹⁶ In the thymus, thymocytes initiate the genic recombination and expres-sion of their TCR receptors and CD4⁺ and CD8⁺ surface molecules. Another extremely important function of the thymus is the positive and negative selection of T cells. In this process, macrophages at the corticomedullary junc-tion remove, by phagocytosis, T lymphocytes that recognize both self-major histocompatibility complex molecules and self-antigens.^{17,18} The extracellular matrix compounds such as laminin and fibronectin are essential to promote thymocyte maturation based on cellular migration from cortical to the medullar region and then to the periphery. After maturation, naïve T cells leave the thymus, reaching the bloodstream and populating the secondary lymphoid organs. However, lymphopenia and failure in cellular immune response have been described

in infected dogs.¹⁹ In this context, the present study aimed to evaluate the occurrence of *L. infantum* in the thymus of naturally infected dogs, and to describe the inflammatory infiltrate, the microarchitecture alterations and the deposition of extracellular matrix components (laminin and fibronectin) in this organ associated with parasitism. Herein, we observed infection by *L. infantum* in the thymus of all studied dogs, as well as an association between thymic microarchitecture alterations and disease-worsening.

✉ | MATERIALS AND METHODS

✉ 2.1 | Ethical statement

The animals included in this study were *L. infantum*-naturally infected dogs that were destined for euthanasia as recommended by the Brazilian Ministry of Health polices. All dog owners had provided formal written consent. The samples were collected during necropsies conducted by veterinarians from the Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatoozonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZO-INI/FIOCRUZ). This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Oswaldo Cruz Foundation (CEUA/FIOCRUZ; Permit Number: LW-54/13) and performed according to Brazilian Law 11794/08 and the Brazilian Society of Laboratory Animal Science.

2.2 | Animals

A descriptive study was conducted using a nonprobabil-istic sample of dogs from Barra Mansa (22°32'25.19"S and 44°10'35.33"W), Rio de Janeiro State, Brazil, a VL endemic area.²⁰ These dogs tested seropositive for anti-*L. infantum* antibodies by a rapid immunochromatographic test (Dual Path Platform; Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil) and by enzyme-linked immunosorbent assay (Bio-Manguinhos). The tests were performed by public health services responsible for the VL surveillance and control program of the state of Rio de Janeiro, with the permission of the owners.

The seropositive dogs were sent by the local autho-rities (Municipal Health Department of Barra Mansa) to be euthanized at Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz, Brazil. Euthanasia procedure was performed according to recommendations of the Brazilian Ministry of Health for the control of VL. From the 58 animals necropsied, we were able to recover enough thymus samples from only 16 dogs, which were included in the study.

2.3 | Clinical evaluation

The animals were submitted to a physical examination that consisted of the inspection of the skin, ocular, and nasal mucosae, as well as palpation of the superficial lymph nodes and organs. The following clinical signs were considered compatible with VL: low body score, cachexia, apathy, pale mucosae, regional or generalized lymphadenomegaly, splenomegaly, hepatomegaly, skin ulcers, furfuraceous desquamation of skin, onychogryphosis, local or generalized alopecia, and keratoconjunctivitis.^{3,21} According to the clinical signs compatible with VL, the dogs were classified into three groups: without clinical signs, with few clinical signs (one to three clinical signs) and with many clinical signs (more than three clinical signs).²²

2.4 | Sample collection

After physical examination, the dogs were euthanized using 1.0 mL/kg of intravenous Thiopental 1.0% (Thiopentax Cristália). After the detection of an absence of corneal reflex induced by deep anesthesia, 10 mL of intravenous potassium chloride 19.1% (Isifarma) were administered. At necropsy, thymus samples were fixed in 10% neutral formalin and processed routinely for embedding in paraffin for immunohistochemistry, in situ hybridization (ISH), histopathology, and Polymerase chain reaction PCR. Additionally, samples of spleen, skin and popliteal lymph nodes were collected aseptically, immersed in sterile saline, and submitted to parasitological culture followed by multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) for *Leishmania* species identification.

2.5 | Parasitological culture for isolation and identification of *Leishmania* species

The samples were seeded onto biphasic NNN/Schneider's Insect Medium (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO) containing 10% fetal bovine serum and incubated at $26 \pm 28^\circ\text{C}$ ²³ for at least 30 days. The *Leishmania* promastigotes, isolated from tissues, were further identified at the species level by MLEE using five enzymatic systems according to protocols previously described.²⁴

2.6 | Histopathological evaluation

The sections (5- μm -thick) were stained with hematoxylin and eosin and examined by light microscopy (Nikon Eclipse E400; Tokyo, Japan). The cortical area (mm^2), the

medullary area (mm^2) of tissue and the cortex:medulla ratio were analyzed using the ImageJ software (NIH).

2.7 | Detection and quantification of amastigote forms of *Leishmania* spp. by immunohistochemistry

The slides were submitted to deparaffinization, rehydration, blocking of endogenous peroxidase, antigen retrieval, blockade of nonspecific protein binding, and incubation with polyclonal rabbit anti-*Leishmania* serum diluted 1:500 following a previously described protocol.²⁵ A polymer-based detection system (HiDef Detection HRP Polymer System; Cell Marque, Rocklin, CA) was used for the detection of amastigote forms of *Leishmania* spp. according to the manufacturer's recommendations.

For the evaluation of the parasite load in the thymus, macrophages parasitized with amastigote forms of *Leishmania* spp. were quantified using a 1- mm^2 optical grid and a manual cell counter. The cells were counted in five fields at $\times 400$ magnification in the most parasitized areas of the sections. The mean number of parasitized macrophages was calculated and parasitism was classified as absent, mild to moderate (0.2-10 parasitized macrophages), and intense (more than 10 parasitized macrophages).

2.8 | Detection of laminin and fibronectin by immunohistochemistry

After deparaffinization, rehydration, blocking of endogenous peroxidase, antigen retrieval, blockade of nonspecific protein binding (0.4% bovine serum albumin; Sigma-Aldrich Co), the specimens were incubated with the primary antibodies directed to laminin and fibronectin (Abcam), followed by incubation with anti-rabbit secondary antibody (Abcam) and streptavidin-horseradish peroxidase. Ami-noethylcarbazole (AEC kit; Invitrogen) was used as the substrate-chromogen system and the slides were counter-stained with Mayer's hematoxylin (Sigma-Aldrich Co). The slides were examined under a light microscope (Nikon). Laminin and fibronectin deposits were quantified using the ImageJ software (NIH) and we analyzed at least 10 pictures/microscopy field. The results were expressed as area fraction (representative of the percentage of the stained area).

2.9 | *Leishmania* characterization by PCR

The *Leishmania* present in the thymus were obtained by PCR the internal transcribed spacer-1 (ITS-1) gene

T A B L E 1 Primers ITS-1 sequences²⁷

Sense	Sequence (5' 3')	Size, bp
Forward (LITSR)	CTG GAT CAT TTT CCG ATG	...
Reverse (L5.8S)	TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT	320

Abbreviations: ITS-1, internal transcribed spacer-1; bp, base pairs.

fragment²⁶ followed by sequencing to determine the species. Only 10 out of 16 samples from infected dogs were successfully sequenced. The six samples left were positive to *Leishmania* sp but not sequenced. The primer sequences are described in Table 1. PCR was performed following previously described cycling conditions: 94°C for 5 minutes followed by 32 cycles at 94°C for 30 seconds, 52°C for 1 minute and 72°C for 90 seconds and a final extension at 72°C for 10 minutes.

After amplification, the products were purified with MinElute 96 UF PCR purification kit, Qiagen. The purified products were sequenced using the same primers with BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, EUA) according to the manufacturer's specifications, in 96-well plates using a concentration of 3.2 µM of each primer (forward and reverse) and 1.6 µL of the purified PCR product. The reactions were performed by Fiocruz sequencing platform (RPT01A; Sequenciamento de DNA, RJ). The obtained sequences were analyzed using Phred/Phrap/ Consed script and aligned with MEGA 7 software (Gordon D, 2003). A search using the BLAST algorithm (ncbi.gov) was carried out to confirm the species.

2.10 | Detection of amastigote forms of *L. infantum* by ISH

ISH was used only in thymus samples in which the *Leishmania* species was not identified by PCR. In these samples, ISH was used to identify amastigote forms of *L. infantum* by detecting a specific nucleic acid sequence of this parasite. For this purpose, an *L. infantum*-specific oligonucleotide probe labeled with digoxigenin that targets the minicircle kinetoplast DNA gene of the parasite²⁸ was used. Five- micrometer-thick sections were cut from the paraffin blocks and mounted on silanized slides. These sections were processed as previously described²⁹ using the ZytoFastPlus CISH Implementation Kit AP-NBT/ BCIP1 (Zytovision GmbH, Bremerhaven, Germany). The probe was diluted 1:500 in Hybridization Solution H7782 (Sigma-Aldrich Co).

2.11 | Statistical analysis

In the present study, convenience samples were used, and for analysis purposes, the animals were divided into three groups according to clinical signs: without clinical signs, with few clinical signs and with many clinical signs or parasite load: absent, mild to moderate (0.2 to 10 parasitized macrophages), and intense (more than 10 parasitized macrophages). All variables (laminin and fibronectin deposition, cortical and medullary areas, and parasite load-amastigotes/mm²) had normal distribution ($P > .05$) as indicated by Kolmogorov-Smirnov test in SPSS software. The construction of the Gaussian mixture (Normal distribution) was performed in excel and SPSS 24 software. A table with average, median, standard deviation, and maximum and minimum value of the number of amastigotes/mm² was constructed. The normal distribution and the division into groups according to the intensity of the parasite load (high and low; Figure 1) were performed based on our previous study.⁵ The correlations between the variables (clinical score, cortical/medullary areas, laminin/fibronectin depositions, and parasite load) were performed using the Pearson correlation. The comparisons between groups (high/low parasite load and clinical signs) were then analyzed using a t-independent test.

3 | RESULTS

3.1 | Clinical data

Ten of 16 dogs analyzed were males and six were female. The median age was 2.5 (range, 1-12 years) (Table 2). In the clinical examination, seven dogs had no clinical signs, six had two or more clinical signs and three had one clinical sign (Table 2).

3.2 | *L. infantum* infecting thymus

All 16 dogs tested positive for *Leishmania* sp. DNA by PCR in thymus. After ITS-1 target amplification, the amplified products from the samples of 10 dogs were identified by sequencing and sequence blast revealed that all DNA samples corresponded to *L. infantum* (Table 3). Amastigote forms within macrophages were detected in the thymic cortex and medulla from eight (50%) dogs by immunohistochemistry (Figure 2A). In the thymus of two dogs that tested positive by PCR, but in which the parasite was not identified at the species level by this technique, ISH was positive for amastigote forms of *L. infantum* (Figure 2B). The thymus parasite load was

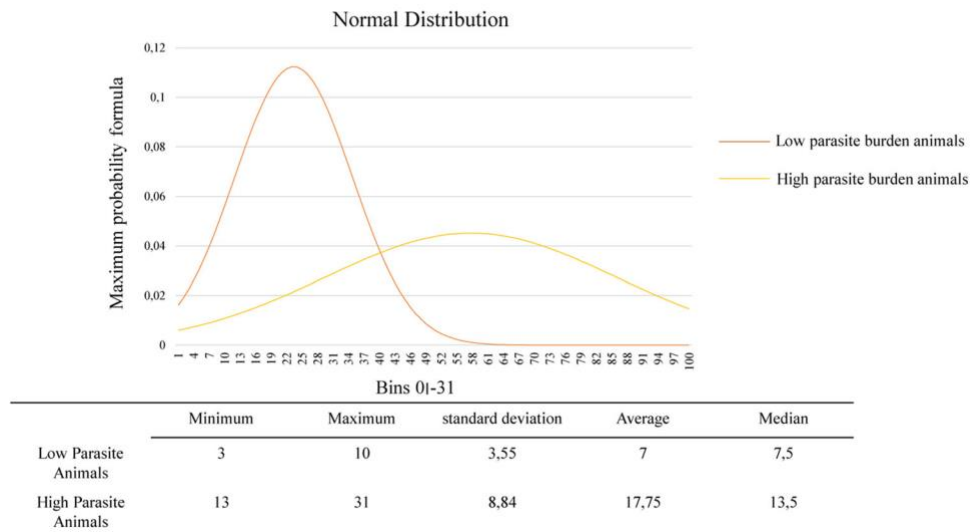


FIGURE 1 Quantification of parasite load was performed counting the number of amastigotes/mm² of each animal. A Gaussian mixture (Normal distribution) was performed resulting in two groups: low and high parasite load

assessed by immunohistochemistry, and of 16 dogs evaluated, eight showed no label (50%), four dogs (25%) showed mild to moderate parasitism, and four dogs (25%) intense parasitism (Table 2).

3.3|*L. infantum* infecting other organs

Fifteen (94%) of the 16 evaluated dogs were positive for *Leishmania* spp. in the skin, spleen, or lymph node by parasitological culture (Table 2). The parasite was isolated by culture from spleen, skin and lymph node in 13 (81%), 12 (75%), and 12 (75%) animals, respectively. All these isolates were identified as *L. infantum* by MLEE.

3.4|Histopathological evaluation

In the thymus of eight dogs positive for *Leishmania* amastigote forms, a granulomatous or pyogranulomatous thymitis was observed: in six dogs (#1, 2, 11, 12, 14, and (E) and two dogs (#6 and 15), respectively. The granulomatous inflammatory infiltrate was poorly de-limited and composed mainly by macrophages with few lymphocytes and plasma cells. The pyogranulomatous inflammatory infiltrate was poorly delimited and composed mainly by macrophages and neutrophils with few lymphocytes and plasma cells. The distribution of the inflammatory infiltrate was multifocal or diffuse and it affected cortical and medullar regions. In one dog (#6), the interlobular trabeculae were thickened due to fibrosis and intense pyogranulomatous inflammatory infiltrate associated with many amastigote forms of *Leishmania* within macrophages (Figure 2C-E). In addition,

involution with replacement by connective and adipose tissues was observed in all dogs. Thymic cysts, lined by ciliated epithelium, were found in four dogs (#2, 6, 12, 1. (Figure 2F). In the thymus of the eight dogs in which *Leishmania* amastigote forms were not detected, thymitis was not observed. All of these eight dogs had involution of thymus and thymic cystis was observed in three dogs (#3, 4, and 13).

3.5|Analysis of cortex:medulla ratio

The cortex:medulla ratio was calculated for each dog and varied from 0.13 to 5.18 mm² (mean \pm SEM: 2.5 \pm 0.35). We did not observe differences in cortex:medulla ratio when groups based on age, clinical signs or parasite load were compared ($P > .05$) (Figure 3).

3.6 | Analysis of thymic extracellular matrix compounds (laminin and fibronectin depositions)

As we had observed amastigotes in the thymus associated with in situ inflammatory reaction, we decided to quantify some components of thymic extracellular matrix, such as laminin and fibronectin. These molecules act as a scaffold to thymus and play a role in the events of T-lymphocyte maturation. Fibronectin and laminin depositions were detected in the thymus from all evaluated dogs and varied from 0.92 to 25.80 area fraction (mean \pm SEM: 12.44 \pm 1.98) and from 1.18 to 19.20 area fraction (mean \pm SEM: 9.06 \pm 1.66), respectively (Figures 4 and 5). Although we did not observe differences when comparing the area

TABLE 2 Description of clinical data and detection of amastigotes in the thymus from *Leishmania infantum*-naturally infected dogs

Dog	Breed	Age, y	Sex	Clinical signs	Amastigotes in thymus (IHC)	Parasite load/mm ²	<i>L. infantum</i> in SK (LN and SP) and PC
1	Mixed-breed	3	M	Alopecia	Positive	13	SK(+), LN(+), and SP(+)
2	Mixed-breed	1	M	Furfuraceous desquamation of skin, thinning, onychogryphosis, and keratoconjunctivitis	Positive	5	SK(+), LN(+), and SP(+)
3	Rottweiler	6	F	Absent	Negative	0	SK(-), LN(-), and SP(-)
4	Mixed-breed	4	F	Alopecia, lymphadenomegaly Onychogryphosis	Negative	0	SK(+), LN(+), and SP(+)
5	Mixed-breed	2	F	Absent	Negative	0	SK(-), LN(-), and SP(+)
6	Cane corso	4	F	Thinning	Positive	14	SK(+), LN(+), and SP(+)
7	Cane corso	2	M	Furfuraceous desquamation of skin, alopecia, cachexia, onychogryphosis, keratoconjunctivitis, lymphadenomegaly, and splenomegaly	Negative	0	SK(+), LN(+), and SP(-)
8	Pinscher	4	M	Absent	Negative	0	SK(+), LN(+), and SP(+)
9	Mixed-breed	3	M	Splenomegaly, lymphadenomegaly	Negative	0	SK(+), LN(-), and SP(-)
10	Mixed-breed	12	F	Absent	Negative	0	SK(-), LN(-), and SP(+)
11	Mixed-breed	2	M	Absent	Positive	13	SK(+), LN(+), and SP(+)
12	Mixed-breed	2	M	Splenomegaly	Positive	03	SK(+), LN(+), and SP(+)
13	Mixed-breed	5	M	Absent	Negative	0	SK(+), LN(+), and SP(+)
14	Mixed-breed	1	M	Furfuraceous desquamation of skin, keratoconjunctivitis, lymphadenomegaly, and hepatomegaly	Positive	10	SK(+), LN(+), and SP(+)
15	Mixed-breed	2	F	Hepatomegaly, skin ulcer, lymphadenomegaly, alopecia, and onychogryphosis	Positive	31	SK(+), LN(+), and SP(+)
16	Mixed-breed	1	M	Absent	Positive	10	SK(-), LN(+), and SP(+)

Abbreviations: IHC, immunohistochemistry; LN, lymph node; PC, parasitological culture; SK, skin; SP, spleen.

TABLE 3 Data description of the sequencing of Leishmania internal -transcribed spacer 1 -(ITS1) gene fragment

Identity animal	Max score	Total score	Query cover, %	Degree of similarity	Evalue	Accession	Sequence similar
1	361	361	83	-6.96	9800E	KY658231.1	L. infantum
2	424	424	99	-00E7.115	98	KY658235.1	L. infantum
3	315	315	74	-5.82	9600E	KY658235.1	L. infantum
4	438	438	99	-00E3.119	99	KY658231.1	L. infantum
6	442	442	91	-2.120	9900E	KY658231.1	L. infantum
7	438	438	82	-00E3.119	99	KY658231.1	L. infantum
9	235	235	54	-3.58	9800E	KY658231.1	L. infantum
10	353	353	83	-00E9.94	99	FJ555210.1	L. infantum
12	207	207	40	-00E1.48	95	FJ497004.1	L. infantum
16	385	385	65	-00E4.103	100	KY658235.1	L. infantum
IOCL579(Reference)	479	479	37	-00E5.131	100	KY658231.1	L. infantum
IOCL566(Reference)	468	468	57	-00E6.128	100	KP274863.1	L. braziliensis

fraction of fibronectin and laminin deposition with the parasite load, we observed that fibronectin deposition was greater in animals presenting more clinical signs ($P = .028$) (Figure 5B). There was a positive correlation between fibronectin deposition and clinical signs (Pearson correlation, $P = .008$; $r = .638$) (Figure 6A). We also observed a negative correlation between laminin deposition and cortex:medulla ratio (Pearson correlation, $P = .016$; $r = -.628$) (Figure 6B).

4 | DISCUSSION

In the present study, the thymuses of 16 dogs were evaluated for the presence of the parasite *L. infantum*. Herein, we detected *Leishmania* DNA by PCR ITS-1 in the thymus from all dogs included in the study and intact amastigotes by immunohistochemistry in 50% of them. The animals showing thymus infection also had parasites in other lymphoid organs such as spleen and lymph nodes. Furthermore, skin infection by *L. infantum* was frequently observed, which suggests that these dogs were potential source of infection for sandy flies.

Histopathological alterations such as granulomatous or pyogranulomatous infiltration were evidenced in the thymuses from eight dogs in which intact amastigotes were visualized in situ. Moreover, dogs presenting more clinical signs showed higher fibronectin depositions in thymus. Altogether, the data suggest the thymus as a site for parasite colonization. Moreover, the alterations in thymic microarchitecture could be associated with inflammatory reactions induced by the parasite in the organ and may influence the antiparasite immune response and disease progression.

The thymic microenvironment is formed mainly by fibronectin and laminin.³⁰ The bone marrow-derived T-cell precursors enter in the thymus by the cortical zone and travel through the thymic microenvironment to finish their maturation.³⁰⁻³² Cell migration is crucial for intrathymic T-cell differentiation induced by chemokines and extracellular matrix components such as fibronectin.³⁰ Parasitic infections lead to thymic changes that may affect the immune response of animals.³³⁻³⁵ In a previous study, amastigotes were evidenced in mice experimentally infected with *L. infantum*, and the thymuses of those animals exhibited increased weight and significant alterations in chemokine levels.³⁵ Morrot et al³³ studying an experimental acute infection by *Trypanosoma cruzi*, observed massive thymocyte depletion and abnormal release of immature CD4(+)CD8(+) cells to peripheral lymphoid organs, where they acquired an activated phenotype similar to activated effector or memory T cells. They suggested that, in this model, these cells

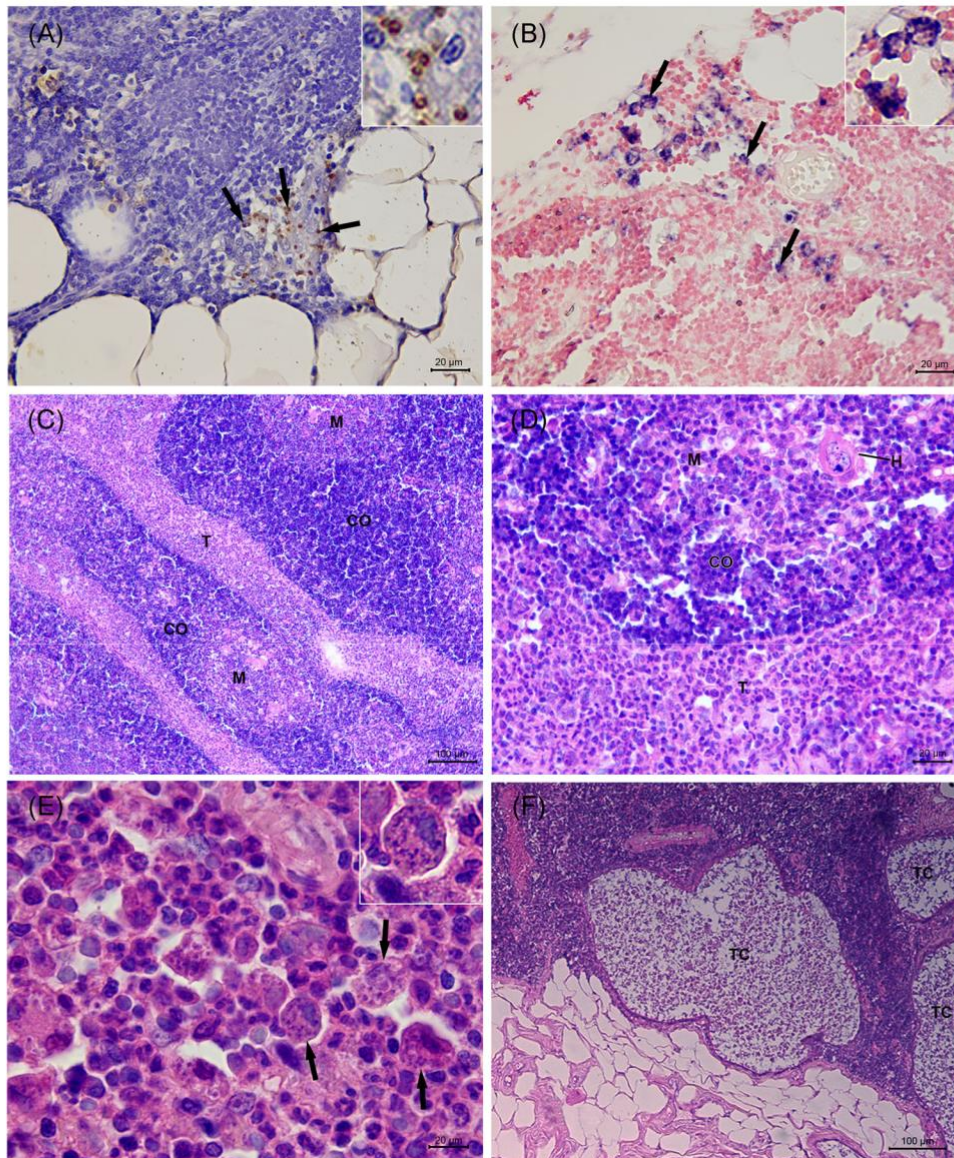


FIGURE 2 Histopathological evaluation of the thymus from *Leishmania infantum*-naturally infected dogs. A, Brown-stained amastigote forms of *Leishmania* spp. (arrow and inset) in the cytoplasm of macrophages (immunohistochemistry). B, Blue-stained amastigote forms of *Leishmania* spp. (arrow and inset) in the cytoplasm of macrophages (in situ hybridization). C, Thymitis showing thickening of the interlobular trabeculae due to fibrosis and to an intense pyogranulomatous inflammatory infiltrate (HE). D, Detail of (C) showing an intense pyogranulomatous inflammatory infiltrate in the interlobular trabeculae. E, Detail of (D) showing an intense and poorly formed pyogranulomatous inflammatory infiltrate in the interlobular trabeculae composed mainly by macrophages and neutrophils with few lymphocytes and plasma cells. Several amastigote forms of *Leishmania* spp. (arrow and inset) are observed within the cytoplasm of macrophages (HE). F, Thymic cysts lined by ciliated epithelium in the parenchyma (HE). C, cortex; H, Hassall's corpuscle; HE, hematoxylin and eosin; M, medulla, T, interlobular trabecula; TC, thymic cyst

escaped from the negative selection process, and some of them became potentially autoimmune.³³ They also observed atrophy of mesenteric lymph nodes, in contrast with lymphocyte expansion in spleen and subcutaneous lymph nodes, illustrating a complex and organ-specific dynamics of lymphocyte subpopulations.³³ Herein, we observed inflammatory reaction and alterations in fibronectin depositions in infected dogs. Since the cortical region is the area where immature lymphocytes migrate

while they receive the stimuli for their maturation, the data suggest that *Leishmania* infection could modify the regular functionality of thymus. In fact, lymphopenia, splenomegaly, and lymphadenopathy have been de-scribed in canine visceral leishmaniasis (CVL), as well as microarchitecture disruption of both spleen and lymph nodes.^{8,36,37} Although the presence of amastigotes in spleen and lymph nodes can produce local inflammatory alterations, based on our data, we cannot discard the

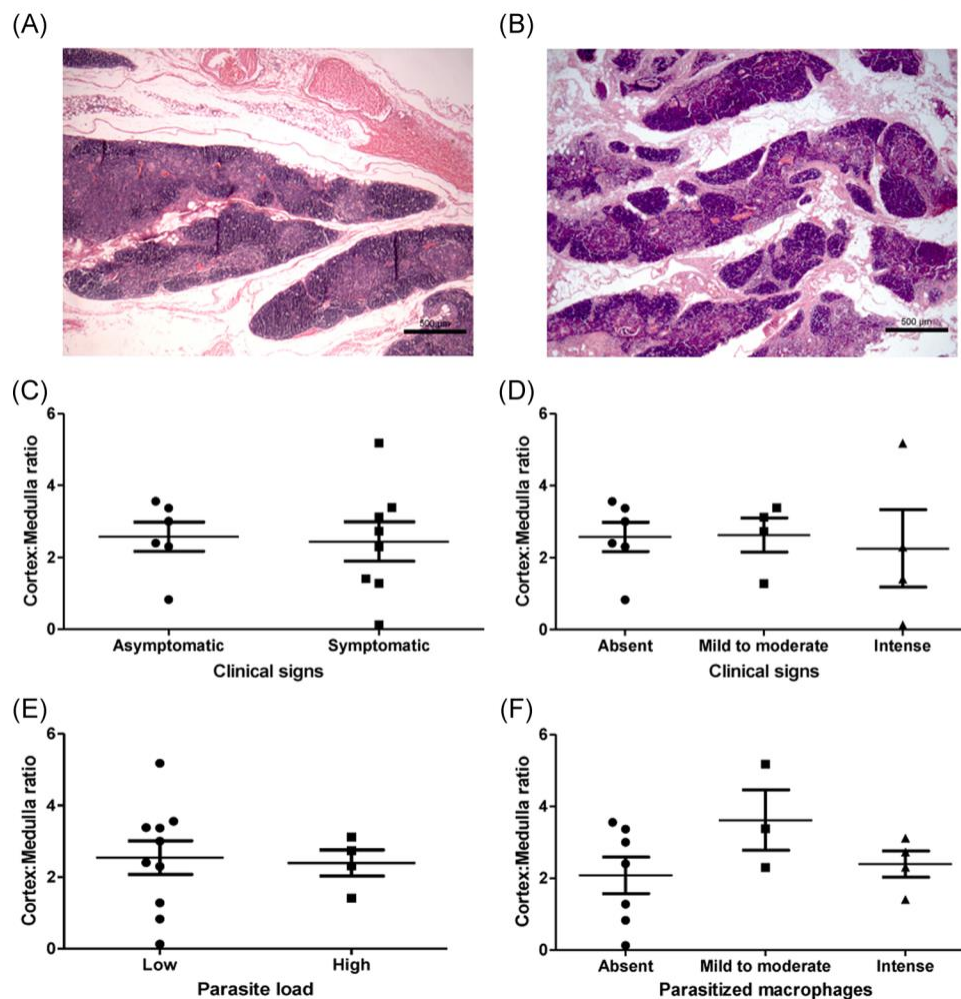


FIGURE 3 Analysis of the cortex:medulla ratio of the thymus from *L. infantum*-naturally infected dogs. A,B, Representative images of the cortex:medulla ratio observed in two animals. C,D, Comparison of cortex:medulla ratio between groups according to clinical signs. E,F, Comparison of cortex:medulla ratio between groups according to parasite load

possible contribution of immature lymphocytes released from the thymus to the described tissue alterations. Therefore, other analyses should be done to verify this hypothesis.

In our study, the animals were in the adult phase and we observed involution of thymus in all of them. In dogs, the complete development of thymus occurs at 2 months of age, entering into a process of involution after 6 months of age, but maintaining its activity during the animal's life and acting as a modulator of other lymphoid organs.¹⁸ From 1-year-old, the adipose tissue becomes more evident with small islands of remaining thymic tissue,¹⁸ which may persist until the old age. In fact, we observed the islands of remaining thymic tissue in one 12-year-old dog. These islands had all cell populations as observed in the thymus from young animals but in smaller numbers.¹⁸ So, it is reasonable to think that due to infection by *Leishmania* and consequent tissue damage observed in the thymus, the maturation of lymphocytes

could be altered in these thymic islands and might contribute to the immunopathology of secondary lymphoid organs in CVL. Although the reminiscent thymus maintains thymocyte maturation over the whole life of the animal, the effect of thymic infection in the course of leishmaniasis would be more severe in pups, since there is intense thymus activity and immunological maturation in young animals. Thus, studies focused on the thymus of young dogs would better clarify this hypothesis.

Regarding the alterations observed in thymic extracellular matrix compounds, fibronectin interconnecting segment domain can be recognized by receptors expressed in macrophages favoring the invasion of parasites and reducing the activation of macrophages.³⁸⁻⁴¹ In fact, the thymus is an organ that harbors a significant number of TGF- β (transforming growth factor- β)-producing macrophages that act as professional scavengers of apoptotic cells resulting from the regular process of negative selection.^{42,43} Due to selection processes,

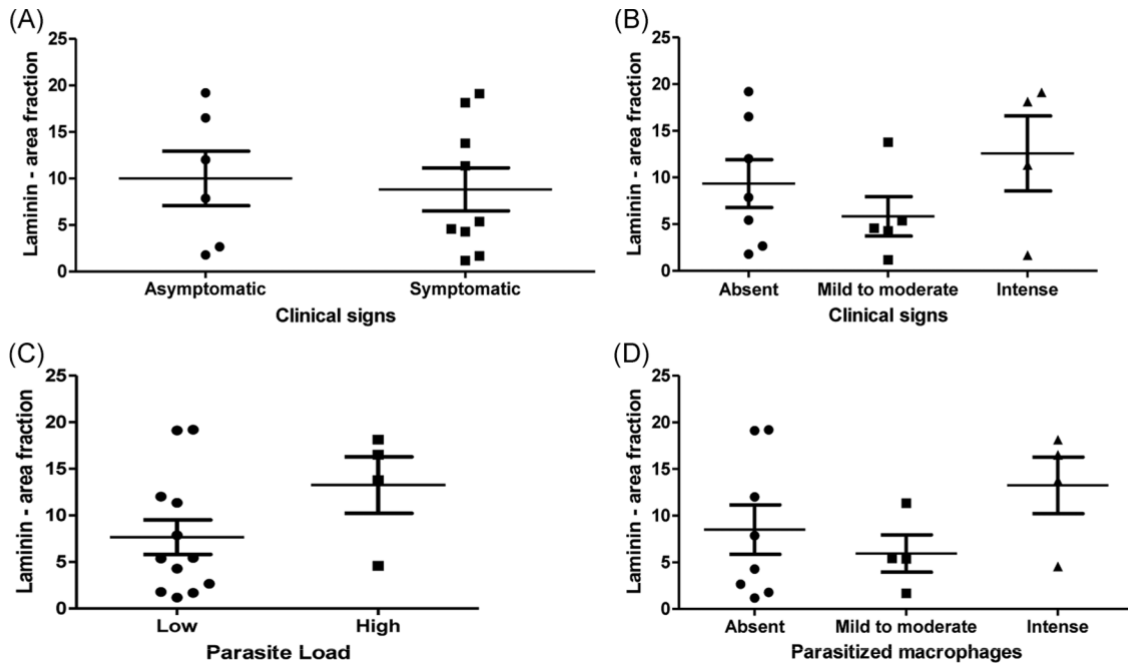


FIGURE 4 Analysis of laminin deposition in the thymus from *L. infantum*-naturally infected dogs. A,B, Comparison of laminin deposition between groups according to clinical signs. C,D, Comparison of laminin deposition between groups according to parasite load

95% of all the thymocytes formed die and are submitted to clearance by macrophages.⁴⁴ Although classically activated macrophages (M1-NOS2 and TNF- α [tumor necrosis factor- α] producer cells) play a role in parasite killing,⁴⁵ the professional scavenger macrophages observed in thymus could act as a site for *Leishmania* persistence. In fact, we previously observed F4/80+ cells colocalizing with parasites in the thymus of *L. infantum*-infected mice.³⁵ In the infected dogs, the amastigotes

were observed inside macrophages located at the cortical and medullary regions.

The higher expression of extracellular matrix molecules such as laminin, collagen, and fibronectin in animals with more clinical signs has been demonstrated in lymphoid organs such as spleen and lymph node, and also in the liver.^{8,9,14,37,40} In our study, we observed a positive correlation between clinical score and fibronectin deposition. This data suggests a remodeling process of

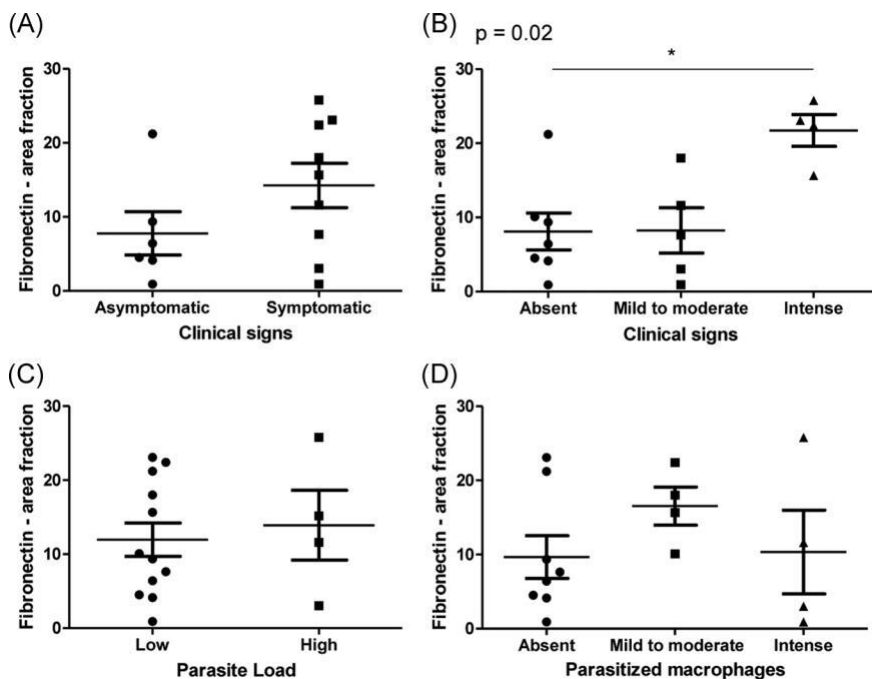
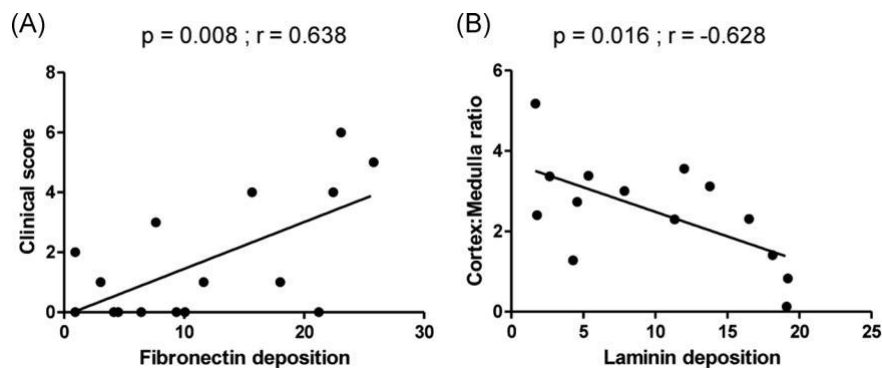


FIGURE 5 Analysis of fibronectin deposition in the thymus from *L. infantum*-naturally infected dogs. A,B, Comparison of fibronectin deposition between groups according to clinical signs. C,D, Comparison of fibronectin deposition between groups according to parasite load

FIGURE 6 Correlations between (A) fibronectin deposition and clinical score and (B) laminin deposition and cortex:medulla ratio (Pearson correlation)



the thymic extracellular matrix probably due to the inflammatory process induced by the presence of the parasite in this organ. The parasite disseminates through various organs, causing inflammatory process, extracellular matrix changes and tissue damage leading to organic dysfunctions, and consequently, the appearance of clinical signs. However, further studies should be performed to elucidate this hypothesis.

The lack of correlation between fibronectin expression and cortex/medulla ratio can be explained by the large variability in measurements of these areas due to the age differences of the evaluated dogs. There are several factors that may influence the thymus histological patterns: diabetes,⁴⁶ infections,³⁴ malnutrition,³⁵ and age.^{16,18} It is well-described that the thymus suffers involution throughout the life of the animal accompanied by the reduction of the cortex.^{16,18} Laminin, in turn, correlated inversely with the cortex/medulla ratio. Laminin is more concentrated in the medullary region, and therefore, the larger the cortical area, the lower the laminin expression. This correlation probably occurred due to age-related differences but not to the infectious process itself.

Taken together, these results demonstrate that the thymus of dogs can be parasitized by *L. infantum*, which may generate inflammatory reactions leading to alterations in thymic microarchitecture. These alterations probably compromise the maturation of T lymphocytes in the thymus favoring the failure of the immune response in infected dogs.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the administrative staff at Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose (LPL-IOC/FIOCRUZ) and Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatose em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO-INI/FIOCRUZ). This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (PC Universal grant No. 421223/2018-9), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Rio de Janeiro- FAPERJ (E-26/010.001018/2016), and PAEF-Fiocruz;

IOC-FIOCRUZ, Programa Cientista do Nosso Estado (Faperj E-26/203.069/2016), Programa Jovem Cientista do Nosso Estado (Faperj E-26/202.760/2019). RCM and FBF received productivity fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. We also thank the Programa Print-Capes for financial support. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there are no conflict of interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RCM, FNM, and RP conceived and designed the research; AVAS, TLS, FBF, AAVMJ, LCF, CPBF, and PC performed the experiments; AVAS, TLS, RP, RCM, and FNM prepared the figures and wrote the manuscript; AVAS, TLS, RCM, and FNM analyzed the data; AVAS, T.L.S, RP, RCM, and FNM edited the manuscript; and AVAS, TLS, FBF, AAVMJ, LCF, CPBF, PC, RP, RCM, and FNM revised and approved the final manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Fernanda N. Morgado  <http://orcid.org/0000-0002-7188-251X>

REFERENCES

1. Werneck GL. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. *Rev Saude Publica.* 2014; 48:851-856.

2. Borja LS, Sousa OMF, Solcà MS, et al. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. *Vet Parasitol.* 2016;229:110-117.
3. Koutinas AF, Koutinas CK. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Vet Pathol.* 2014;51:527-538.
4. Haley PJ. The lymphoid system: a review of species differences. *J Toxicol Pathol.* 2017;30:111-123.
5. Cavalcanti AS, Ribeiro-Alves M, Pereira LOR, et al. Parasite load induces progressive spleen architecture breakage and impairs cytokine mRNA expression in *Leishmania infantum*-naturally infected dogs. *PLOS One.* 2015;10:e0123009.
6. Lima IS, Silva JS, Almeida VA, et al. Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp. *PLOS One.* 2014;9:e87742.
7. Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009;128:87-95.
8. Silva LC, Castro RS, Figueiredo MM, Michalick MSM, Tafuri WL, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease. *Int J Exp Pathol.* 2013;94:133-143.
9. Silva JS, Andrade AC, Santana CC, et al. Low CXCL13 expression, splenic lymphoid tissue atrophy and germinal center disruption in severe canine visceral leishmaniasis. *PLOS One.* 2012;7:e29103.
10. Silva-O'Hare J, de Oliveira IS, Klevorn T, et al. Disruption of splenic lymphoid tissue and plasmacytosis in canine visceral leishmaniasis: changes in homing and survival of plasma cells. *PLOS One.* 2016;11:e0156733.
11. Sanches FP, Tomokane TY, Da Matta VLR, Marcondes M, Corbett CEP, Laurenti MD. Expression of inducible nitric oxide synthase in macrophages inversely correlates with parasitism of lymphoid tissues in dogs with visceral leishmaniasis. *Acta Vet Scand.* 2014;56:57.
12. Keenan CM, Hendricks LD, Lightner L, Webster HK, Johnson AJ. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Vet Pathol.* 1984;21:74-79.
13. Sanchez MA, Diaz NL, Zerpa O, Negron E, Convit J, Tapia FJ. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;70:618-624.
14. Santana CC, Vassallo J, de Freitas La R, Oliveira GGS, Pontes-de-Carvalho LC, dos-Santos WLC. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. *Parasite Immunol.* 2008;30: 515-524.
15. Ruddle NH, Akirav EM. Secondary lymphoid organs: responding to genetic and environmental cues in ontogeny and the immune response. *J Immunol.* 2009;183:2205-2212.
16. Lynch HE, Goldberg GL, Chidgey A, van den Brink MRM, Boyd R, Sempowski GD. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol.* 2009;30:366-373.
17. Milićević NM, Milićević Ž. Metallophilic macrophages of the rodent thymus. *Prog Histochem Cytochem.* 2013;48:1-46.
18. Agreste FR, Moriconi PR, Barreto-Vianna ARC, Santos-Leonardo A, Bombonato PP. Is the vascular growth curve of thymus of dogs (*Canis familiaris*) time-dependent? *Aust J Basic Appl Sci.* 2013;7:334-342.
19. de Mello CX, Figueiredo FB, Mendes AAV Júnior, Furtado MC, de Miranda LFC, Fatima Madeira M. Outbreak of canine visceral leishmaniasis in Barra Mansa, State of Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47:788-790.
20. Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJS, et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutic and epidemiological findings (1977-1983). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1985;80:349-357.
21. de Queiroz NMGP, da Silveira RCV, de Noronha ACF, Oliveira TMFS, Machado RZ, Starke-Buzetti WA. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. *Vet Parasitol.* 2011;178:1-8.
22. Madeira MF, Figueiredo FB, Pinto AGS, et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Is intact skin a good target? *Res Vet Science.* 2009;87:260-262.
23. Cupolillo E, Grimaldi G, Momen H. A general classification of new world leishmania using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;50:296-311.
24. Boechat VC, Mendes Junior AAV, Madeira MF, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* and associated histological alterations in the genital tract and mammary glands of naturally infected dogs. *Parasitol Res.* 2016;115:2371-2379.
25. Schönián G, Nasereddin A, Dinse N, et al. PCR diagnosis and

- characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;47:349-358.
26. el Tai NO, Osman OF, el Fari M, Presber W, Schönian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000;94:575-579.
 27. Menezes RC, Figueiredo FB, Wise AG, et al. Sensitivity and specificity of in situ hybridization for diagnosis of cutaneous infection by *Leishmania infantum* in dogs. *J Clin Microbiol*. 2013;51:206-211.
 28. Oliveira VC, Boechat VC, Mendes AAV Junior, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* in the central nervous system of naturally infected dogs: Parasite load, viability, co-infections and histological alterations. *PLOS One*. 2017;12:e0175588.
 29. Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Silva JS, Dardenne M, Cotta-de-Almeida V. Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? *Trends Immunol*. 2002;23:305-313.
 30. Savino W, Dardenne M. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocr Rev*. 2000;21:412-443.
 31. Mendes-da-Cruz DA, Smaniotto S, Keller AC, Dardenne M, Savino W. Multivectorial abnormal cell migration in the NOD mouse thymus. *J Immunol*. 2008;180:4639-4647.
 32. Morrot A, Barreto de Albuquerque J, Berbert LR, de Carvalho Pinto CE, de Meis J, Savino W. Dynamics of lymphocyte populations during trypanosoma cruzi infection: from thymocyte depletion to differential cell expansion/contraction in peripheral lymphoid organs. *J Trop Med*. 2012;2012:747185.
 33. de Meis J, Aurélio Farias-de-Oliveira D, Nunes Panzenhagen PH, et al. Thymus atrophy and double-positive escape are common features in infectious diseases. *J Parasitol Res*. 2012;2012:574020-574029.
 35. Losada-Barragán M, Umaña-Pérez A, Cuervo-Escobar S, et al. Protein malnutrition promotes dysregulation of molecules involved in T cell migration in the thymus of mice infected with *Leishmania infantum*. *Sci Rep*. 2017;7:45991.
 36. de Vasconcelos TCB, Doyen N, Cavaillon J-M, et al. Cytokine and iNOS profiles in lymph nodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* and their association with the parasitic DNA load and clinical and histopathological features. *Vet Parasitol*. 2016;227:8-14.
 37. da Silva AVA, Figueiredo FB, Menezes RC, 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 Negl Trop Dis*. 2018;12:e0006445.
 38. Korom S, Hancock WW, Coito AJ, Kupiec-Weglinski JW. Blockade of very late antigen-4 integrin binding to fibronectin in allograft recipients. II. Treatment with connecting segment-1 peptides prevents chronic rejection
 39. by attenuating arterio-sclerotic development and suppressing intragraft T cell and macrophage activation. *Transplantation*. 1998;65:854-859.
 40. Kulkarni MM, Jones EA, McMaster WR, McGwire BS. Fibronectin binding and proteolytic degradation by *Leishmania* and effects on macrophage activation. *Infect Immun*. 2008;76:1738-1747.
 41. Melo FA, Moura EP, Ribeiro RR, et al. Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Int J Exp Pathol*. 2009;90:538-548.
 42. Walker DM, Oghumu S, Gupta G, McGwire BS, Drew ME, Satoskar AR. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71:1245-1263.
 42. Wakimoto T, Tomisaka R, Nishikawa Y, Sato H, Yoshino T, Takahashi K. Identification and characterization of human thymic cortical dendritic macrophages that may act as professional scavengers of apoptotic thymocytes. *Immunobiology*. 2008;213:837-847.
 43. Wahl SM, Orenstein JM, Chen W. TGF-beta influences the life and death decisions of T lymphocytes. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2000;11:71-79.
 44. Sarang Z, Garabuczi É, Joós G, et al. Macrophages engulfing apoptotic thymocytes produce retinoids to promote selection, differentiation, removal and replacement of double positive thymocytes. *Immunobiology*. 2013;218:1354-1360.
 45. Díaz-Gandarilla JA, Osorio-Trujillo C, Hernández-Ramírez VI, Talamás-Rohana P. PPAR activation induces M1 macrophage polarization via cPLA₂-COX-2 inhibition, activating ROS production against *Leishmania mexicana*. *BioMed Res Int*. 2013;2013:215283.
 46. Nagib PR, Gameiro J, Stivanin-Silva LG, et al. Thymic microenvironmental alterations in experimentally induced diabetes. *Immunobiology*. 2010;215(12):971-979. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.02.001>
- How to cite this article: da Silva AVA, de Souza TL, Figueiredo FB, et al. Detection of amastigotes and histopathological alterations in the thymus of *Leishmania infantum*-infected dogs. *Immun Inflamm Dis*. 2020;1-13.
- How to cite this article: da Silva AVA, de Souza TL, Figueiredo FB, et al. Detection of amastigotes and histopathological alterations in the thymus of *Leishmania infantum*-infected dogs. *Immun Inflamm Dis*. 2020;1-13.
- <https://doi.org/10.1002/iid3.285>
<https://doi.org/10.1002/iid3.285>

Nota de retratação Artigo II: “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

Publicado em Fevereiro 16, 2018 na revista PlosNeglected Tropical Disease.

Autores: ^[1] da Silva AVA, Figueiredo FB, Menezes RC, Mendes-Junior AA, de Miranda LHM, Cupolillo E, et al. (2018) 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 Negl Trop Dis 12(4): e0006445. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006445> pmid:29677186

“Depois que este artigo [1] foi publicado, surgiram preocupações sobre regiões de similaridade nas imagens de microscopia na Fig 2.

Especificamente:

Parece haver semelhanças entre regiões adjacentes no canto inferior direito da Fig 2A.

Parece haver semelhanças entre várias regiões na Fig 2C.

Parece haver semelhanças entre várias regiões dentro da Fig 2F.

Parece haver semelhanças entre várias regiões dentro da Fig 2G.

Um conjunto de imagens subjacentes para os painéis A-M da Fig. 2 foi fornecido.

O autor correspondente foi sincero e cooperativo durante todo o processo, mas à luz das questões acima, que levantam preocupações sobre a confiabilidade dos resultados e dados relatados, os Editores da PLOS Neglected Tropical Disease retratam este artigo.

AVAS, RCM, LHMM, EC, RP e FNM concordaram com a retratação e AVAS e FNM pedem desculpas pelos problemas com o artigo publicado. AVAS, RP e FNM mantêm as conclusões do artigo. FBF e AAM não puderam ser alcançados.”

Referência/Retratação: PLoS Negl Trop Dis. 2022 Feb 16;16(2):e0010225

Artigo II: 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

Artigo Retratado Vide nota na página 61 desta tese

Aurea Virginia Andrade da Silva^{1,2}, Fabiano Borges Figueiredo^{3a}, Rodrigo Caldas Menezes³, Arthur Augusto Mendes-Junior³, Luisa Helena Monteiro de Miranda³, Elisa Cupolillo¹, Renato Porrozzi^{1e}, Fernanda Nazare^{1e*} Morgado^{1e*}

1 Laboratório de Pesquisas em Leishmaniose, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, 2 Graduate student of the Masters Program in Cellular and Molecular Biology, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, 3 Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Resumo

O baço é um dos principais órgãos afetados na Leishmaniose visceral canina (LVC). A desorganização da polpa branca do baço (SWP) tem sido associada à imunossupressão e progressão da doença. Este estudo teve como objetivo avaliar as alterações estruturais e celulares na matriz extracelular esplênica de cães com LVC, correlacionando essas alterações com a carga parasitária e sinais clínicos. Fragmentos esplênicos foram coletados de 41 animais naturalmente infectados para quantificação da carga parasitária por PCR quantitativo, análise histopatológica e imunistoquímica para células T CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺; Células B CD21⁺; Células Ki-67⁺, IFN- γ ⁺ e IL-10⁺; e as enzimas MMP-9 e ADAM-10. A deposição de laminina, colágeno e fibronectina também foi avaliada. Os animais foram agrupados de acordo com o nível de organização da SWP. A desorganização da SWP foi acompanhada por uma redução na quantidade de folículos linfóides/mm² (p > 0,0001). Animais com desorganização moderada a intensa da SWP apresentaram mais sinais clínicos (p = 0,021), maior deposição de laminina (p = 0,045) e colágeno (p = 0,036), maior expressão de MMP-9 (p = 0,035) e menor número de células T CD4⁺ (p = 0,027) no baço do que nos animais com SWP organizada. Esses dados sugerem que a estrutura e função esplênicas são drasticamente alteradas e comprometidas durante a LVC.

RESEARCH ARTICLE

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



Aurea Virginia Andrade da Silva^{1,2}, Fabiano Borges Figueiredo³[✉], Rodrigo Caldas Menezes³, Arthur Augusto Mendes-Junior³, Luisa Helena Monteiro de Miranda³, Elisa Cupolillo¹, Renato Porrozzi¹[✉], Fernanda Nazare Morgado¹^{✉*}

1 Laboratório de Pesquisas em Leishmaniose, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, 2 Graduate student of the Masters Program in Cellular and Molecular Biology, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, 3 Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

OPEN ACCESS

Citation: da Silva AVA, Figueiredo FB, Menezes RC, Mendes-Junior AA, de Miranda LHM, Cupolillo E, et al. (2018) 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 Negl Trop Dis 12(4): e0006445. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006445>

Editor: Albert Descoteaux, Institut national de la recherche scientifique, CANADA

Received: October 11, 2017

Accepted: April 11, 2018

Published: April 20, 2018

Copyright: © 2018 da Silva et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: We received financial support from APQ1 (Faperj – E-26/010.001018/2016); Universal – CNPq (448951/2014-2); PAEF-Fiocruz; IOC-FIOCRUZ, Programa Cientista do Nosso Estado (Faperj –E-26/203.069/2016). RP, EC, RCM and

[✉] These authors contributed equally to this work.

[✉] Current address: Laboratório de Biologia Celular, Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Curitiba, Parana, Brazil.

* morgado@ioc.fiocruz.br

Abstract

The spleen is one of the main affected organs in canine visceral leishmaniasis (CVL). Disorganization of the splenic white pulp (SWP) has been associated with immunosuppression and disease progression. This study aims to assess structural and cellular changes in the splenic extracellular matrix of dogs with CVL, correlating these changes with the parasite load and clinical signs. Splenic fragments were collected from 41 naturally infected animals for parasite load quantification by quantitative PCR, histopathological analysis and immuno-histochemistry for CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ T cells; CD21⁺ B cells; Ki-67⁺, IFN-γ⁺, and IL-10⁺ cells; and the MMP-9 and ADAM-10 enzymes. Laminin, collagen and fibronectin deposition were also evaluated. The animals were grouped according to the level of SWP organization. SWP disorganization was accompanied by a reduction in the quantity of lymphoid follicles/mm² (p > 0.0001). Animals with moderate to intense SWP disorganization showed more clinical signs (p = 0.021), higher laminin (p = 0.045) and collagen deposition (p = 0.036), higher MMP-9 expression (p = 0.035) and lower numbers of CD4⁺ T cells (p = 0.027) in the spleen than the animals with organized SWP. These data suggest that splenic structure and function are drastically altered and compromised during CVL.

FBF receive productivity fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Author summary

Infected dogs play important roles in the transmission of visceral leishmaniasis. These dogs are considered reservoirs of parasites in urban areas and fail to mount an efficient anti-*Leishmania* immune response. However, the specific immunosuppression profile is not completely understood. In our report, we evaluate and discuss the morphophysiological alterations in the spleens of dogs with visceral leishmaniasis. We found an association between extracellular matrix alterations and a failure to control the parasite load. We suggest a role for these alterations in hindering an immune response that is otherwise able to control the parasite load, thereby leading to disease progression. Our research contributes to the current knowledge of the immunopathology of canine visceral leishmaniasis.

Introduction

In Brazil, visceral leishmaniasis is caused by *Leishmania infantum*, and the domestic dog is the main urban reservoir[1]. Additionally, dogs have been used as models for the study of human disease[2] because disease progression in dogs is similar to that in humans[3].

Concerning the immune response in canine visceral leishmaniasis (CVL), susceptible animals have a remarkably attenuated humoral and cellular immune response against the parasite, resulting in the appearance of clinical signs[2]. Although the cytokine expression profile has also been associated with disease resistance or progression to CVL[4], the data regarding cytokine expression in the spleen remain controversial[1,5,6].

The spleen is the key organ responsible for removing damaged and senescent cells from blood circulation. The adaptive immune responses against the pathogens captured from the blood begin in this organ[7]. The composition of the spleen is based on two structures: the red pulp and the white pulp, an area rich in T and B lymphocytes. Additionally, cells that are highly specialized in antigenic presentation are found in this organ. The white pulp exhibits an organization in which it is wrapped around central arterioles, which are branches of the artery[7]. Multiple molecules, namely, laminin, fibronectin and collagen, are important proteins that constitute the basal and interstitial membranes of this organ and are fundamental to the structuring and maintenance of the white pulp, contributing to the upkeep of cellular compartmentalization. These proteins also contribute to the cellular communication and transport of cytokines and chemokines through structures known as sinusoids and conduits, which comprise type IV collagen, laminin and reticular fibroblasts[8–10]. Differences in the localizations of extracellular matrix (ECM) molecules in the spleen suggest that the ECM plays a role in the compartmentalization of immune cells to their respective niches, and clearly, future analyses of ECM animal models require the consideration of possible immunological defects[10].

The spleen is among the main organs affected by CVL and is responsible for the immune response to systemic infection; however, knowledge on the pathogenic mechanisms involved is limited. Splenic microarchitecture disruption in infected dogs has been associated with fibrosis and disease progression[11,12]. The increased deposition of laminin, fibronectin and collagen in the livers of naturally infected dogs, with a concomitant decrease in T lymphocytes and an increase in the parasite load, has been described elsewhere[13]. Still, the structural changes of the splenic ECM are accompanied by reductions in the mRNA expression levels of chemokines and their receptors[14]. These authors have suggested that the failure to express these molecules may lead to deficient leukocyte migration, hampering the development of an efficient immune response. Although metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9), which are enzymes that degrade ECM compounds, have already been demonstrated in the sera of

naturally infected dogs[15], their activities in tissues, particularly in the spleens of infected dogs, have not been evaluated. We hypothesized that changes in the organization of splenic white pulp (SWP) could be accompanied by alterations in ECM molecule deposition, metallo-peptidase activity and lymphocyte distribution, thereby affecting the immune response and resulting in failure to control the parasite, especially during the final stages of the disease. Thus, the aim of the present study was to examine alterations to splenic ECM compounds through the analysis of collagen, laminin and fibronectin deposition and metalloproteinase expression (MMP-9, ADAM-10) in groups of animals showing different degrees of SWP organization. Additionally, we aimed to describe and compare the distributions and quantities of T and B lymphocytes in their segregated areas, proliferation markers (Ki-67) and cytokine expression (IFN- γ and IL-10) in these groups. Herein, the disorganized SWP from dogs naturally infected with *L. infantum* showed a higher deposition of ECM compounds, namely, laminin and collagen, and higher MMP-9 *in situ* expression than the organized SWP. These alterations were associated with reductions in lymphocyte niches and the frequency of CD4⁺ cells.

Methods

Ethics statement

The animals included in this study were *L. infantum*-naturally infected dogs that were destined for euthanasia as recommended by the politics of the Brazilian Ministry of Health and after all owners of the dogs had provided formal written consent. The samples were collected during necropsies conducted by veterinarians from the Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermato-zoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO-INI/FIOCRUZ) approved by

Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA—Fiocruz) under the license LW-54/13 and according to the Brazilian Law 11794/08 and Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Animals and clinical evaluation

Forty-one dogs from Barra Mansa- (Rio de Janeiro, Brazil), obtained from a convenience sampling, diagnosed with CVL were included in this study. Later, the animals were grouped according to the level of SWP organization. The primary diagnosis was performed by Centro de Controle de Zoonoses da Secretaria Municipal de Barra Mansa using the CVL DPP test (Bio-Manguinhos-FIOCRUZ) as the screening test and ELISA (EIE—Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos) as the confirmatory test. In addition, the infection was confirmed by parasite isolation, and all animals were associated with positive cultures in NNN/Schneider's biphasic medium at 25°C.

The animals included in the study were negative for the most common hemoparasitoses with Fuller Kit (Eurovet—Babesia canis) and Snap 4DX Plus Test (IDEXX -Anaplasma/Ehrlichia/Lyme/Heartworm). All dogs with coinfections (hemoparasitosis and leishmaniasis) were excluded from this study.

Clinical evaluations were performed by two veterinarians according to the clinical score adapted elsewhere[16,17]. Shortly, six common clinical signs (dermatitis, onychogryphosis, keratoconjunctivitis, the body condition, alopecia and lymphadenopathy) were scored on a semiquantitative scale from 0 (absent) to 3 (severe). Body condition was classified as 0 (Ideal: easily palpable ribs with minimal fat around, waist easily seen from above and evident abdominal silhouette), 1 (Thin: ribs easily palpable and may be visible without palpable fat, the top of the lumbar region is visible, prominent pelvic bones, silhouette of waist and abdomen apparent), 2 (Very thin: Ribs, lumbar and pelvic bones are easily visible, absence of palpable fat,

evidence of other bony prominences and minimal muscle loss) and 3 (Extremely thin: All bony structures are prominent and in evidence at a distance, no discernible body fat and severe loss of muscle mass). None of the evaluated animals showed obesity. The sum of the values was used to determine the final clinical classification as low (0–2), moderate (3–6) or high (7–18) score. After clinical examination, euthanasia was conducted by veterinarians from the LAP-CLIN-DERMZOO by intravenously administering 1.0 ml/kg 1.0% Thiopental (Thiopentax, Cristália). After the absence of a corneal reflex due to deep anesthesia was detected, 10 ml of 19.1% potassium chloride was intravenously administered (Isofarma). During necropsy, tissue samples from the spleen were collected into sterile DNA-free polypropylene tubes and frozen at -20°C until further use.

DNA extraction

Total DNA was extracted from approximately 10 mg of each spleen sample. The DNA extraction was performed using the QIAmp DNA Mini kit (Qiagen, CA, USA), which included an initial phase of digestion with 20 µl of proteinase K (20 mg/mL) for 1 hour at 56°C. The DNA was dissolved in 50 µl of tris EDTA buffer (AE buffer) and quantified with the NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, USA).

Determination of *Leishmania* load by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

The parasite loads in the spleen samples were estimated by quantitative PCR (qPCR) as previously described by Cavalcanti and collaborators[17]. HPRT primers (Supplementary S1 Table) were used to normalize the concentrations of canine DNA in each sample. To quantify the parasite load, primers (S1 Table) described by Prina and collaborators[18] were used to amplify a product corresponding to the small subunit ribosomal RNA (ssrRNA, multicopy gene). The qPCR reactions were run with the Step One equipment (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc.) using the detection system Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc.). Total purified DNA (100 ng) in 2 µl was added to a final PCR reaction volume of 20 µl containing 1X Power SYBR Green and 300 nM of each primer for HPRT or 500 nM of each primer for ssrRNA PCR. qPCR was performed with an activation step at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of denaturation and annealing/extension (95°C for 15 seconds, 60°C for 1 minute and 68°C for 30 seconds). A melt curve stage was performed for each specific amplification analysis (95°C for 15 seconds, 60°C for 1 minute and 95°C for 15 seconds). All reactions were performed in duplicate for each target, and both targets were run in the same plate for the same sample. Quantifications of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from non-infected dogs and *L. infantum* promastigotes (MCAN/BR/2007/CG-1) were performed using a cell counter (Z1 COULTER COUNTER, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), and total DNA was extracted from 1.0×10^6 PBMCs and 1.0×10^7 promastigotes. Standard curves for HPRT and ssrRNA genes were prepared using serial 10-fold dilutions from 10^{-2} to 10^7 of total purified DNA. The animals were grouped as high or low parasite burden (cutoff: 5.5×10^4 parasites/ 10^6 host cells) as described by Cavalcanti et al[17].

Histopathology

The spleen fragments were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin and cut into 5-µm-thick sections that were mounted on microscope slides. The sections were stained with hematoxylin and eosin and examined by light microscopy (Nikon Eclipse E400 –Tokyo, Japan). Structural changes to spleen lymphoid tissues were analyzed as previously described[19].

The parameters analyzed were as follows: the presence of granulomas and the degree of the

structural organization of the white pulp (1, *organized*—the presence of a distinct periarteriolar lymphocyte sheath, germinal center, mantle zone and marginal zone; 2, *slightly disorganized*—the presence of either hyperplastic or hypoplastic changes leading to a loss in the definition of any region of the white pulp; 3, *moderately disorganized*—evident white pulp with poorly individualized or indistinct regions; and 4, *intensely disorganized*—a follicular structure that was barely distinct from the red pulp and T cell areas). The number of lymphoid follicles was determined as lymphoid follicles/mm² of tissue in tissues sections using Nikon ACT-1 software version 2.62 (Nikon). Well-formed granulomas were characterized by the presence of epithelioid cells and well-established limits. Collagen deposits were quantified in picrosirius red-stained tissue using ImageJ 1.48v software (NIH, USA). Since the parameters evaluated did not differ infected dogs presenting organized SWP from those of uninfected dogs, animals presenting organized SWP were considered as the reference for comparisons between groups.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was based on the method reported by Morgado and collaborators[20]. Briefly, spleen fragments frozen in OCT resin (Sakura) were cut into 3–5 μm-thick sections and mounted onto microscope slides (silanized slides; DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA). The slides were fixed in acetone PA (Merck, Darmstadt, Germany) and subjected to hydration, endogenous peroxidase blockage (peroxidase blocking reagent; Dako) and nonspecific staining blockage (0.4% BSA; Sigma, USA). The specimens were then incubated with primary antibodies directed against CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺, IFN-γ⁺, IL-10⁺ (Serotec), Ki-67⁺ (eBioscience), laminin, fibronectin, ADAM-10 (Abcam) or MMP-9 (Serotec), followed by incubation with the Labelled Polymer (Envision System-HRP, Dako). Aminoethyl carbazole (AEC kit; Invitrogen) was used as the substrate-chromogen system, and the slides were counterstained with Mayer's hematoxylin (Sigma). The slides were examined under a light microscope (Zeiss), and the number of marked cells/mm² tissue in the red pulp was determined. Two blinded readers evaluated the slides. Laminin and fibronectin deposits were quantified using ImageJ 1.48v software (NIH, USA), and the results are presented as the percentage of the marked area. Primary antibody suppression was used as the negative control reaction.

Statistical analysis

The SPSS program for Windows, version 16 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. The Kolmogorov-Smirnov test was used to evaluate the Gaussian distributions of the variables. The data were analyzed using Student's t-test for variables with parametric distributions and the Mann-Whitney test for variables with nonparametric distributions. Correlations were determined using Spearman's rank correlation coefficient. The data are reported as the mean and standard error of the mean (SEM) or and the median and minimum and maximum values. Non-numerical data were analyzed in 2 x 2 contingency tables with Fisher's exact test using Prism software (GraphPad Prism version 6.01). P-value < 0.05 was considered significant.

Results

Lymphoid follicles/ tissue is lower in animals with disorganized splenic white pulp (SWP) than in animals with well-structured splenic stroma

Considering the 41 animals diagnosed with CVL included in this study, the main clinical signs observed were onychogryphosis (79.4%), followed by dermatitis (67.6%), loss of body condition (41.2%), alopecia (38.2%), lymphadenomegaly (23.5%) and keratoconjunctivitis (23.5%)

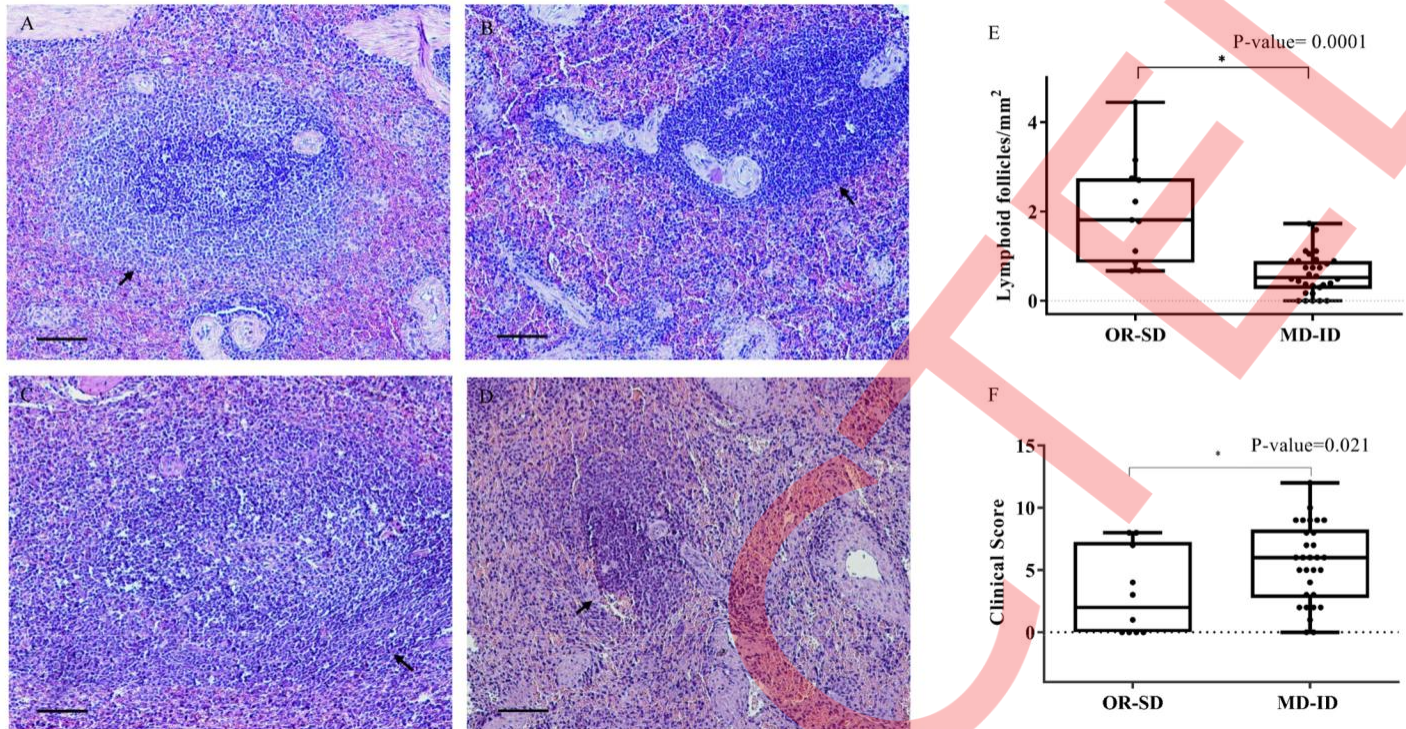


Fig 1. Degrees of disorganization of the splenic white pulp in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. (A) Organized splenic white pulp: the white pulp has a distinct periarteriolar lymphocyte sheath, germinal center, mantle zone and marginal zone; (B) slightly disorganized splenic white pulp: the white pulp shows a decrease in the definition of any white pulp region; (C) moderately disorganized splenic white pulp: the white pulp is evident, but its regions are poorly defined or indistinct; (D) intensely disorganized white pulp; the follicular structure is barely distinct from the red pulp or T cell areas. Scale bar = 100 μm. Hematoxylin and eosin. (E) Lymphoid follicle number in the splenic white pulp. (F) The clinical scores of the evaluated dogs. Mann-Whitney test. OR-SD = animals with organized to slightly disorganized splenic white pulp. MD-ID = animals with moderately to intensely disorganized splenic white pulp.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006445.g001>

(S1 Fig and S2 Table). The animals were classified into 3 groups based on the clinical score: 1-low score (N = 13, 31.7%); 2-moderate score (N = 15; 36.6%); and 3-high score (N = 13; 31.7%).

Based on histopathological analysis of the spleen, the white pulp was classified as organized SWP (OR, n = 3, 7.31% and Fig 1A), slightly disorganized SWP (SD, n = 8, 19.51% and Fig 1B), moderately disorganized SWP (MD n = 15, 36.6% and Fig 1C) and intensely disorganized SWP (ID; n = 15, 36.6% and Fig 1D). We observed that the higher the level of SWP disorganization was, the smaller the number of lymphoid follicles would be (P-value = 0.0001) (Fig 1E). The animals with MD-ID SWP showed higher clinical scores (median 6.0; range 0 to 12.0) than the animals with OR-SD SWP (clinical score: median 1.0; range 0 to 8.0 P-value = 0.021) (Fig 1F).

The analysis of the granuloma number/mm² of splenic tissue revealed that only 6 dogs showed well-formed granulomas (n = 6; median 3.83×10^6 ; minimum-maximum 4,6100–20,300,000 parasites/10⁶ cells), and this finding was accompanied by a higher parasite burden compared to the samples that did not show well-formed granulomas (n = 35; median 5.26×10^5 ; minimum-maximum 145–6,970,000 parasites/10⁶ cells, P-value = 0.039).

The deposition of the extracellular matrix components is associated with the disorganization of the splenic white pulp

Most of the dogs analyzed in this study (n = 30, 73.2%) showed moderate to intense SWP disorganization. We hypothesized that this disorganization was associated with a modification to

ECM molecule expression. In this context, the expression of laminin, fibronectin and collagen were analyzed by immunohistochemistry (Fig 2A–2M).

Fibronectin deposition was more abundant in the red pulp and in the intrafollicular than laminin deposition (Fig 2C and 2D, respectively). In general, the deposition of laminin was less intense in the intrafollicular region than in the red pulp (Fig 2H). In the MD-ID group, the laminin deposition assumed an irregular distribution. For example, in the follicle delimitation, laminin deposition was discontinuous and less intense in the animals with moderately to severely disorganized SWP than in the animals with organized to slightly disorganized SWP. We did not observe differences in fibronectin deposition when the groups were compared (Fig 2M). Higher laminin and collagen deposition in dogs with moderately to intensely disorganized SWP were observed (Fig 2O and 2P and S3 Table, P-value = 0.045 and 0.036, respectively). To determine whether the alterations in laminin deposition were accompanied by alterations in fibronectin deposition, we correlated these data and observed a positive correlation between laminin and fibronectin deposition (P-value = 0.043; $r^2 = 0.393$ and S2A Fig).

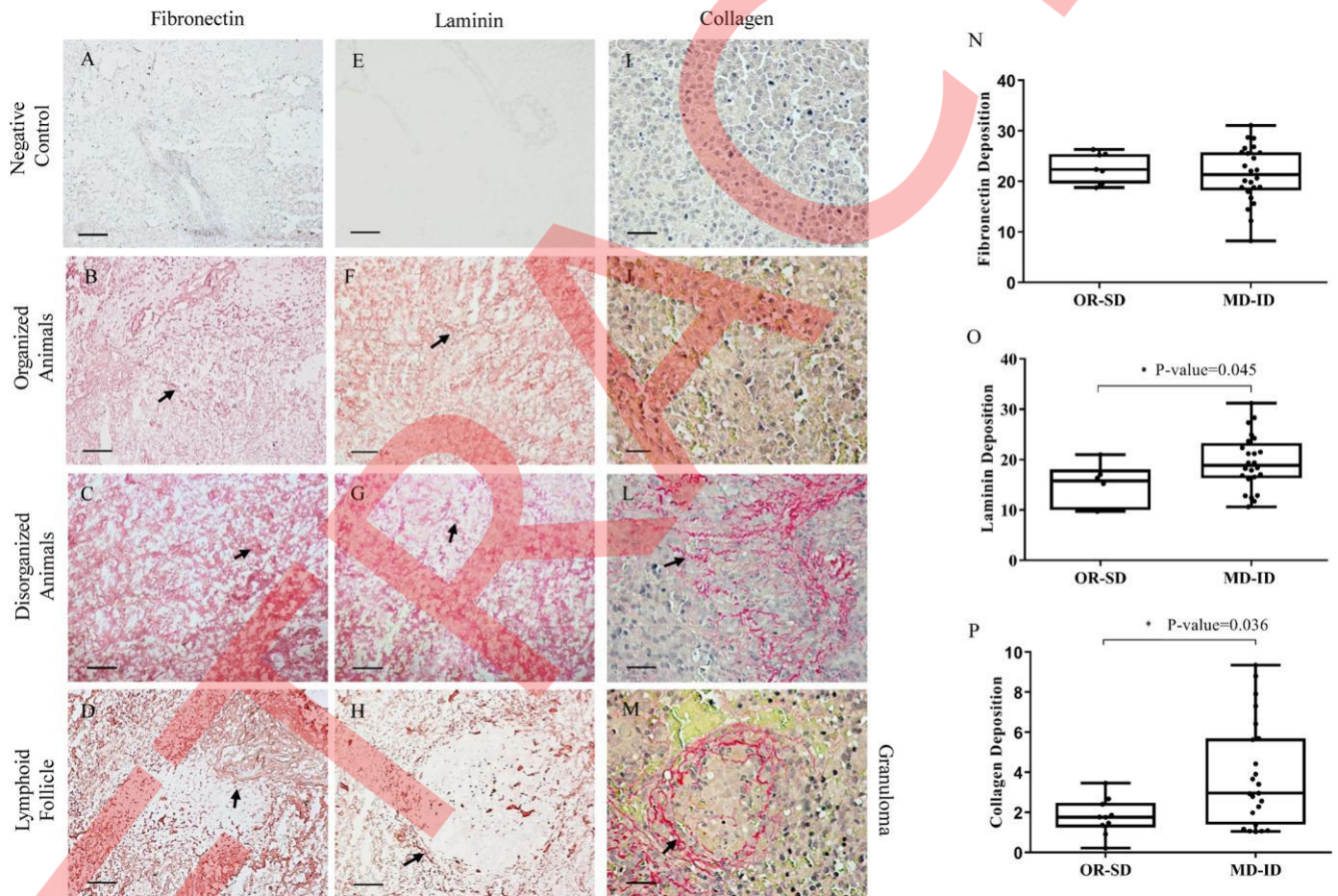


Fig 2. The extracellular matrix components in the spleens of naturally infected dogs with *L. infantum*. (A) Negative control (suppression of primary antibody). (B–D) Fibronectin deposition. Note that the deposition is well distributed throughout the splenic tissue and within the follicle (D). (E) Negative control (suppression of primary antibody). (F–G) The deposition of laminin is homogenous throughout the red pulp; however, laminin expression is delimited around the marginal zone of the white pulp (H). (I) Negative control. (J–L) Collagen deposition in the red pulp and (M) in one granuloma. A, B, D, F, H, I, J and M show the animals with organized splenic white pulp. C, E, G and L show the animals with disorganized splenic white pulp. Magnification: (A–H) 100x; Scale bar: 100 μ m and (I–M) 400x; Scale bar: 25 μ m. A–H: Immunohistochemistry—aminoethyl carbazole. I–M: Picrosirius red. (N) fibronectin deposition/area; (O) laminin deposition/ area; (P) collagen deposition/area. Mann-Whitney test. OR-SD = animals with organized to slightly disorganized splenic white pulp. MD-ID = animals with moderately to intensely disorganized splenic white pulp.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006445.g002>

Metallopeptidase-9 expression is higher in dogs with disorganized splenic white pulp than in dogs with organized spleen

We investigated whether MMP-9 and ADAM-10, two peptidases associated with matrix remodeling, could be altered in animals presenting different degrees of SWP disorganization by immunohistochemistry (Fig 3C and 3D). MMP-9 expression was higher in animals with

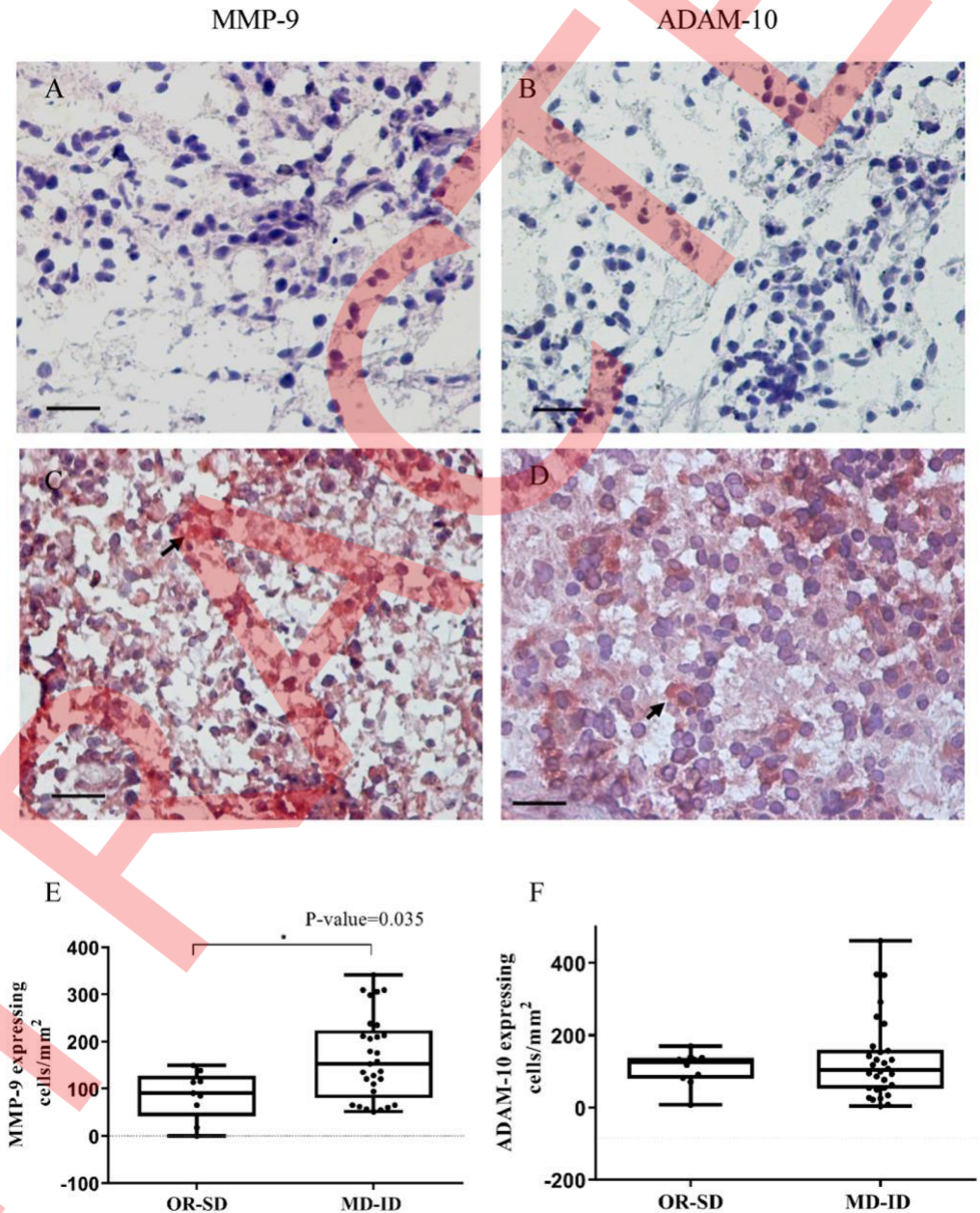


Fig 3. Deposition of MMP-9 and ADAM-10 during the extracellular matrix remodeling process. The dogs with disorganized splenic white pulp showed higher MMP-9, but not ADAM-10, expression than the dogs with organized splenic white pulp. (A-B) Negative controls (suppression of primary antibody) (C) Immunostaining of MMP-9. (D) Immunostaining of ADAM-10. Both immunostaining procedures were performed in the red pulp. (E) MMP-9 expression. (F) ADAM-10 expression. Immunohistochemistry of the red pulp—aminoethyl carbazole. Magnification: 400x, Scar bar: 25 μ m. OR-SD = animals with organized to slightly disorganized splenic white pulp. MD-ID = animals with moderately to intensely disorganized splenic white pulp.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006445.g003>

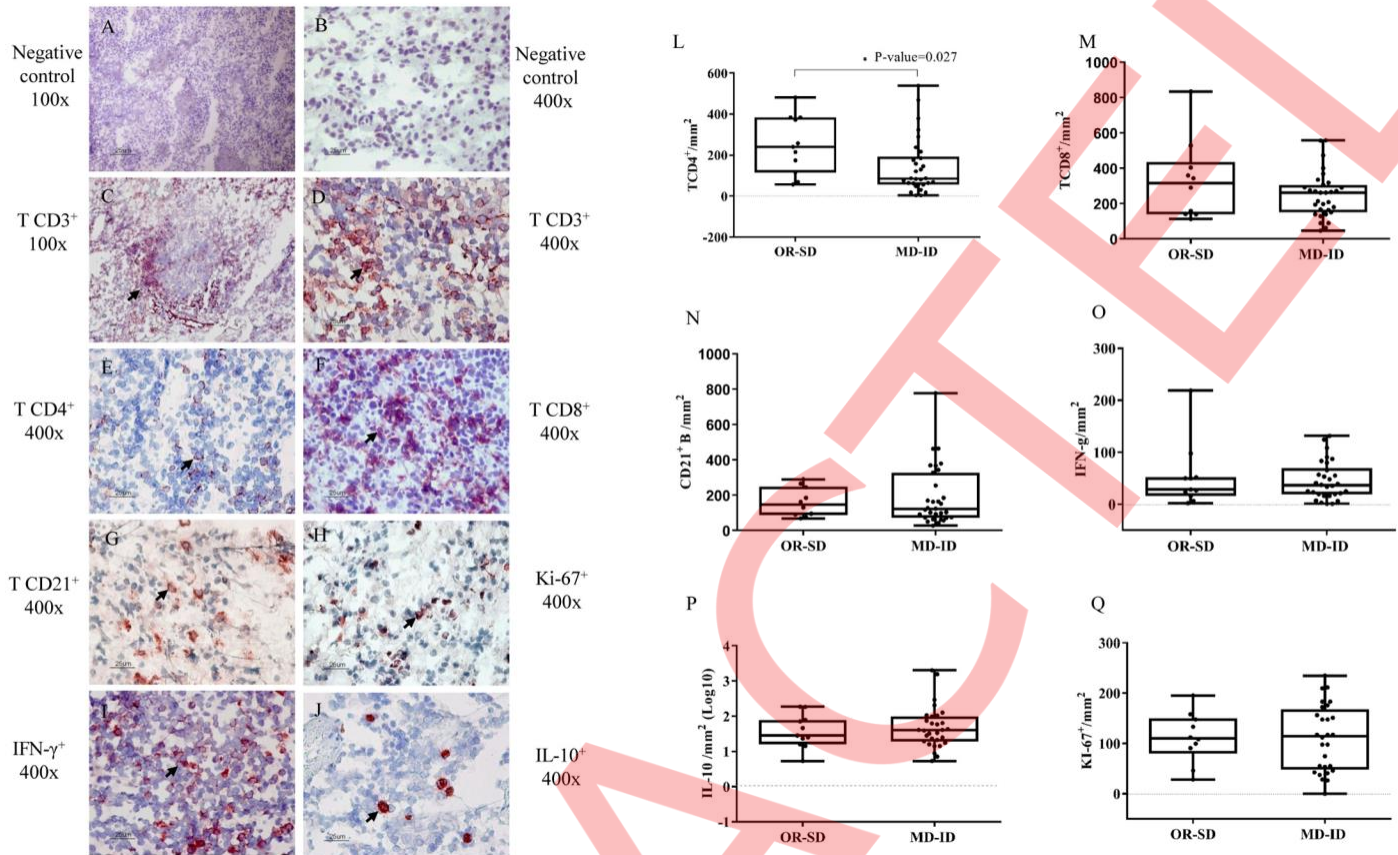


Fig 4. CD4⁺, CD8⁺ and Ki-67⁺ expression and cytokines/mm² splenic tissue of dogs naturally infected with *L. infantum*. (A-B) Negative control (suppression of primary antibody). Immunostaining of (C-D) CD3⁺, (E) CD4⁺, (F) CD8⁺, (G) CD21⁺, (H) Ki-67⁺ proliferating, (I) IFN-γ⁺ and (J) IL-10⁺ cells. Magnification in A and C: 100x; Magnification in B and D-J: 400x. Scale bar = 25 μm. (L) CD4⁺ T cells/mm². (M) CD8⁺ T cells/mm². (N) CD21⁺ B cells/mm². (O) Expression of IFN-γ/mm²; (P) IL-10/mm²; (Q) Ki-67⁺ cells/mm². Mann-Whitney test. OR-SD = animals with organized to slightly disorganized splenic white pulp. MD-ID = animals with moderately to intensely disorganized splenic white pulp.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006445.g004>

MD-ID SWP than in animals with OR-SD SWP (P-value = 0.035) (Fig 3E and S3 Table). No significant differences were observed for ADAM-10 expression (P-value>0.05) (Fig 3F and S2 Table).

The CD4⁺ cell number is lower in the disorganized spleen than in the organized spleen

To examine the lymphocyte subpopulations of the disorganized spleen, CD4⁺, CD8⁺ and CD21⁺ cells were quantified in the red pulp (Fig 4A–4J) since no individual lymphoid structure can be observed in intensely disorganized tissue. The CD4⁺ T cell number was lower in the MD-ID animals than in the OR-SD animals (P-value = 0.027, Fig 4K and S3 Table). No differences in the numbers of CD8⁺ and CD21⁺ cells were evident between the groups (Fig 4L and 4M and S3 Table) (P-value>0.05). To verify whether associations between the cellular profile and extracellular molecule or metalloproteinase alterations were present, we correlated these data and observed positive correlations between collagen deposition and CD21⁺ cells (P-value = 0.008 and r² = 0.418; S2B Fig) and between CD21⁺ cells and MMP-9 expression (P-value = 0.010 and r² = 0.401; S2C Fig). We also evaluated IFN-γ⁺- and IL-10⁺-expressing cells. Although no differences were

evident between groups, a correlation between IFN- γ ⁺ and IL-10⁺ expression was observed (P-value = 0.0074 and $r^2 = 0.412$) (Fig 4N and 4O and S2D Fig).

Association of the morphophysiological alterations and parasite load

Because the dogs were naturally infected and because the parasite load and splenic histopathological alterations were noted as markers of infection/disease progression, as described elsewhere[5,12], we examined the associations between the parasite load and splenic histopathological alterations. According to Cavalcanti[17], we grouped the dogs as follows: 1-Low parasite load and organized SWP (LOW/OR), 2- Low parasite load and disorganized SWP (LOW/ DS) and 3-High parasite load and disorganized SWP (HIGH/DS) (Fig 5). When these groups were compared, a low lymphoid follicle number (Fig 5A) and high laminin deposition (Fig 5B) were detected even in dogs with low parasite loads. Collagen deposition (P-value = 0.041) and MMP-9 expression (P-value = 0.035) were higher in the LOW/DS and HIGH/DS groups than in the LOW/OR group (Fig 5D and 5E). No differences in ADAM-10 expression were evident between the groups (Fig 5F). Furthermore, no differences in fibronectin deposition or in the numbers of CD8⁺, CD21⁺ and Ki-67⁺ cells/mm² were evident (P-value>0.05) (Fig 5C and 5H–5J). However, a lower CD4⁺ cells/mm² red pulp value was observed in LOW/DS dogs than in LOW/OR dogs (Fig 5G). In addition, the number of CD4⁺ cells/mm² red pulp of the HIGH/DS animals was similar to that of the LOW/DS animals (P-value>0.05). However, the reduction in size and the atrophy in both the lymphoid periarteriolar sheath and lymphoid follicles in the spleens from dogs with high parasite loads and similar numbers of CD4⁺ cells in the red pulp favor the hypothesis that SWP disorganization contributes to difficulties in cell migration (Fig 5G, the raw data are shown in the S4 Table).

Discussion

Herein, alterations in histology, ECM compounds, metalloproteinase expression and CD4⁺ cell quantity were detected in the spleens of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. SWP microarchitecture disorganization was observed in most of the animals (N = 30, 73.2%). The disorganized SWP showed a reduction in the size and number of lymphoid follicles and the periarteriolar sheath, as well as a low number of CD4⁺ lymphocytes in the red pulp, suggesting that T and B lymphocytes were not migrating to their specific sites and/or were beginning apoptosis. A reduction in spleen cellularity has already been demonstrated in a murine model of experimental infection with *L. infantum*[21]. The spleen is a secondary lymphoid organ that contains segregated areas of T and B lymphocytes, which favors the antigenic presentation and activation of these cells. An absence of or reduction in lymphocytes in their respective areas can lead to an activation deficit that contributes to the failure to control the parasite load. We observed low numbers of CD4⁺ cells in the animals with moderate to intense SWP disorganization. In CVL, the spleen shows a marked reduction in the gene expression levels of several cytokines, chemokines and their receptors[16,17]. In particular, a reduction in CXCL13 is associated with atrophy and lymphoid follicle disorganization[6]. We observed that the majority of animals with low parasite loads already had SWP disorganization and low numbers of CD4⁺ T cells, with concomitantly high laminin expression.

Dogs with disorganized SWP, even those with low parasite loads, showed high laminin, collagen and MMP-9 expression. This high expression of ECM molecules can be caused by the intense inflammation occurring at the beginning of infection[5,15]. The increase of MMP-2 and MMP-9 in the sera of dogs with visceral leishmaniasis has been previously demonstrated [15,22]. Thus, in our study, we found that MMP-9 expression was higher in dogs with disorganized SWP than in dogs with organized SWP. Moreover, MMP-9 expression was more intense

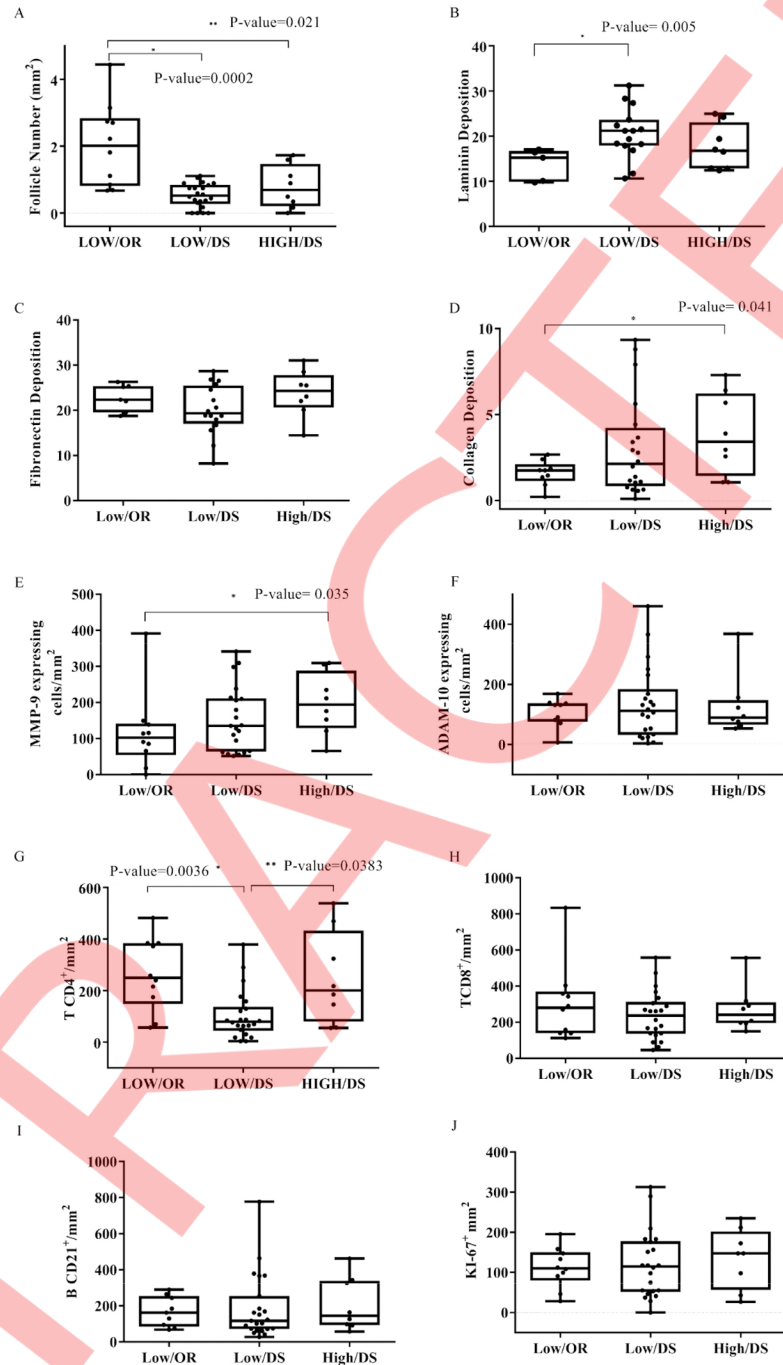


Fig 5. Association between the histopathological analysis and parasite burden. (A) Lymphoid follicles, (B) laminin deposition, (C) fibronectin deposition, (D) collagen deposition, (E) MMP-9 expression, (F) ADAM-10 expression, (G) CD4⁺ cells, (H) CD8⁺ cells, (I) CD21⁺ cells and (J) Ki-67⁺ cells. P-value < 0.05 was considered significant. Mann-Whitney test. Low/OR = low parasite burden and organized to slightly disorganized splenic white pulp. Low/DS = low parasite burden and moderately to intensely disorganized splenic white pulp. High/DS = high parasite burden and moderately to intensely disorganized splenic white pulp.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006445.g005>

in dogs with high parasite burdens and disorganized SWP. In this context, as observed in cardiomyopathy, the expression levels of metalloproteinases, such as MMP-9, MMP-3 and MMP-

10, produced by activated macrophages[23] can be positively regulated during this initial inflammatory process, leading to alterations in the degradation of collagen, laminin and fibro-nectin, to facilitate the migration of inflammatory cells to the site of infection, consequently modifying the organization of the SWP. MMP-9 plays a role in the orientation of cell migration, with ECM degradation mainly affecting type IV collagen, vascular remodeling and the inflammatory process[15,24,25].

The increased deposition of ECM components has been described in the livers of dogs[13] and in the murine thymus and lymph node[8] and has been correlated with an increased parasite load, suggesting that the deposition of fibronectin and laminin might be responsible for the success of the infection[13]. Fibronectin degradation can generate peptide fragments, which bind to receptors in macrophages, hampering the activation and function of these cells. Furthermore, the changes in the deposition of these components may reflect the inflammatory and degenerative processes, which is ultimately important in the dissemination of the parasite[19].

On the other hand, we cannot exclude the possibility that the parasite has direct effects on the ECM molecules. In this context, the direct effect of *L. amazonensis* promastigotes on an *in vitro* collagen matrix has been previously demonstrated[26]. When an animal is inoculated, the promastigotes are exposed to the dermis, which comprises ECM, growth factors and resident cells[27]. To establish the infection, promastigotes must overcome the obstacles presented by the dermal ECM, which may affect the tissue and thereby contribute to pathogenesis [27,28]. However, herein, we evaluated dogs with chronic infections, and the effects of amastigotes on ECM remain unknown.

In the liver, laminin and fibronectin expression were correlated with the parasite burden and disease progression in dogs naturally infected with *L. infantum* (*syn. L. chagasi*), suggesting that these molecules were important to the invasion of *Leishmania* parasites[13]. We found an association between high laminin expression and ECM remodeling. Moreover, our results showed that high laminin expression was evident even when the parasite load was still low, suggesting that laminin could play roles in all stages of infection.

Another metallopeptidase evaluated in this study was ADAM-10, and ADAM-10 expression was detected in all evaluated groups. No differences in ADAM-10 expression were observed between the studied groups, which suggests that although this disintegrin is involved in type IV collagen degradation[23,25], in the lymphoid follicle ontogeny[29,30] and in the regulation and maintenance of the lymphoid architectures of secondary lymphoid organs [29,31], ADAM-10 expression is not associated with SWP disorganization in the animals included in this study.

Animals with disorganized SWP presented high laminin deposition and low amounts of CD4⁺ cells. In thymic tissue, O'campo and collaborators[32] have reported that laminin is associated with the premature migration of CD4⁺ T and CD8⁺ T lymphocytes. In this context, CD4⁺ cells are leaving the spleen via mechanisms not yet known. In dogs with high parasite loads, we observed that the number of CD4⁺ cells in the red pulp was similar to that in dogs with organized white pulp; however, atrophy of the lymphoid periarteriolar sheath and lymphoid follicles was evident. We suggest that CD4⁺ cells in advanced infection may not have been able to migrate to their specific compartments within the white pulp due to the low expression levels of chemokines, cytokines and their receptors[6,14,21,33,34] or due to alterations in the distributions of splenic conduits. Additional experiments should be performed to confirm this hypothesis.

Granuloma formation, which is an efficient immune response for controlling parasite burden in visceral leishmaniasis, is one parameter for evaluations of the cell-mediated immune response[35]. In the present study, we observed the presence of well-formed granulomas only in 6 animals; however, in murine experimental infections, a marked infectious granulomatous

reaction, which involved Kupffer cells, in the liver led to parasite load control [36,37]. Herein, the parasite burdens in the dogs with well-formed granulomas were higher than in the dogs in which granulomas were not observed. These data suggest a delay/deficit in the formation of an efficient immune response by the evaluated dogs. In acute phase of experimental *Leishmania infantum*-infection in macaque model, there was a strong Th1 response, and parasite load could be controlled in blood, bone marrow, lymph nodes and liver but not in the spleen where the parasite burden remained constantly [38]. During the chronic phase, the immune response converted to an IL-10-dominated environment in the spleen [38]. Herein, the studied dogs were naturally infected, and probably were in the chronic phase, which could explain the absence of differential IL-10 expression when the groups were compared. Altogether, the data presented herein support the conclusion that the disorganization of the splenic microarchitecture is a frequent alteration in the evaluated dogs, suggesting that the splenic structure and function are drastically altered and compromised during CVL. These alterations to ECM compounds and immune cells might consequently lead to immunosuppression and severe disease.

Supporting information

S1 Fig. The frequency of clinical signs in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*.

Forty-one naturally infected animals were included in this study. The most common clinical signs were onychogryphosis (79.4%) and dermatitis (67.6%), followed by weight loss (41.2%), alopecia (38.2%), lymphadenopathy (23.5%) and keratoconjunctivitis (23.5%). (TIF)

S2 Fig. Correlations between the extracellular matrix (ECM) components, cell subpopulations and parasite burden. (A) Laminin and fibronectin, (B) CD21⁺ cells and collagen deposition, (C) CD21⁺ cells and MMP-9 expression, (D) IL-10 and IFN- γ expression, (E) CD8⁺ cells and parasite burden. Spearman correlation. (TIF)

S1 Table. Target genes and primers designed for DNA quantification and parasite load determination. S, sense; AS, antisense; bp, base pairs. (DOCX)

S2 Table. Clinical data collected from each dog. (DOCX)

S3 Table. Frequency of cells, metalloproteinases and extracellular matrix compounds in the spleens of dogs naturally infected with *L. infantum* according to spleen organization. P-value = 0.045; P-value = 0.036; P-value = 0.022; P-value = 0.027. (DOCX)

S4 Table. Frequency of cells, metalloproteinases and extracellular matrix compounds according to splenic organization and parasite burden in dogs naturally infected with *L. infantum*. P-value = 0.005; P-value = 0.041; P-value = 0.035; P-value = 0.0021. (DOCX)

S5 Table. Raw data from the dogs naturally infected with *L. infantum* that were evaluated in this study. a: 1 = Low; 2 = High. b: 1 = Organized; 2 = Slightly disorganized; 3 = Moderately disorganized; 4 = Intensely disorganized. c: 1 = Low parasite burden/Organized splenic white pulp; 2 = Low parasite burden/disorganized splenic white pulp; 3 = High parasite burden/dis-organized splenic white pulp. d: 1 = Yes; 2 = No. (DOCX)

Acknowledgments

We are grateful to the administrative staff from Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose (LPL-IOC/FIOCRUZ) and Laboratório de Pesquisa em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMOZOO-INI/FIOCRUZ).

Author Contributions

Conceptualization: Aurea Virginia Andrade da Silva, Renato Porrozi, Fernanda Nazare´ Morgado.

Formal analysis: Aurea Virginia Andrade da Silva.

Funding acquisition: Elisa Cupolillo, Renato Porrozi, Fernanda Nazare´ Morgado.

Investigation: Aurea Virginia Andrade da Silva, Elisa Cupolillo, Renato Porrozi, Fernanda Nazare´ Morgado.

Methodology: Aurea Virginia Andrade da Silva, Arthur Augusto Mendes-Junior, Luisa Helena Monteiro de Miranda, Fernanda Nazare´ Morgado.

Project administration: Fernanda Nazare´ Morgado.

Resources: Fabiano Borges Figueiredo, Rodrigo Caldas Menezes, Elisa Cupolillo, Renato Porrozi, Fernanda Nazare´ Morgado.

Supervision: Fernanda Nazare´ Morgado.

Validation: Aurea Virginia Andrade da Silva, Fernanda Nazare´ Morgado.

Visualization: Aurea Virginia Andrade da Silva, Fernanda Nazare´ Morgado.

Writing – original draft: Aurea Virginia Andrade da Silva, Fabiano Borges Figueiredo, Rodrigo Caldas Menezes, Arthur Augusto Mendes-Junior, Luisa Helena Monteiro de Miranda, Elisa Cupolillo, Renato Porrozi, Fernanda Nazare´ Morgado.

Writing – review & editing: Aurea Virginia Andrade da Silva, Fabiano Borges Figueiredo, Rodrigo Caldas Menezes, Arthur Augusto Mendes-Junior, Luisa Helena Monteiro de Miranda, Elisa Cupolillo, Renato Porrozi, Fernanda Nazare´ Morgado.

References

- Belo VS, Werneck GL, Barbosa DS, Simões TC, Nascimento BWL, da Silva ES, et al. Factors associated with visceral leishmaniasis in the Americas: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(4):e2182. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002182> PMID: 23638203
- Maia C, Campino L. Cytokine and Phenotypic Cell Profiles of *Leishmania infantum* Infection in the Dog. *J Trop Med*. 2012; 2012:541571. <https://doi.org/10.1155/2012/541571> PMID: 21845197
- DE F Michelin A, Perri SHV, De Lima VMF. Evaluation of TNF- α , IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. *Ann Trop Med Parasitol*. 2011; 105(5):373–83. <https://doi.org/10.1179/1364859411Y.0000000027> PMID: 21929879
- Boggiatto PM, Ramer-Tait AE, Metz K, Kramer EE, Gibson-Corley K, Mullin K, et al. Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2010; 17(2):267–73. <https://doi.org/10.1128/CVI.00456-09> PMID: 20032217
- Strauss-Ayali D, Baneth G, Jaffe CL. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. *Vet Res*. 2007; 38(4):547–64. <https://doi.org/10.1051/vetres:2007015> PMID: 17540157
- Silva JS, Andrade AC, Santana CC, Santos LQ, Oliveira CI de, Veras PST, et al. Low CXCL13 expression, splenic lymphoid tissue atrophy and germinal center disruption in severe canine visceral leishmaniasis. *PLoS ONE*. 2012; 7(1):e29103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029103> PMID: 22242159
- Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5(8):606–16. <https://doi.org/10.1038/nri1669> PMID: 16056254

8. Drumea-Mirancea M, Wessels JT, Müller CA, Essl M, Eble JA, Tolosa E, et al. Characterization of a conduit system containing laminin-5 in the human thymus: a potential transport system for small molecules. *J Cell Sci.* 2006; 119(Pt 7):1396–405. <https://doi.org/10.1242/jcs.02840> PMID: [16537647](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16537647/)
9. Lage RS, Oliveira GC, Busek SU, Guerra LL, Giunchetti RC, Corrêa-Oliveira R, et al. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007; 115(1–2):135–45. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.10.001> PMID: [17097741](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17097741/)
10. Lokmic Z, Lammmermann T, Sixt M, Cardell S, Hallmann R, Sorokin L. The extracellular matrix of the spleen as a potential organizer of immune cell compartments. *Semin Immunol.* 2008; 20(1):4–13. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.12.009> PMID: [18243017](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18243017/)
11. Sanchez MA, Diaz NL, Zerpa O, Negron E, Convit J, Tapia FJ. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg.* 2004; 70(6):618–24. PMID: [15211002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15211002/)
12. Silva LC, Castro RS, Figueiredo MM, Michalick MSM, Tafuri WL, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease. *Int J Exp Pathol.* 2013; 94(2):133–43. <https://doi.org/10.1111/iep.12010> PMID: [23419132](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23419132/)
13. Melo FA, Moura EP, Ribeiro RR, Alves CF, Caliani MV, Tafuri WL, et al. Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Int J Exp Pathol.* 2009; 90(5):538–48. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2009.00681.x> PMID: [19765108](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19765108/)
14. Nascimento MSL, Albuquerque TDR, Do-Valle-Matta MA, Caldas IS, Diniz LF, Talvani A, et al. Naturally *Leishmania infantum*-infected dogs display an overall impairment of chemokine and chemokine receptor expression during visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2013; 153(3–4):202–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.02.015> PMID: [23545087](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23545087/)
15. Melo GD, Marangoni NR, Marcondes M, Lima VMF, Machado GF. High levels of serum matrix metalloproteinases in dogs with natural visceral leishmaniasis: a preliminary report. *Vet J.* 2011; 188(2):243–5. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.03.017> PMID: [20418130](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20418130/)
16. Quinell RJ, Courtenay O, Shaw MA, Day MJ, Garcez LM, Dye C, et al. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2001; 183(9):1421–4. <https://doi.org/10.1086/319869> PMID: [11294678](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11294678/)
17. Cavalcanti AS, Ribeiro-Alves M, Pereira L de OR, Mestre GL, Ferreira ABR, Morgado FN, et al. Para-site load induces progressive spleen architecture breakage and impairs cytokine mRNA expression in *Leishmania infantum*-naturally infected dogs. *PLoS ONE.* 2015; 10(4):e0123009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123009> PMID: [25875101](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25875101/)
18. Prina E, Roux E, Mattei D, Milon G. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes Infect.* 2007; 9(11):1307–15. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.06.005> PMID: [17890124](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17890124/)
19. Santana CC, Vassallo J, de Freitas L a. R, Oliveira GGS, Pontes-de-Carvalho LC, dos-Santos WLC. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. *Parasite Immunol.* 2008; 30(10):515–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2008.01051.x> PMID: [18665902](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18665902/)
20. Morgado FN, Schubach A, Rosalino CMV, Quintella LP, Santos G, Salgueiro M, et al. Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? *Br J Dermatol.* 2008; 158(1):50–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2007.08255.x> PMID: [17944980](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17944980/)
21. Cuervo-Escobar S, Losada-Barragán M, Umaña-Pérez A, Porrozzi R, Saboia-Vahia L, Miranda LHM, et al. T-cell populations and cytokine expression are impaired in thymus and spleen of protein malnourished BALB/c mice infected with *Leishmania infantum*. *PLoS ONE.* 2014; 9(12):e114584. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114584> PMID: [25535967](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25535967/)
22. Marangoni NR, Melo GD, Moraes OC, Souza MS, Perri SHV, Machado GF. Levels of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2011; 33(6):330–4. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01285.x> PMID: [21332759](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21332759/)
23. Lim SC. Interrelation between Expression of ADAM 10 and MMP 9 and Synthesis of Peroxynitrite in Doxorubicin Induced Cardiomyopathy. *Biomol Ther (Seoul).* 2013; 21(5):371–80.
24. Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3(12).
25. Hopps E, Caimi G. Matrix metalloproteinases in metabolic syndrome. *Eur J Intern Med.* 2012; 23(2):99–104. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2011.09.012> PMID: [22284236](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22284236/)
26. Petropolis DB, Rodrigues JCF, Viana NB, Pontes B, Pereira CFA, Silva-Filho FC. *Leishmania amazonensis* promastigotes in 3D Collagen I culture: an in vitro physiological environment for the study of extracellular matrix and host cell interactions. *PeerJ.* 2014; 2:e317. <https://doi.org/10.7717/peerj.317> PMID: [24765565](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24765565/)

27. de Menezes JP, Saraiva EM, da Rocha-Azevedo B. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. *Parasit Vectors*. 2016; 9:264. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1540-3> PMID: [27146515](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27146515/)
28. Silva-Almeida M, Carvalho LO, Abreu-Silva AL, Souza CS, Hardoim DJ, Calabrese KS. Extracellular matrix alterations in experimental *Leishmania amazonensis* infection in susceptible and resistant mice. *Vet Res*. 2012; 43:10. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-10> PMID: [22316002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22316002/)
29. Folgosa L, Zellner HB, El Shikh ME, Conrad DH. Disturbed follicular architecture in B cell A disintegrin and metalloproteinase (ADAM)10 knockouts is mediated by compensatory increases in ADAM17 and TNF- α shedding. *J Immunol*. 2013; 191(12):5951–8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302042> PMID: [24227779](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24227779/)
30. Chaimowitz NS, Martin RK, Cichy J, Gibb DR, Patil P, Kang D-J, et al. A disintegrin and metalloprotease 10 regulates antibody production and maintenance of lymphoid architecture. *J Immunol*. 2011; 187(10):5114–22. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102172> PMID: [21998451](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21998451/)
31. Feng L, Wang Y, Cai H, Sun G, Niu W, Xin Q, et al. ADAM10-Notch signaling governs the recruitment of ovarian pregranulosa cells and controls folliculogenesis in mice. *J Cell Sci*. 2016; 129(11):2202–12. <https://doi.org/10.1242/jcs.184267> PMID: [27084580](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27084580/)
32. Ocampo JSP, de Brito JM, Corrêa-de-Santana E, Borojevic R, Villa-Verde DMS, Savino W. Laminin-211 controls thymocyte—thymic epithelial cell interactions. *Cell Immunol*. 2008; 254(1):1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2008.06.005> PMID: [18644586](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18644586/)
33. Gautam S, Kumar R, Singh N, Singh AK, Rai M, Sacks D, et al. CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2014; 209(2):290–9. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit401> PMID: [23922369](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23922369/)
34. Silva-O'Hare J, de Oliveira IS, Klevorn T, Almeida VA, Oliveira GGS, Atta AM, et al. Disruption of Splenic Lymphoid Tissue and Plasmacytosis in Canine Visceral Leishmaniasis: Changes in Homing and Survival of Plasma Cells. *PLoS ONE*. 2016; 11(5):e0156733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156733> PMID: [27243459](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27243459/)
35. Kaye PM, Beattie L. Lessons from other diseases: granulomatous inflammation in leishmaniasis. *Semin Immunopathol*. 2016; 38(2):249–60. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0548-7> PMID: [26678994](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26678994/)
36. Squires KE, Kirsch M, Silverstein SC, Acosta A, McElrath MJ, Murray HW. Defect in the tissue cellular immune response: experimental visceral leishmaniasis in euthymic C57BL/6 ep/ep mice. *Infect Immun*. 1990; 58(12):3893–8. PMID: [2123825](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2123825/)
37. Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Silvestre R, Estaquier J. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. *Parasit Vectors*. 2016; 9:118. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1412-x> PMID: [26932389](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26932389/)
38. Rodrigues V, Laforge M, Campillo-Gimenez L, Soundaramourty C, Correia-de-Oliveira A, Dinis-Oliveira RJ et al. Abortive T follicular helper development is associated with a defective humoral response in *Leishmania infantum*-infected macaques. *PLoS Pathog*. 2014; 10(4):e1004096. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004096> PMID:[24161616](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24161616/)

Artigo III: Infectious Diseases and the Lymphoid Extracellular Matrix Remodeling: A Focus on Conduit System

Fernanda N. Morgado *, Aurea Virgínia A. da Silva and Renato Porrozi *

Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro-RJ 21040-360, Brazil;

Correspondence: morgado@ioc.fiocruz.br (F.N.M.); renato.porrozzi@ioc.fiocruz.br (R.P.);

O sistema de condutas foi descrito nos órgãos linfóides como um conjunto tubular e reticular de estruturas compostas por colágeno, laminina, perlecan e proteoglicana de sulfato de heparina envoltas por fibroblastos reticulares. Este sistema tubular é capaz de transportar rapidamente pequenas moléculas como antígenos, quimiocinas, citocinas e imunoglobulinas, além de vírus através de órgãos linfóides. Essa estrutura desempenha um papel importante em guiar as células para seus nichos particulares, contribuindo, portanto, para a cooperação celular, apresentação de antígenos e ativação celular. O remodelamento dos condutas tem sido descrito em inflamação crônica e doenças infecciosas para melhorar o transporte de antígenos para células T e B específicas no tecido linfóide. No entanto, a desnutrição e os agentes infecciosos podem induzir o remodelamento da matriz extracelular direta ou indiretamente, levando à desorganização da microarquitetura dos órgãos linfóides secundários e de seu sistema de condutas. Nesse processo, as fibras e células que compõem o sistema de condutas também podem ser alteradas, o que afeta o desenvolvimento de uma resposta imune específica. Esta revisão teve como objetivo discutir o remodelamento da matriz extracelular durante as doenças infecciosas com ênfase nas alterações das moléculas do sistema de condutas, que prejudicam o trânsito celular e molecular em órgãos linfóides secundários comprometendo a resposta imune.

Review

Infectious Diseases and the Lymphoid Extracellular Matrix Remodeling: A Focus on Conduit System

Fernanda N. Morgado * , Aurea Virgínia A. da Silva and Renato Porrozzini * 

Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro-RJ 21040-360, Brazil; aurea.silva@ioc.fiocruz.br

* Correspondence: morgado@ioc.fiocruz.br (F.N.M.); renato.porrozzini@ioc.fiocruz.br (R.P.);
Tel.: +55-2138658226 (F.N.M.); +55-2138658203 (R.P.)

Received: 31 January 2020; Accepted: 11 March 2020; Published: 16 March 2020



Abstract: The conduit system was described in lymphoid organs as a tubular and reticular set of structures compounded by collagen, laminin, perlecan, and heparin sulfate proteoglycan wrapped by reticular fibroblasts. This tubular system is capable of rapidly transport small molecules such as viruses, antigens, chemokines, cytokines, and immunoglobulins through lymphoid organs. This structure plays an important role in guiding the cells to their particular niches, therefore participating in cell cooperation, antigen presentation, and cellular activation. The remodeling of conduits has been described in chronic inflammation and infectious diseases to improve the transport of antigens to specific T and B cells in lymphoid tissue. However, malnutrition and infectious agents may induce extracellular matrix remodeling directly or indirectly, leading to the microarchitecture disorganization of secondary lymphoid organs and their conduit system. In this process, the fibers and cells that compound the conduit system may also be altered, which affects the development of a specific immune response. This review aims to discuss the extracellular matrix remodeling during infectious diseases with an emphasis on the alterations of molecules from the conduit system, which damages the cellular and molecular transit in secondary lymphoid organs compromising the immune response.

Keywords: extracellular matrix; conduit system; remodeling; infectious diseases; spleen; lymph node

1. Introduction

Extracellular matrix (ECM) comprehends a meshwork of macromolecules such as fibrillar proteins, glycoproteins, enzymes, and proteoglycans, among others. It gives structural and functional support to the cells. ECM is responsible for the development and maintenance of functional activities of organs and allows cellular migration and activation. In secondary lymphoid organs, dendritic cells (DCs), T and B lymphocytes are disposed in a highly organized manner in order to generate an immune response to antigens (Ags). T and B cells are segregated in specific areas, and through the arrangement of ECM, the cells move, interact, and respond to the arrival of Ags. In these organs, in the core of the reticular network, three-dimensional structures of collagen wrapped by fibroblast reticular cells are formed. These 3D structures have been called conduit systems and are in charge of carrying small molecules such as cytokines, chemokines, Ags, and immunoglobulins. Conduits are essential to efficiently transport molecules through the parenchyma to specific regions where they are needed. In this review, the structure and function of ECM and the conduit system of the lymph nodes and spleen are presented, and the consequences of infection-causing remodeling of ECM compounds are addressed.

2. Extracellular Matrix Composition in Lymph Node and Spleen

In the multicellular organism, not only are cells responsible for organ development during the embryonic period but also the extracellular matrix and their components, indispensable to provide the cell stimulus, improve the cell structural scaffold and biochemical mechanism [1–4]. In the lymphoid organs, the extracellular matrix components such as collagens and glycoproteins are produced by mesenchymal cells, mainly fibroblasts [5]. In lymphoid organs, the extracellular matrix is crucial to create a microenvironment that favors the immune response development [6,7]. The intracellular microenvironment can interact with the extracellular matrix through the binding of integrin in cell transmembrane with extracellular matrix molecules such as laminin and fibronectin, that interact with other extracellular matrix proteins [8–12]. The interaction between cells and the extracellular matrix influences cell migration, communication, adhesion, and proliferation.

The immune response is mediated by numerous cells, such as phagocytes, mastocytes, natural killer cells, dendritic cells, granulocytes, and lymphocytes, which show activity in multiple locations of the organism [13]. The lymph node is one example of a lymphoid organ that receives immune cells from the bone marrow and shelters these cells inside the specific niches like lymphoid follicles rich in B lymphocytes and medullary zone, rich in T lymphocytes, macrophages, and many other cells of the immune system [14]. The lymph nodes have three compartments: The cortex, paracortex, and medullary area. The lymphocytes enter lymph nodes through the high endothelial venules (HEVs), achieving the paracortex [11,14,15]. The principal extracellular matrix components of the lymph node are collagens, glycoproteins, and proteoglycans [16].

The role of the extracellular matrix in the lymph node is the structural scaffold of T and B niches, the maintenance of morphological integrity, regulation of cell growth, cell division, cell migration, and the distribution and accumulation of chemokines, cytokines, and growth factors [15–18]. This organ has a specific role in the body complex. The filter system is divided into two levels: The subcapsular sinus level and the interface between the sinus and parenchyma [19]. The lymph and the antigens enter through efferent lymphatics, reaching subcapsular sinus and selectively cross the lymph nodes tissue.

A reticular network forms the extracellular matrix of lymph nodes. It is composed by types I, III, and IV collagens, laminin, elastin, tenascin, entactin, vitronectin, and fibronectin [14,15,19–21]. The cortex stroma is also formed by a network of collagen fibers enwrapped by the reticular fibroblast, forming a transport system of low weight molecules called the conduit system [15,19,20,22,23].

One of the roles of the extracellular matrix in the lymph node is to maintain specialized compartments. Another function is to improve the strength and elasticity given by collagen and elastin fibers. Adhesion and migration roles are given by integrins and reticular fibroblasts of the lymph node scaffold [22]. The migration of the lymphocytes and other cells is not exclusively made by integrins and integrins receptors but through the chemokines gradient and by an interaction between fibroblastic reticular and migrant cells. This migration process is selected by the size and by the biochemical factors [15,19,24–26].

The spleen is another secondary lymphoid organ that receives immune cells produced by hematopoiesis and lymphopoiesis, and T lymphocytes from thymus after maturation stage [27]. Analogous to lymph nodes, the spleen is segregated in T and B cell areas. Although segregated, these regions are adjacent, which enables cell cooperation. The spleen is organized in two main regions:

- 1 the white pulp, where T cells are concentrated in lymphatic periarteriolar sheath, whereas B cells are concentrated in lymphoid follicles and
- (2) the red pulp, where different resident or migratory cells (lymphocytes, macrophages, fibroblasts, and dendritic cells) are observed [28,29]. The extracellular matrix is important to maintain this splenic compartmentalization and shows the different composition and structural characteristics depending on the region, influencing the cell type migrating to specific areas. Splenocytes enter the spleen through sinusoids in the red pulp [24,29]. There, the cells interact with a splenic extracellular matrix composed by proteins of an interstitial matrix such as types I, II, III, V, and XI collagen, fibronectin, and tenascin C that interact with other extracellular matrix components such as laminin, collagen IV and heparan sulfate proteoglycans [30]. This interaction between the

cell, collagen, proteoglycans, and glycosaminoglycans promotes the connection and communication of the cell with the extracellular matrix. Interestingly, the extracellular matrix of the spleen is a loose connective tissue composed of apart from structural proteins glycosaminoglycans such as chondroitin, dermatan and keratin sulfate, and some glycoproteins such as tenascin-c and vitronectin. These interactions confer to the spleen the flexibility and tensile strength [29–32].

3. Structure and Function of the Conduits System in Secondary Lymphoid Organs

In secondary lymphoid organs, principally lymph nodes and spleen, the organization of specific areas housing T or B cells, macrophages, and dendritic cells are crucial to cell-cell interaction in to establish the adaptative immune response. The ECM plays a fundamental structural and functional role in the distribution of the di erent cell types, facilitating cell activation, proliferation, migration, and e ector function, as described above.

The primary adaptive immune responses initiate at the T cell areas of the secondary lymphoid organs, where naive T cells find DCs, recognize, process, and present antigens on its surface. There was speculation in 1964 about the role of the reticular fibers network of the lymph node in transporting soluble antigens from the inoculation site to the DCs [33]. In the core of the reticular network, a three-dimensional structure is formed. This structure is composed of types I and III collagen wrapped by fibroblast reticular cells (FRC) [22,34–36], known as the conduit system (Figure 1). Within this specialized structure, soluble low molecular weight molecules, bellow 70 kDa in T cell area [37], are transported from one area to another. It includes cytokines, chemokines, Ag [36], and more recently, it has been shown that even molecules as large as IgM [38]. Recent advances in the structure of the conduit system have demonstrated a pericellular basement membrane surrounding a cell-free lumen composed of specialized matrix compounds. This basement membrane is similar to that underlining endothelial cell, and it contains laminin-411 and laminin-511, which may serve as a barrier [39].

Additionally, type IV collagen, heparan sulfate proteoglycan, perlecan, nidogen 1, and fibronectin are also found in the basal membrane [36]. It seemed that a microfibrillar zone exists connecting the basal membrane and the collagen core. Fibrillin 1 and 2 are arranged as the backbone of fibrillar aggregates of 10–12 nm in diameter, named microfibrils [40,41], and might play a role in the stability and elasticity of the system.

The distribution of conduits has been described in the lymph nodes and occurs di erently, depending on the located region. The conduit network is denser and more branched in the T cell zones than in the B cell follicle. These di erences are determined during the lymph nodes development [25]. In neonates, there are no follicles of B cells but a dense conduit network observed in developed T cell zones [25]. During lymph node development, new B cells enter the organ leading to an intense remodeling of the follicular conduit network but maintaining the connectivity of the conduit system [25]. The B cell follicles develop in the periphery of T cell zones making the conduit network sparse and enwrapped by follicular dendritic cells replacing the fibroblast reticular cells [25]. Thus, the conduit network in lymph nodes transports low weight molecules and antigens from the subcapsular sinus to deep regions to encounter follicular dendritic cells. It may be a strategy to collect antigens even in the absence of soluble antibodies and to start the immune response of B cells.

The conduit system also transports antigens to high endothelial venules (HEV) and T cell region (paracortex). On the other hand, dendritic cells originating from inflamed tissues migrate to draining lymph nodes via lymphatic vessels, enter the paracortex region, and also migrate to HEV [42]. There, DC can activate the specific T cells that get into the lymph node through HEV [42]. In the T cell zone, the conduit system is ensheathed by FRCs, which helps ensure an appropriate seal around the lymph transporting conduit system and mature DCs move through lymphocytes independently of the conduit system [36].

Beyond antigen transportation, the conduit network plays a role in the migration of DC, B, and T cells, conducting these cells to their segregated areas but enabling them to interact and cooperate [24].

Chemokines are transported through this system, also addressing these cells [37]. Different from lymph nodes, which receive Ags directly from the afferent lymphatic vessel, most Ags gain the spleen by the blood vessel. The blood enters the spleen directly in the red pulp, and a minor part of it reaches the marginal zones located between the white and red pulp. The white pulp is restricted to the lymphocytes, and soluble Ags, and other cells cannot reach this area [29]. However, it has been shown in the presence of the conduit system in this organ [43]. These authors observed in B cell follicles, the B cell associated with the conduit without expression of ER-TR7⁺, which shows a peculiar heterogeneity of the FRC. Chemokines and antigens are also transported by the conduits, allowing the generation of immune responses. Specific areas housing T or B cells, macrophages, and dendritic cells are crucial to cell-cell interaction in to establish the adaptative immune response.

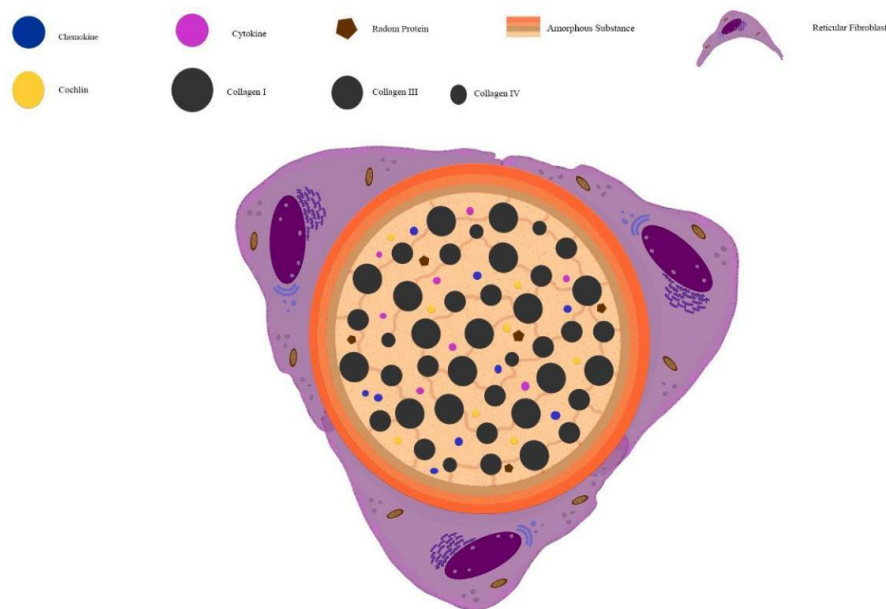


Figure 1. Illustrative scheme of conduit channel. The conduit system is responsible for driving, selectively, proteins, chemokines, and cytokines through the interaction between proteins and proteins associated with collagen fiber into the conduit lumen. Fibrillin molecules maintain the collagen fibers bound between each other and the basal membrane. The conduit lumen is wrapped by an amorphous substance that is secreted by the fibroblast reticular cells. The amorphous substance is composed of laminin, heparan sulfate, nidogen, perlecan, fibrillin, and other proteins of basal proteins. The scheme is based on conduit transverse.

4. Extracellular Matrix and Conduit System Remodeling in Chronic and Infectious Diseases

Secondary lymphoid organs maintain active homeostasis in a steady state. Generally, they are organized as T and B lymphocytes specific areas. These specific compartments are adjacent, allowing cell-to-cell cooperation and activation of the immune response. The adaptive immune response starts at T cell zones. They are composed of a specialized extracellular matrix and the conduit system rich in fibroblast reticular cells. In this area, chemokines and cytokines are expressed by FRC and dendritic cells. They are transported through conduits, which address lymphocytes to specific areas maintaining the organization of compartments in secondary lymphoid organs. During infections, the lymphoid extracellular matrix may suffer dramatic remodeling, which plays a role in the development of a specific

immune response. This process improves blood flows, immune cell trafficking, and angiogenesis, resulting in inflammatory reaction and organ enlargement. Thereby, extracellular matrix remodeling promotes the assembly of a pathogen-specific immune response. As an example, lymph nodes are constructed by an intricate network of endothelial and mesenchymal stromal cells. These change their composition after herpes simplex virus type-1 (HSV-1) infection [44]. In this case, the recruitment of lymphocytes to lymph nodes induces the increasing of stromal cell numbers (Lymphoid Stromal Cells - LSC, fibroblast reticular cells, lymphatic endothelial cells, and blood endothelial cells) [44]. The number of fibroblast reticular cells in the inflamed lymph nodes increases as a response to infection, persisting for more than three months to return to the steady-state after pathogen clearance [44]. Most of the proliferation and gene regulation of LSCs occur in the first seven days after infection. After that, they contract gradually [44]. The transcriptional changes result in cell division, antigen presentation, extracellular matrix, apoptosis, and immune response. The observed changes appear to be induced by IFN- signaling [44]. Because of the activation and growth of FRC, T and B lymphocytes also increase with the lymph node enlargement, and B cell zones remained enlarged for 30 days after infection [44,45]. FRC and lymphatic endothelial cells up-regulate interleukin-7 (IL-7) expression responding to viral infection contributing to lymphocyte survival, remodeling, and reconstruction of the distinct lymph node microenvironment [46].

The extracellular matrix is an active participant in the development of immune response upon infection. Type VII collagen, a compound of extracellular matrix in the skin, the conduits in lymph nodes, and spleen, may capture cochlin from the lumen of the conduit systems [47]. Cochlin is an ECM protein produced by follicular dendritic cells in B cell follicles conduits and plays a role as an innate immune activator [48]. During infectious diseases, cochlin is processed by aggrecanase, releasing LCCL domain that activates macrophages and neutrophils [47]. The importance of the collagen VII-cochlin axis during bacterial infections was evidenced by the reduced IL-6 and IL-1 expression and by the increased bacterial colonization when collagen VII is genetically lost [47]. It had also been demonstrated by the reduced survival of cochlin knockout mice infected with *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* [48].

After pathogen clearance, the inflammatory reaction reduces, and lymphoid organs return to normal size and steady-state. In chronic infections, the persistence of pathogens and antigenic stimulus lead to permanent remodeling that triggers tissue damage. Gradually, the inflammatory reaction is hereby replaced by fibrosis, and in some situations, the changes in the extracellular matrix composition may be irreversible or may alter the function of the organs. This effect has been described in a variety of chronic and infectious diseases. In HIV, the changes in the lymphoid tissue microenvironment are accompanied by fat or fibrosis deposition. They may also be attributed to a loss of leukocytes' communication and the surrounding stromal cells [49]. These cells produce the extracellular matrix components and the growth factors necessary for cell migration, cell proliferation, and lymphoid tissue function [49]. In canine leishmaniasis, the persistence of *Leishmania amastigotes* induces a chronic inflammatory reaction that ends in a spleen and lymph node fibrosis/collagen deposition [50,51]. Laminin and metalloproteinase-9 are also increased in the spleen of dogs with an advanced infection, suggesting an intense process of extracellular matrix remodeling [50]. In the canine leishmaniasis model, these alterations in the splenic extracellular matrix have been associated to a reduced CXCL13 expression, reduced fibroblast reticular cells (Figure 2), CD4 cells, lymphatic periarteriolar sheath atrophy, lymphoid follicle atrophy, and germinal center disruption (Figure 3) [50–53].

Some pathogens have developed the ability to use the mechanisms involved in extracellular matrix remodeling to persist and to disseminate inside the host. For example, HIV interacts with fibronectin, one of the components of the extracellular matrix, which facilitates CD4 T lymphocytes infection in vivo [54]. The binding of gp120 envelope protein mediates this interaction with the extracellular matrix to the III1-C region of fibronectin [54]. In the spleen of a chicken model, genotype VI Newcastle disease virus promotes metalloproteinase (MMP)-13 and -14 upregulation and consequent extracellular matrix degradation through collagen breakdown [55]. The authors suggested that, as the extracellular

matrix components interfere with viral spread, extracellular matrix degradation facilitates viral spread, resulting in higher viral load [55]. Collagen destruction was also demonstrated in the spleen of chicken infected with infectious bursal disease virus [56]. Collagen degradation begins three days post-infection in the antigen-trapping zone and impairs tissue organization contributing to permanent immunosuppression [56]. The conduit system also changes during infectious diseases. The fibroblast reticular cell, the main cell that covers the conduit system may be a target during infectious diseases. For instance, in HIV and Simian Immunodeficiency Virus (SIV) infection, the lymph node FRC network is replaced by fibrosis (collagen deposition), impairing the production of IL-7, leading to T cell depletion and immunosuppression [57]. In the mouse model of persistent infection by lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV), the FRC network was infected and altered by the action of CD8 T cells [58]. Interestingly, Programmed death – ligand 1 (PD-L1) was up-regulated on FRC, reducing the activation of CD8 T cells and, consequently, the immunopathogenesis, thereby contributing to viral persistence [58].

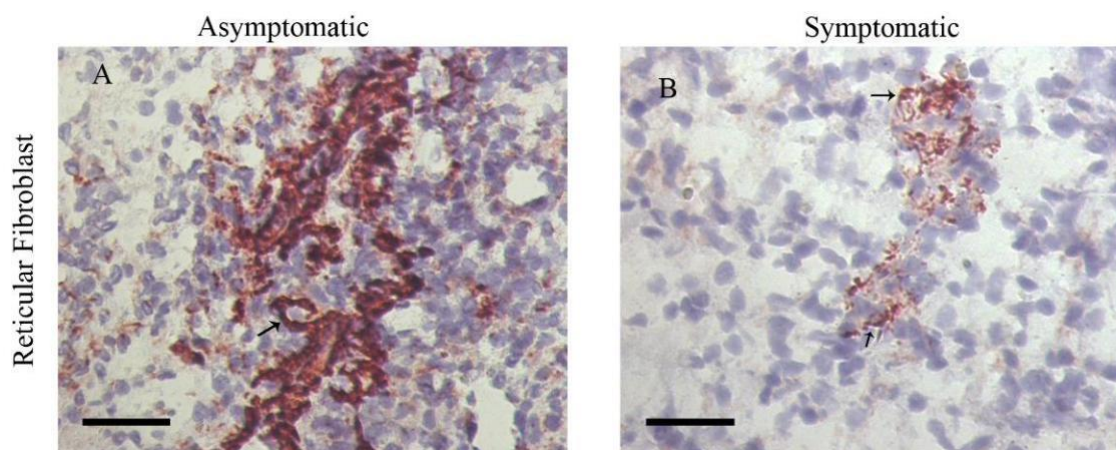


Figure 2. Detection of fibroblast reticular cells in the spleen of chronically infected dogs with *Leishmania infantum* by immunohistochemistry. **(A)** Infected and asymptomatic dog. **(B)** Infected and symptomatic dog. In this figure, the spleen of the symptomatic dog shows fewer fibroblast reticular cells than the asymptomatic dog. Fibroblast reticular cells are represented in red color in the figure

Depending on the model of study and, consequently, the course of infection, the effects on the FRC may vary. For example, the experimental infection of the murine model with *Leishmania infantum* leads to an increase in FRC [59]. Upon infection, polynutrient-deficient mice showed a reduction in FRC, dendritic cells, and macrophages when compared with well-nourished mice [59]. *Leishmania* was co-localized with dendritic cells and high endothelial venules associated with an intact conduit network [59]. In infected and malnourished mice, the authors observed an early parasite visceralization when compared to well-nourished and infected mice. They suggested that early visceralization of amastigotes was not due to a passive movement through a leaking barrier, but to a reduced number of lymph node phagocytes [59]. They further suggested a role of conduit system flow in the early visceralization of *Leishmania donovani* [59].

Lymphotoxin beta (Ltb) plays a role in splenic architecture, developing conduits along the marginal zone and recruiting CD169+ macrophages [60,61]. In the model of LCMV infection, extracellular distribution of virus along the splenic conduits is necessary for inducing systemic levels of IFN-I and is dependent on the presence of Lymphotoxin B-induced conduits [62]. In the presence of IFN-I, cellular exhaustion is induced through PD-L1 and IL-10 expression inhibiting the response of virus-specific CD8+ T cells and favoring virus persistence [63,64].

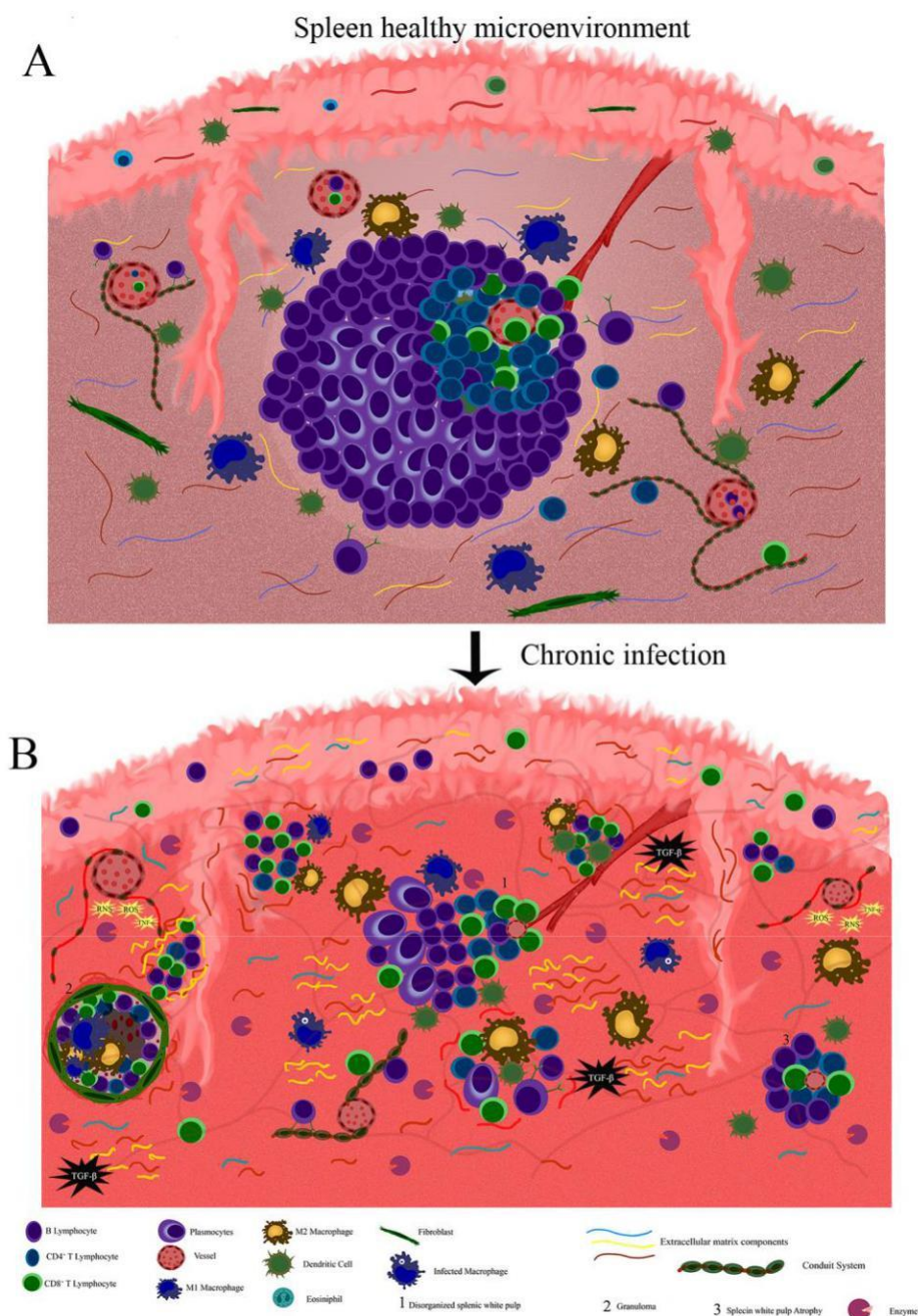


Figure 3. Illustrative scheme of the splenic microenvironment. (A) Organized spleen: In this illustration, it is possible to visualize an organized splenic with pulp and splenic compartmentalization such as germinal center and lymphatic periaarteriolar sheath, marginal zone and capsule to exert its physiological role. As represented, the extracellular matrix maintains its normal composition. (B) Disorganized spleen: Illustrative scheme of a chronically inflamed microenvironment of spleen tissue. During chronic inflammation, the extracellular matrix undergoes remodeling favoring the entry of new inflammatory cells. In persistent inflammation, the extracellular matrix loses its remodeling control showing an increase of cytokines such as Tumour Necrosis Factor- α (TNF- α) and Transforming Growth Factor- β (TGF- β) together with high production of matrix metalloproteinases and microbicidal molecules such as Reactive Nitrogen Species (RNS), Reactive Oxygen Species (ROS), and lysosomal enzymes. These events lead to tissue damage by breaking or accumulating some structural proteins like laminin and collagen. In this situation, a cell reduction and the white pulp atrophy are commonly observed.

Recently, Reynoso et al. [65] demonstrated that vaccinia virus and zika virus are transported through conduits in lymph nodes to have access to cells in order to infect them. They evidenced these viruses rapidly infecting the cells, which were adjacent to conduits [65]. Prions also may travel through lymph node conduits [66]. Moreover, in a study of the role of perinodal adipose tissue (PAT) during immune responses, the authors observed the fluid of PAT enter the lymph node through PAT-LN conduits contributing to the immune response [67]. Besides, *Staphylococcus aureus* intradermally or intravenously infected may use PAT-LN conduits to infect PAT [67].

A notable example of lymphoid extracellular matrix remodeling is the formation of tertiary lymphoid tissue during chronic inflammation in various non-lymphoid organs. These structures are able to maintain a cellular organization similar to B and T cell areas of secondary lymphoid organs such as lymph nodes [68]. The maintenance of tertiary lymphoid tissue is dependent on lymphotoxin that can be expressed by B lymphocytes [68,69]. Tertiary lymphoid tissue is composed of a variety of hematopoietic cells, high endothelial venules, and follicular dendritic cells [69]. An intricate network formed by FRC is also observed, and these cells play an important role in the induction and persistence of tertiary lymphoid tissue since they produce CCL21, express lymphotoxin receptor and form a functional conduit system [69]. As observed for lymph nodes, conduits are dense in T cell areas and sparser in B cell areas from tertiary lymphoid tissue [68].

5. Final Considerations

The remodeling process of the extracellular matrix of secondary lymphoid organs plays a vital role during immune responses against infectious agents and has been studied in a variety of models. However, little has been described about the impact of infections on the conduit system. Despite scarce data observed and discussed in this paper, we can conclude that the processes of infection by different etiological agents generate changes in the cellular and fiber components of conduits. In some situations, parasites may use the conduit system or induce changes in it to favor the spread of pathogens and their permanence in the host. During acute through chronic infection, several events aiming to control the microbial spreading result in extracellular matrix remodeling and/or conduit system disruption. For example, after microbial infection the increase of cytokines such as TNF- and TGF- together with a high production of matrix metalloproteinases and microbicidal molecules, such as RNS, ROS, and lysosomal enzymes, lead to the tissue damage, breaking or accumulating matrix molecules (Figure 4). Thus, to avoid such events, it is crucial to maintain an appropriate cooperation and activation of the immune system in secondary lymphoid organs. One question that arises is concerning if killing the microorganism using drugs will further restore the architecture of the organ. Since chronic infection causes intense disorganization and fibrosis, it seems that preventing or limiting such events may be the best way to restore homeostasis. The application of adjuvant drugs, such as pentoxifylline [70] and infliximab [71], may protect the tissue from a high production of TNF- , which is also responsible for the activation of several enzymes, limiting the matrix disorganization. Unfortunately, several other molecules contribute to tissue damage, and further research is needed.

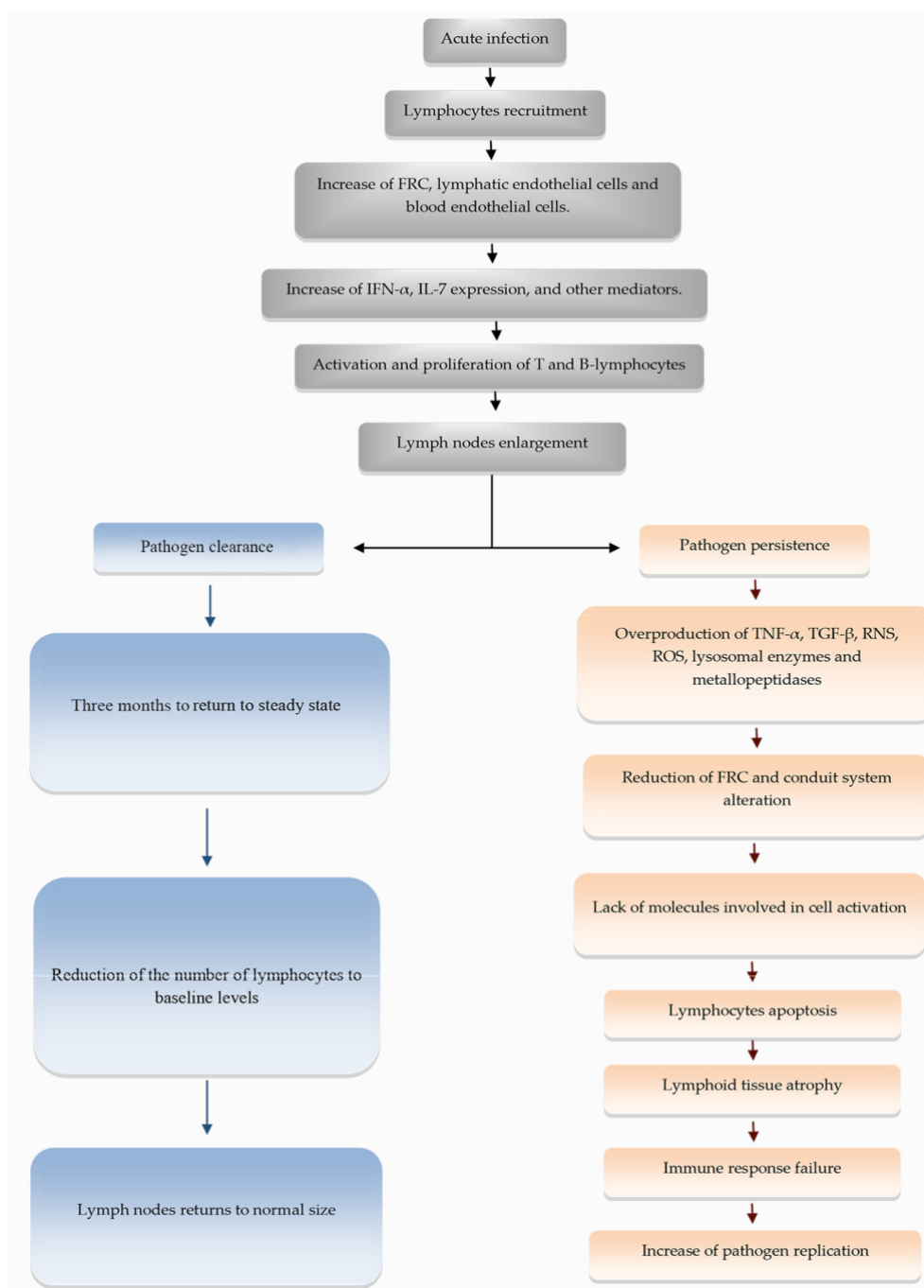


Figure 4. Flowchart showing briefly the steps of extracellular matrix remodeling and changes in lymphoid tissue during acute and chronic infectious processes.

Author Contributions: F.N.M., A.V.A.d.S. and R.P. conceived the manuscript, conceived the figures, wrote, reviewed, and approved the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq [P.C. Universal grant No. 421223/2018-9], PAEF-Fiocruz; IOC-FIOCRUZ, Programa Jovem Cientista do Nosso Estado [Faperj-E-26/202.760/2019] and Programa Print-Capes. The funders had no role in the study design, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Acknowledgments: We are grateful to the administrative staff at Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose (LPL-IOC/FIOCRUZ).

References

1. Bryant-Greenwood, G.D. The extracellular matrix of the human fetal membranes: Structure and function. *Placenta* **1998**, *19*, 1–11.
2. Loganathan, R.; Rongish, B.J.; Smith, C.M.; Filla, M.B.; Czirok, A.; Bénazéraf, B.; Little, C.D. Extracellular matrix motion and early morphogenesis. *Development* **2016**, *143*, 2056–2065.
3. Rozario, T.; DeSimone, D.W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. *Dev. Biol.* **2010**, *341*, 126–140.
4. Strauss, J.F. Extracellular matrix dynamics and fetal membrane rupture. *Reprod. Sci.* **2013**, *20*, 140–153.
5. Birch, H.L.; Thorpe, C.T.; Rumian, A.P. Specialisation of extracellular matrix for function in tendons and ligaments. *Muscles Ligaments Tendons J.* **2013**, *3*, 12–22.
6. d’Amaro, R.; Scheidegger, R.; Blumer, S.; Pazera, P.; Katsaros, C.; Graf, D.; Chiquet, M. Putative functions of extracellular matrix glycoproteins in secondary palate morphogenesis. *Front. Physiol.* **2012**, *3*, 377.
7. Valiente-Alandi, I.; Schafer, A.E.; Blaxall, B.C. Extracellular matrix-mediated cellular communication in the heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* **2016**, *91*, 228–237.
8. Filla, M.S.; Dimeo, K.D.; Tong, T.; Peters, D.M. Disruption of fibronectin matrix affects type IV collagen, fibrillin and laminin deposition into extracellular matrix of human trabecular meshwork (HTM) cells. *Exp. Eye Res.* **2017**, *165*, 7–19.
9. Halper, J.; Kjaer, M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: Elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2014**, *802*, 31–47.
10. Llacua, L.A.; de Haan, B.J.; de Vos, P. Laminin and collagen IV inclusion in immunisolating microcapsules reduces cytokine-mediated cell death in human pancreatic islets. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2018**, *12*, 460–467.
11. Moreno-Layseca, P.; Icha, J.; Hamidi, H.; Ivaska, J. Integrin trafficking in cells and tissues. *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 122–132.
12. Mouw, J.K.; Ou, G.; Weaver, V.M. Extracellular matrix assembly: A multiscale deconstruction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 771–785.
13. Iwasaki, A.; Medzhitov, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.* **2015**, *16*, 343–353.
14. Girard, J.-P.; Moussion, C.; Förster, R. HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* **2012**, *12*, 762–773.
15. Bovay, E.; Sabine, A.; Prat-Luri, B.; Kim, S.; Son, K.; Willrodt, A.-H.; Olsson, C.; Halin, C.; Kiefer, F.; Betsholtz, C.; et al. Multiple roles of lymphatic vessels in peripheral lymph node development. *J. Exp. Med.* **2018**, *215*, 2760–2777.
16. Hansen, K.C.; D’Alessandro, A.; Clement, C.C.; Santambrogio, L. Lymph formation, composition and circulation: A proteomics perspective. *Int. Immunol.* **2015**, *27*, 219–227.
17. Badylak, S.F.; Freytes, D.O.; Gilbert, T.W. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 1–13.
18. D’Alessandro, A.; Dzieciatkowska, M.; Peltz, E.D.; Moore, E.E.; Jordan, J.R.; Silliman, C.C.; Banerjee, A.; Hansen, K.C. Dynamic changes in rat mesenteric lymph proteins following trauma using label-free mass spectrometry. *Shock* **2014**, *42*, 509–517.
19. Hons, M.; Sixt, M. The lymph node filter revealed. *Nat. Immunol.* **2015**, *16*, 338–340.
20. Sobocinski, G.P.; Toy, K.; Bobrowski, W.F.; Shaw, S.; Anderson, A.O.; Kaldjian, E.P. Ultrastructural localization of extracellular matrix proteins of the lymph node cortex: Evidence supporting the reticular network as a pathway for lymphocyte migration. *BMC Immunol.* **2010**, *11*, 42.
21. Song, J.; Lokmic, Z.; Lämmermann, T.; Rolf, J.; Wu, C.; Zhang, X.; Hallmann, R.; Hannocks, M.J.; Horn, N.; Ruegg, M.A.; et al. Extracellular matrix of secondary lymphoid organs impacts on B cell fate and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, E2915–2924.

22. Kaldjian, E.P.; Gretz, J.E.; Anderson, A.O.; Shi, Y.; Shaw, S. Spatial and molecular organization of lymph node T cell cortex: A labyrinthine cavity bounded by an epithelium-like monolayer of fibroblastic reticular cells anchored to basement membrane-like extracellular matrix. *Int. Immunol.* **2001**, *13*, 1243–1253.
23. Kurd, N.; Robey, E.A. T cell selection in the thymus: A spatial and temporal perspective. *Immunol Rev.* **2016**, *271*, 114–126.
24. Bajénoff, M.; Egen, J.G.; Koo, L.Y.; Laugier, J.P.; Brau, F.; Glaichenhaus, N.; Germain, R.N. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity* **2006**, *25*, 989–1001.
25. Bajénoff, M.; Germain, R.N. B cell follicle development remodels the conduit system and allows soluble antigen delivery to follicular dendritic cells. *Blood* **2009**, *114*, 4989–4997.
26. Lin, Y.; Louie, D.; Ganguly, A.; Wu, D.; Huang, P.; Liao, S. Elastin Shapes Small Molecule Distribution in Lymph Node Conduits. *J. Immunol.* **2018**, *200*, 3142–3150.
27. Bronte, V.; Pittet, M.J. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity* **2013**, *39*, 806–818.
28. den Haan, J.M.; Mebius, R.E.; Kraal, G. Stromal cells of the mouse spleen. *Front. Immunol.* **2012**, *3*, 201.
29. Mebius, R.E.; Kraal, G. Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5*, 606–616.
30. Lokmic, Z.; Lämmermann, T.; Sixt, M.; Cardell, S.; Hallmann, R.; Sorokin, L. The extracellular matrix of the spleen as a potential organizer of immune cell compartments. *Semin. Immunol.* **2008**, *20*, 4–13.
31. Lewis, S.M.; Williams, A.; Eisenbarth, S.C. Structure and function of the immune system in the spleen. *Sci. Immunol.* **2019**, *4*, pii: eaau6085. doi: 10.1126/sciimmunol.aau6085.
32. Theocharis, A.D.; Skandalis, S.S.; Gialeli, C.; Karamanos, N.K. Extracellular matrix structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *97A*–27.
33. Moe, R.E. Electron microscopic appearance of the parenchyma of lymph nodes. *Am. J. Anat.* **1964**, *114*, 341–369.
34. Gretz, J.E.; Anderson, A.O.; Shaw, S. Cords, channels, corridors and conduits: Critical architectural elements facilitating cell interactions in the lymph node cortex. *Immunol. Rev.* **1997**, *156*, 11–24.
35. Karttunen, T.; Sormunen, R.; Risteli, L.; Risteli, J.; Autio-Harmainen, H. Immunoelectron microscopic localization of laminin, type IV collagen, and type III pN-collagen in reticular fibers of human lymph nodes. *J. Histochem. Cytochem.* **1989**, *37*, 279–286.
36. Sixt, M.; Kanazawa, N.; Selg, M.; Samson, T.; Roos, G.; Reinhardt, D.P.; Pabst, R.; Lutz, M.B.; Sorokin, L. The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. *Immunity* **2005**, *22*, 19–29.
37. Gretz, J.E.; Norbury, C.C.; Anderson, A.O.; Proudfoot, A.E.; Shaw, S. Lymph-borne chemokines and other low molecular weight molecules reach high endothelial venules via specialized conduits while a functional barrier limits access to the lymphocyte microenvironments in lymph node cortex. *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 1425–1440.
38. Thierry, G.R.; Kuka, M.; De Giovanni, M.; Mondor, I.; Brouilly, N.; Iannacone, M.; Bajénoff, M. The conduit system exports locally secreted IgM from lymph nodes. *J. Exp. Med.* **2018**, *215*, 2972–2983.
39. Sixt, M.; Engelhardt, B.; Pausch, F.; Hallmann, R.; Wendler, O.; Sorokin, L.M. Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Cell Biol.* **2001**, *153*, 933–946.
40. Sakai, L.Y.; Keene, D.R.; Engvall, E. Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J. Cell Biol.* **1986**, *103*, 2499–2509.
41. Zhang, H.; Apfelroth, S.D.; Hu, W.; Davis, E.C.; Sanguineti, C.; Bonadio, J.; Mecham, R.P.; Ramirez, F. Structure and expression of fibrillin-2, a novel microfibrillar component preferentially located in elastic matrices. *J. Cell Biol.* **1994**, *124*, 855–863.
42. Bajénoff, M.; Granjeaud, S.; Guerder, S. The strategy of T cell antigen-presenting cell encounter in antigen-draining lymph nodes revealed by imaging of initial T cell activation. *J. Exp. Med.* **2003**, *198*, 715–724.
43. Nolte, M.A.; Beliën, J.A.M.; Schadee-Eestermans, I.; Jansen, W.; Unger, W.W.J.; van Rooijen, N.; Kraal, G.; Mebius, R.E. A conduit system distributes chemokines and small blood-borne molecules through the splenic white pulp. *J. Exp. Med.* **2003**, *198*, 505–512.

44. Gregory, J.L.; Walter, A.; Alexandre, Y.O.; Hor, J.L.; Liu, R.; Ma, J.Z.; Devi, S.; Tokuda, N.; Owada, Y.; Mackay, L.K. et al. Infection Programs Sustained Lymphoid Stromal Cell Responses and Shapes Lymph Node Remodeling upon Secondary Challenge. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 406–418.
45. Yang, C.-Y.; Vogt, T.K.; Favre, S.; Scarpellino, L.; Huang, H.-Y.; Tacchini-Cottier, F.; Luther, S.A. Trapping of naive lymphocytes triggers rapid growth and remodeling of the fibroblast network in reactive murine lymph nodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, E109–118.
46. Onder, L.; Narang, P.; Scandella, E.; Chai, Q.; Iolyeva, M.; Hoorweg, K.; Halin, C.; Richie, E.; Kaye, P.; Westermann, J.; et al. IL-7-producing stromal cells are critical for lymph node remodeling. *Blood* **2012**, *120*, 4675–4683.
47. Nyström, A.; Bornert, O.; Kühl, T.; Gretzmeier, C.; Thriene, K.; Dengjel, J.; Pfister-Wartha, A.; Kiritsi, D.; Bruckner-Tuderman, L. Impaired lymphoid extracellular matrix impedes antibacterial immunity in epidermolysis bullosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E705–714.
48. Py, B.F.; Gonzalez, S.F.; Long, K.; Kim, M.-S.; Kim, Y.-A.; Zhu, H.; Yao, J.; Degauque, N.; Villet, R.; Ymele-Leki, P.; et al. Cochlin produced by follicular dendritic cells promotes antibacterial innate immunity. *Immunity* **2013**, *38*, 1063–1072.
49. Furler, R.L.; Newcombe, K.L.; Del Rio Estrada, P.M.; Reyes-Terán, G.; Uittenbogaart, C.H.; Nixon, D.F. Histoarchitectural Deterioration of Lymphoid Tissues in HIV-1 Infection and in Aging. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **2019**, *35*, 1148–1159.
50. da Silva, A.V.A.; Figueiredo, F.B.; Menezes, R.C.; Mendes-Junior, A.A.; de Miranda, L.H.M.; Cupolillo, E.; Porrozzi, R.; Morgado, F.N. 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 Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12*, e0006445.
51. Silva, L.C.; Castro, R.S.; Figueiredo, M.M.; Michalick, M.S.M.; Tafuri, W.L.; Tafuri, W.L. Canine visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease. *Int. J. Exp. Pathol.* **2013**, *94*, 133–143.
52. Silva, J.S.; Andrade, A.C.; Santana, C.C.; Santos, L.Q.; Oliveira, C.I. de; Veras, P.S.T.; Vassallo, J.; dos-Santos, W.L. Low CXCL13 expression, splenic lymphoid tissue atrophy and germinal center disruption in severe canine visceral leishmaniasis. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e29103.
53. Santana, C.C.; Vassallo, J.; de Freitas, L.A.R.; Oliveira, G.G.S.; Pontes-de-Carvalho, L.C.; dos-Santos, W.L.C. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. *Parasite Immunol.* **2008**, *30*, 515–524.
54. Tellier, M.C.; Greco, G.; Klotman, M.; Mosoian, A.; Cara, A.; Arap, W.; Ruoslahti, E.; Pasqualini, R.; Schnapp, L.M. Superfibronectin, a multimeric form of fibronectin, increases HIV infection of primary CD4+ T lymphocytes. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 3236–3245.
55. Hu, Z.; Gu, H.; Hu, J.; Hu, S.; Wang, X.; Liu, X.; Jiao, X.; Liu, X. Quantitative proteomics identify an association between extracellular matrix degradation and immunopathology of genotype VII Newcastle disease virus in the spleen in chickens. *J. Proteom.* **2018**, *181*, 201–212.
56. Bíró, E.; Kocsis, K.; Nagy, N.; Molnár, D.; Kabell, S.; Palya, V.; Oláh, I. Origin of the chicken splenic reticular cells influences the effect of the infectious bursal disease virus on the extracellular matrix. *Avian Pathol.* **2011**, *40*, 199–206.
57. Estes, J.D. Pathobiology of HIV/SIV-associated changes in secondary lymphoid tissues. *Immunol. Rev.* **2013**, *254*, 65–77.
58. Mueller, S.N.; Matloubian, M.; Clemens, D.M.; Sharpe, A.H.; Freeman, G.J.; Gangappa, S.; Larsen, C.P.; Ahmed, R. Viral targeting of fibroblastic reticular cells contributes to immunosuppression and persistence during chronic infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 15430–15435.
59. Ibrahim, M.K.; Barnes, J.L.; Anstead, G.M.; Jimenez, F.; Travi, B.L.; Peniche, A.G.; Osorio, E.Y.; Ahuja, S.S.; Melby, P.C. The malnutrition-related increase in early visceralization of *Leishmania donovani* is associated with a reduced number of lymph node phagocytes and altered conduit system flow. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2329.
60. Fütterer, A.; Mink, K.; Luz, A.; Kosco-Vilbois, M.H.; Pfeffer, K. The Lymphotoxin β Receptor Controls Organogenesis and Affinity Maturation in Peripheral Lymphoid Tissues. *Immunity* **1998**, *9*, 59–70.

61. Moseman, E.A.; Iannacone, M.; Bosurgi, L.; Tonti, E.; Chevrier, N.; Tumanov, A.; Fu, Y.X.; Hacohen, N.; von Andrian, U.H. B cell maintenance of subcapsular sinus macrophages protects against a fatal viral infection independent of adaptive immunity. *Immunity* **2012**, *36*, 415–426.
62. Shaabani, N.; Khairnar, V.; Duhan, V.; Zhou, F.; Tur, R.F.; Häussinger, D.; Recher, M.; Tumanov, A.V.; Hardt, C.; Pinschewer, D.; et al. Two separate mechanisms of enforced viral replication balance innate and adaptive immune activation. *J. Autoimmun.* **2016**, *67*, 82–89.
63. Teijaro, J.R.; Ng, C.; Lee, A.M.; Sullivan, B.M.; Sheehan, K.C.F.; Welch, M.; Schreiber, R.D.; de la Torre, J.C.; Oldstone, M.B. Persistent LCMV Infection Is Controlled by Blockade of Type I Interferon Signaling. *Science* **2013**, *340*, 207–211.
64. Wilson, E.B.; Yamada, D.H.; Elsaesser, H.; Herskovitz, J.; Deng, J.; Cheng, G.; Aronow, B.J.; Karp, C.L.; Brooks, D.G. Blockade of Chronic Type I Interferon Signaling to Control Persistent LCMV Infection. *Science* **2013**, *340*, 202–207.
65. Reynoso, G.V.; Weisberg, A.S.; Shannon, J.P.; McManus, D.T.; Shores, L.; Americo, J.L.; Stan, R.V.; Yewdell, J.W.; Hickman, H.D. Lymph node conduits transport virions for rapid T cell activation. *Nat. Immunol.* **2019**, *20*, 602–612.
66. Michel, B.; Meyerett-Reid, C.; Johnson, T.; Ferguson, A.; Wyckoff, C.; Pulford, B.; Bender, H.; Avery, A.; Telling, G.; Dow, S.; et al. Incunabular immunological events in prion trafficking. *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 440.
67. Lin, Y.; Leung, G.; Louie, D.; Bogoslawski, A.; Ross, J.; Kubes, P.; von der Weid, P.Y.; Liao, S. Perinodal Adipose Tissue Participates in Immune Protection through a Lymphatic Vessel-Independent Route. *J. Immunol.* **2018**, *201*, 296–305.
68. Stranford, S.; Ruddle, N.H. Follicular dendritic cells, conduits, lymphatic vessels, and high endothelial venules in tertiary lymphoid organs: Parallels with lymph node stroma. *Front. Immunol.* **2012**, *3*, 350.
69. Link, A.; Hardie, D.L.; Favre, S.; Britschgi, M.R.; Adams, D.H.; Sixt, M.; Cyster, J.G.; Buckley, C.D.; Luther, S.A. Association of T-zone reticular networks and conduits with ectopic lymphoid tissues in mice and humans. *Am. J. Pathol.* **2011**, *178*, 1662–1675.
70. Vilar-Pereira, G.; Resende Pereira, I.; de Souza Ruivo, L.A.; Cruz Moreira, O.; da Silva, A.A.; Britto, C.; Lannes-Vieira, J. Combination Chemotherapy with Suboptimal Doses of Benznidazole and Pentoxifylline Sustains Partial Reversion of Experimental Chagas' Heart Disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 4297–4309.
71. Silva, A.A.; Silva, R.R.; Gibaldi, D.; Mariante, R.M.; Dos Santos, J.B.; Pereira, I.R.; Moreira, O.C.; Lannes-Vieira, J. Priming astrocytes with TNF enhances their susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection and creates a self-sustaining inflammatory milieu. *J. Neuroinflammation* **2017**, *14*, 182.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

4.2 Resultados não publicados

Nesta seção, serão descritos os resultados ainda não publicados relativos à análise dos componentes estruturais do sistema de condutas, do ensaio migracional de células isoladas do sangue, baço e linfonodo de cães naturalmente infectados com *L. (L.) infantum* e a detecção e quantificação *in situ* das moléculas CD40 e CD40L, da citocina TNF- γ e enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS).

4.2.1 Metodologia

4.2.1.1 Considerações técnicas

As amostras de baço aplicadas neste estudo foram provenientes de necropsias de cães feitas por veterinários do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO, INI-FIOCRUZ) de acordo com o Ministério da saúde. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Fiocruz, licença 026/2018 e de acordo com a legislação brasileira 11794/08. O acesso ao patrimônio genético é registrado e certificado pelo SISGEN sob o número AFB4BD9.

4.2.1.2 Animais e avaliação clínica

Sessenta e oito cães de Barra Mansa-RJ com diagnóstico de Leishmaniose visceral canina foram incluídos neste estudo. Os animais foram examinados clinicamente e, em seguida, submetidos à eutanásia conforme recomendação do Ministério da Saúde do Brasil. Os diagnósticos foram confirmados por ELISA, teste CVL-DPP® (Biomanguinhos-FIOCRUZ) e isolamento e cultura do parasita. A avaliação clínica foi realizada por dois médicos veterinários de acordo com o escore clínico adaptado de Quinnel e colaboradores (285). Em resumo, seis sinais clínicos comuns (dermatite, onicogribose, ceratonjuntivite, emagrecimento, alopecia e linfadenopatia) foram pontuados em uma escala semiquantitativa de 0 (ausente) a 3 (grave). A soma dos valores foi utilizada para fazer a classificação do quadro clínico do animal em: baixo escore clínico (de 0-2 pontos de

instensidade dos sinais clínicos), médio escore clínico (animais com 3-6 pontos) ou alto escore clínico (animais com pontuação acima de 7). Após exame clínico, a eutanásia foi realizada por médicos veterinários do LAPCLIN-DERMZOO utilizando 1,0 ml/Kg de Tiopental 1,0% por via intravenosa (Thiopentax®, Cristália). Após a observação da ausência de reflexo corneano induzido pela anestesia profunda, foram administrados 10ml de cloreto de potássio a 19,1% por via venosa (Isofarma). Durante a necropsia, amostras de tecido do baço foram coletadas em tubos de polipropileno estéreis sem DNA e congeladas a -20°C até o momento da análise.

4.2.1.3 Extração de DNA.

O DNA total foi extraído de cerca de 10 mg de amostras de baço congeladas. A extração de DNA foi feita usando QIAmp® DNA Mini Kit (Qiagen, CA, EUA) que incluiu uma fase anterior de digestão com 20,0µl de proteinase K (20 mg/mL) por 1 h a 56 ° C. O DNA foi eluído em 50 µl de tampão tris EDTA (tampão AE) e quantificado em NanoDrop® (Thermo Scientific, EUA).

4.2.1.4 Determinação da carga de *L. (L.) infantum* por Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR).

A carga do parasita foi estimada por PCR quantitativo (qPCR) em amostras de baço conforme descrito anteriormente por Cavalcanti e colaboradores (9). Os primers que codificam a proteína constitutiva HPRT (5'-3' senso AAAACAATGCAGACTTTTGCT e anti-senso CCTTGACCATCTTTGGATTA) foram usados para normalizar as concentrações de DNA canino em cada amostra. Para quantificar a carga parasitária, primers que codificam a pequena subunidade ribossomal de *L. (L.) infantum* (ssrRNA) (5'-3' senso TACTGGGGCGTCAGAG e anti-senso GGGTGTCATCGTTTGC) foram utilizados no estudo. Ambos os primers foram descritos por Prina e colaboradores (286). As reações qPCR foram executadas no equipamento Step One (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc.) usando o sistema de detecção Power Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc.). Para a reação foram usados 2 µl de DNA (100 ng de DNA total purificado) e uma reação final de PCR contendo 20 µl Power Sybr Green 1X, 300 nM de cada iniciador para HPRT ou 500 nM para ensaios de PCR de ssrRNA. A qPCR foi realizada com

uma etapa de ativação a 95 ° C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação e anelamento/extensão (95 ° C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 68°C por 30 segundos). Um estágio de curva melting foi realizado para cada análise de amplificação específica (95 ° C por 15 segundos, 60 ° C por 1 minuto e 95 ° C por 15 segundos). Todas as reações foram realizadas em duplicata para cada alvo e ambos os alvos foram executados na mesma placa para a mesma amostra. Para controle da reação foi extraído o DNA de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de cães não infectados e DNA promastigotas de *Leishmania. (L.) infantum* (MCAN/BR/2007/CG-1). Assim, tanto as células do mamífero quanto as promastigotas foram determinadas usando um contador de células (Z1™ COULTER COUNTER®, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA) sendo o DNA extraído de 1,0 x 10⁶ CMSP e 1,0 x 10⁷ promastigotas. As curvas padrão para os genes HPRT e *ssrRNA* foram preparadas usando diluições em série de 10 vezes de 10⁻² a 10⁷ de DNA total purificado. Os animais foram agrupados como animais com baixa carga parasitária (baixa CP) ou alta carga parasitária (Alta CP) de acordo com o *cut-off* de 5,5 x 10⁴ parasitas/10⁶ células de mamífero), conforme descrito por Cavalcanti et al (9).

4.2.1.5 Histopatologia.

Os fragmentos do baço foram fixados em formalina a 10%, incluídos em parafina e submetidos a cortes de 5 µm de espessura fixados em lâminas de microscopia. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e examinados em microscopia de luz (Nikon Eclipse E400 - Tóquio, Japão). As alterações histológicas do tecido linfóide foram analisadas conforme descrito por Santana e colaboradores (77). Os parâmetros analisados foram a presença de granuloma e grau de organização estrutural da polpa branca esplênica (1-organizada: com bainha periarteriolar linfocitária distinta, centro germinativo, zona do manto e zona marginal visíveis e delimitadas; 2-Pouco desorganizada: com alterações hiperplásicas ou hipoplásicas levando a uma perda na definição de qualquer uma das regiões da polpa branca; 3- médio desorganizada: Quando a polpa branca era evidente, mas suas regiões eram pobremente individualizadas ou indistintas; e 4-intensa desorganização: Quando a estrutura folicular era pouco distinta da polpa vermelha e áreas de células T). O número de folículos linfóides foi determinado através da quantificação da presença dos folículos linfóides por mm² usando o software Nikon ACT-1 versão 2.62 (Nikon). Os granulomas

bem formados foram caracterizados pela presença de células epitelioides e limites bem estabelecidos. A deposição de colágeno I/III foi quantificada pela análise de lâminas coradas com picrossirius red usando o software ImageJ 1.48v (NIH, EUA), onde a área marcada por colágeno foi selecionada e o programa Image J faz a diferença entre a área marcada e a área não marcada sendo essa diferença representada por média de área marcada.

4.2.1.6 Imunohistoquímica.

A imunohistoquímica foi baseada em Morgado e colaboradores (287). Em resumo, fragmentos de baço congelados em resina OCT (Sakura) foram cortados em seções de 3-5 μm de espessura e montados em lâminas de microscópio (lâminas silanizadas; DakoCytomation, Carpinteria, CA, U.S.A.). As lâminas foram fixadas em acetona PA (Merck, Darmstadt, Alemanha) e submetidas à hidratação, bloqueio da peroxidase endógena (reagente bloqueador da peroxidase; Dako) e bloqueio da coloração inespecífica (0,4% BSA; Sigma, EUA). As amostras foram incubadas com os anticorpos primários direcionados para: Laminina V⁺ (1:50 Anti-coelho), Colágeno IV⁺ (1:200 Anti-coelho), fibroblasto reticular ER-TR7⁺ (1:500 Anti-rato) (ABCAM), CD40L⁺ (1:100 Anti-coelho), CD40⁺ (1:100 Anti-coelho), TNF- α ⁺ (1:100 Anti-coelho), iNOS⁺ (1:100 Anti-coelho) (ABCAM). Como existem poucos insumos imunológicos disponíveis para espécie canina, trabalhamos com a padronização e utilização de anticorpos que reconhecem as moléculas alvos em espécies diferentes. Após a incubação com anticorpos primários, os anticorpos secundários foram aplicados. A revelação da marcação foi feita com Aminoetilcarbazol (kit AEC; Invitrogen), seguida pela contracoloração com hematoxilina de Mayer (Sigma). As lâminas foram examinadas em microscópio de luz (Zeiss) e foi determinado o número de células marcadas/mm² de tecido na polpa vermelha. Para a análise de laminina V e Colágeno IV, não foi realizada a contracoloração com hematoxilina e a quantificação destas proteínas foi feita através do software ImageJ 1.48v (NIH, EUA). Os resultados estão demonstrados como porcentagem de área marcada.

4.2.1.7 Ensaio Transwell

Para realizar este ensaio de migração, foram isoladas células mononucleares de sangue

periférico (CMSP), esplenócitos e células do linfonodo. As células foram estimuladas com proteínas solúveis de *L. (L.) infantum*. Para tal, as promastigotas foram cultivadas em Meio Schneider suplementado com 20% de soro fetal bovino. Ao final de 5 dias de cultivo, a massa parasitária foi submetida a duas lavagens em tampão fosfato salino estéril (PBS) e centrifugação em 4000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos à 10 °C. Após esta etapa, foi realizada a suspensão da massa parasitária em PBS e após a suspensão, a massa parasitária foi lisada em sonicador (Thermo fisher scientific) 4 vezes em ciclos de 15 segundos em gelo. Após o processo de lise e centrifugação em 4000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos à 10 °C, a fração solúvel foi coletada e quantificada em qubit (Qubit fluorometric quantification termo fisher scientific) usando kit para quantificação de proteínas e o protocolo para tal seguiu as recomendações do fabricante. O antígeno solúvel de *L. (L.) infantum* (AgLi) foi congelado em -20°C em alíquotas prontas para o uso na concentração de 10µg/ml. Além do estímulo antigênico específico, foi feito também o estímulo com 5 µg/ml lipopolissacarídeo de membrana bacteriana ([LPS]= 1mg/ml Invitrogen) como forma de controle da reação.

Esplenócitos, células mononucleares de sangue periférico (CMSP) e células de linfonodos foram isolados das amostras e separados por gradiente histopaque®. A cultura de células de esplenócitos, CMSP e linfonodos foi realizada em meio RPMI acrescido de antibióticos 1,2% e soro fetal bovino 2% e na presença dos estímulos antigênicos AgLi e LPS durante 18 horas nas seguintes condições: 1) as células foram cultivadas apenas em RMPI + 1,2% antibióticos + 2% soro fetal bovino; 2) As células foram cultivadas em RMPI + 1,2% antibióticos + 2% soro fetal bovino +10 µg/ml de AgLi; 3) As células foram cultivadas em RMPI + 1,2% antibióticos +2% soro fetal bovino + 5 µg/ml de LPS. Após 18 horas de estimulação com os antígenos, as células foram colocadas em câmara transwell onde na câmara inferior foi adicionado o meio de migração contendo 1) Migração basal: apenas RPMI mais 0,1% de albumina de soro bovino; 2) Estímulo de quimiocinas: meio RPMI + 0,1% de albumina de soro bovino +100 ng/ml de quimiocina CCL19 ou CXCL13. No passo 2 foram aplicados 200 µl contendo a concentração de 1×10^6 esplenócitos ou CMSP ou célula de linfonodo estimuladas com AgLi ou LPS. O ensaio de migração foi realizado em estufa de CO₂ a 37°C por 4 horas. Terminado o ensaio de migração, a câmara superior foi descartada e as células que haviam migrado para a inferior foram contadas na câmara de Neubauer e expressas em valor de células que migraram $\times 10^4$.

4.2.1.8 Análise estatística

O programa SPSS para Windows, versão 16 (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.) foi usado para análise estatística. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a distribuição gaussiana das variáveis. Os dados foram analisados com o teste T-Student para variável com distribuição paramétrica e o teste de Mann-Whitney para variável com distribuição não paramétrica. As correlações foram determinadas usando o coeficiente de correlação de Spearman. Os dados são apresentados como média e erro padrão (SEM), mediana e valores mínimo e máximo. Os dados não numéricos foram analisados em tabelas de contingência 2 x 2 pelo teste exato de Fisher usando o software Prism (Graphpad Prism® versão 6.01). O valor de $p \leq ,05$ foi considerado significativo.

4.2.2 Resultados

Todos os valores quantitativos e estatísticos estão sumarizados nas tabelas 4.2.2.1 e 4.2.2.2.

4.2.2.1 Grupos de escore clínico, carga parasitária e organização da polpa branca esplênica

Neste estudo foram utilizadas 3 formas de agrupamento para análise dos dados. Primeiro, os animais foram analisados de acordo com o escore clínico, conforme descrito na metodologia. 69,1% dos animais foram classificados com baixo escore clínico e 30,9% foram classificados como médio ou alto escore clínico.

Já o agrupamento segundo a carga parasitária demonstrou que do total de 57 animais, 78,9% apresentavam baixa carga parasitária e 21,1% alta carga parasitária. Quando analisamos o escore clínico juntamente com a carga parasitária observamos que 56,14% dos animais analisados apresentaram baixa carga parasitária e foram sintomáticos, além disso, 22,8% eram de baixa carga parasitária e assintomáticos, 17,54% eram alta carga parasitária e sintomáticos e apenas 3,5% eram de alta carga parasitária e assintomáticos. Esses resultados sugerem que as condições clínicas nem sempre refletirão a carga parasitária, uma vez que animais sintomáticos apresentaram tanto alta carga

parasitária quanto baixa.

Quando analisamos o grau de organização da polpa branca esplênica (PBE), observamos que a desorganização da PBE pode ser um padrão na Leishmaniose visceral canina, uma vez que 74,6% dos animais aplicados neste estudo apresentavam PBE desorganizada e apenas 25,4% apresentaram PBE organizada. Quando analisamos o grau de organização da PBE de acordo com o escore clínico, observamos que o escore clínico poderia refletir a desorganização da polpa esplênica branca, uma vez que 68,3% dos animais aplicados neste estudo foram classificados com alto escore clínico e apresentavam PBE desorganizada. Além disso, apenas 4,8% dos animais aplicados neste estudo foram classificados como alto escore clínico e apresentavam PBE organizada. Nenhum animal avaliado apresentou baixo escore clínico e PBE organizada.

Quando observamos a associação entre o grau de organização da PBE e carga parasitária, observamos que a desorganização da PBE ocorreu quando a carga parasitária ainda estava baixa, pois 63,6% dos animais analisados neste estudo apresentavam baixa carga parasitária e tinham PBE desorganizada enquanto 20% tinham baixa carga parasitária e polpa esplênica branca organizada. Apenas 16,4% apresentaram PBE desorganizada e alta carga parasitária.

4.2.2.2 Componentes do sistema de condutas estavam alterados no baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania. (L.) infantum*

O sistema de condutas é fundamental para o processo migratório, pois por meio dele, as células se orientam e deslizam em função do gradiente de quimiocinas até os compartimentos linfoides. Investigamos a expressão dos principais componentes do sistema de condutas, como deposição de colágeno IV, laminina V e fibroblastos reticulares por imunohistoquímica (Figura 4.2.1 A-H). Para as seguintes análises, avaliamos a composição do sistema de condutas em função das variáveis como organização da polpa branca esplênica, carga parasitária, escore clínico e grupos

combinados nos quais se considerou a carga parasitária e a organização da polpa branca esplênica.

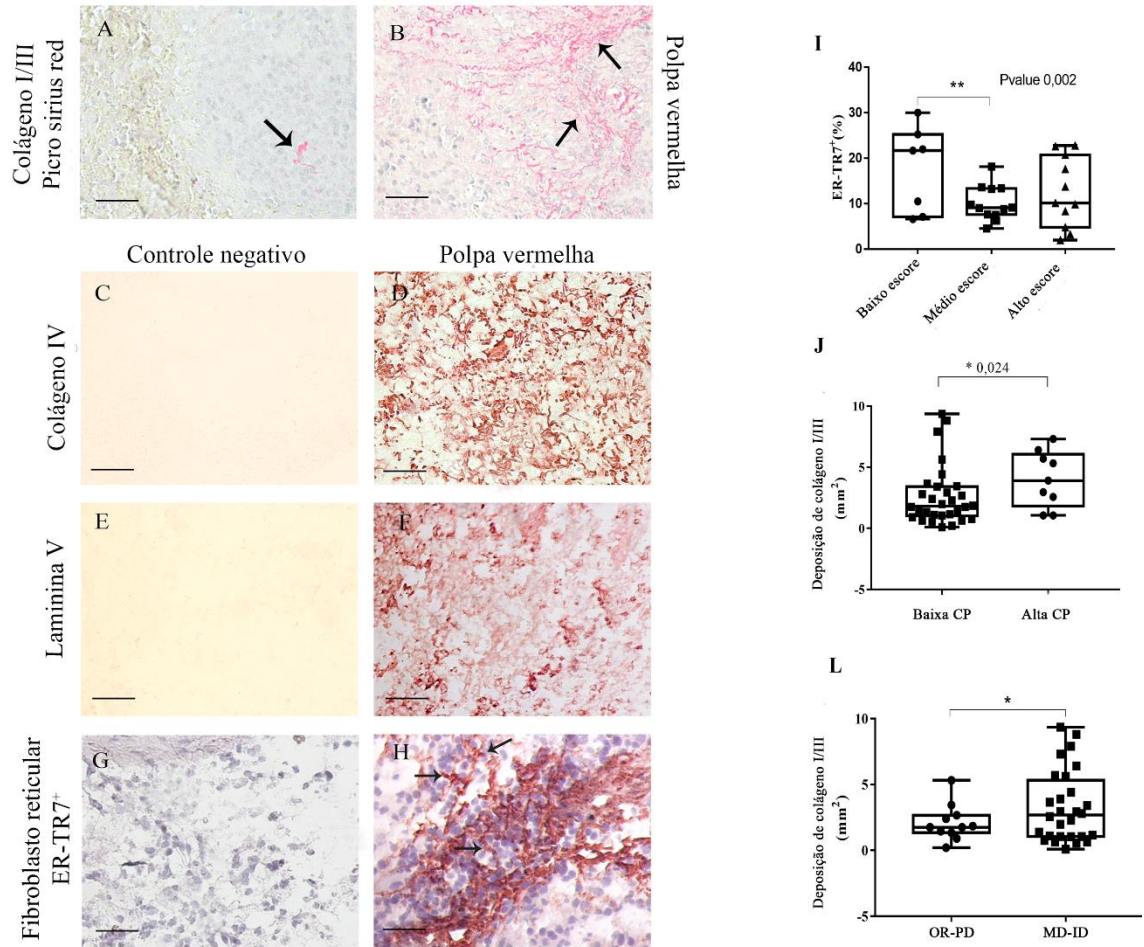


Figura 4.2.1- Os componentes do sistema de condúites estavam alterados em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) infantum*. Os componentes do sistema de condúites foram marcados por imunohistoquímica e vermelho picro Sirius. Em A e B, deposição de colágeno tipos I e III corados por vermelho picro Sirius na polpa branca (A) e (B) na polpa vermelha. Em C, E e G controle negativo de ensaio de imunohistoquímica. D, imunomarcacão de colágeno tipo IV. F, imunomarcacão de laminina V. Em H, imunomarcacão de fibroblasto reticular ER-TR7⁺. As setas indicam o alvo imunomarcado. A-H, barra de ampliacão 25 μ m. Em I, quantificacão de ER-TR7⁺ (% fracão de área positiva) de acordo com o escore clínico (** Pvalor 0,002). Em J e L, quantificacão da deposição de colágeno tipo I e III em mm² de acordo com a carga parasitária e organizacão da polpa

esplênica branca, respectivamente (* Pvalores 0,024 e 0,0215). Cromogênio 3-amino-9-etilcarbazol-AEC e contracoloração com hematoxilina de Meyer. Mann-Whitney OR-PD: polpa esplênica branca organizada à pouco desorganizada. MD-ID: polpa esplênica branca desorganizada moderada a intensamente. Número amostral deste experimento: Colágeno I/III 32 animais, Colágeno IV 39 animais, Laminina V 17 animais, Fibroblastos reticulares ER-TR7⁺30 animais.

Observamos que os animais com médio escore clínico apresentaram redução nos fibroblastos reticulares ER-TR7⁺ (Figura 4.2.1 I, p: 0.002; Mediana 9.13; Min-Max 4.56-18.16) quando comparados aos animais com baixo escore clínico (Mediana 21,67; Mín-Máx 6,63-30,01). Fibroblastos reticulares ER-TR7⁺ são células que atuam na manutenção estrutural do sistema de conduítes. Além disso, animais com alta carga parasitária (Alta CP) apresentaram elevada deposição de colágeno tipo I e III quando comparado aos animais com baixa carga parasitária (Figura 4.2.1 J, p: 0,024, Alta CP: Mediana 1,9 Min-Max 0,37 -16,06; Baixa CP: Mediana 2,8 Min-Max: 0,00-22,96) Além disso, a deposição de colágeno I/III foi maior em animais com PBE médio à intenso desorganizada quando comparado aos animais com PBE organizada à pouco desorganizada (Figura 4.2.1 L, p: 0,021, OR-PD: Mediana 2,61; Min- Max: 0,00-11,59; MD-ID: Mediana 2,71; Min-Max: 0,06-22,96). Não houve alteração na deposição de laminina V e colágeno IV nos demais grupos avaliados.

4.2.2.3 Esplenócitos apresentaram preservação da capacidade de migração espontânea e responsiva *in vitro*

Após observar mudanças na composição dos sistemas de conduítes, investigamos a capacidade de migração de células isoladas de sangue periférico, esplenócitos e células de linfonodos. Nos questionamos se, devido a um processo infeccioso persistente, as células do baço teriam a expressão reduzida de quimiocinas e seus receptores específicos, afetando sua capacidade em responder aos estímulos quimiotáticos.

Ao analisar a migração basal de CMSP, células de esplenócitos e linfonodos na ausência ou presença de quimiocinas e estímulos patogênicos (AgLi ou LPS), observamos que os esplenócitos apresentaram maior atividade migratória quando comparados às células isoladas do linfonodo (Figura 4.2.2 p: 0.0124, mediana esplenócitos: 46,50; Min-Max: 0,00-453,0; mediana linfonodo: 8.5; Min-Max: 0,00-64,0). Quando observamos a capacidade migratória dos esplenócitos em comparação com

CMSP, não observamos nenhuma diferença significativa.

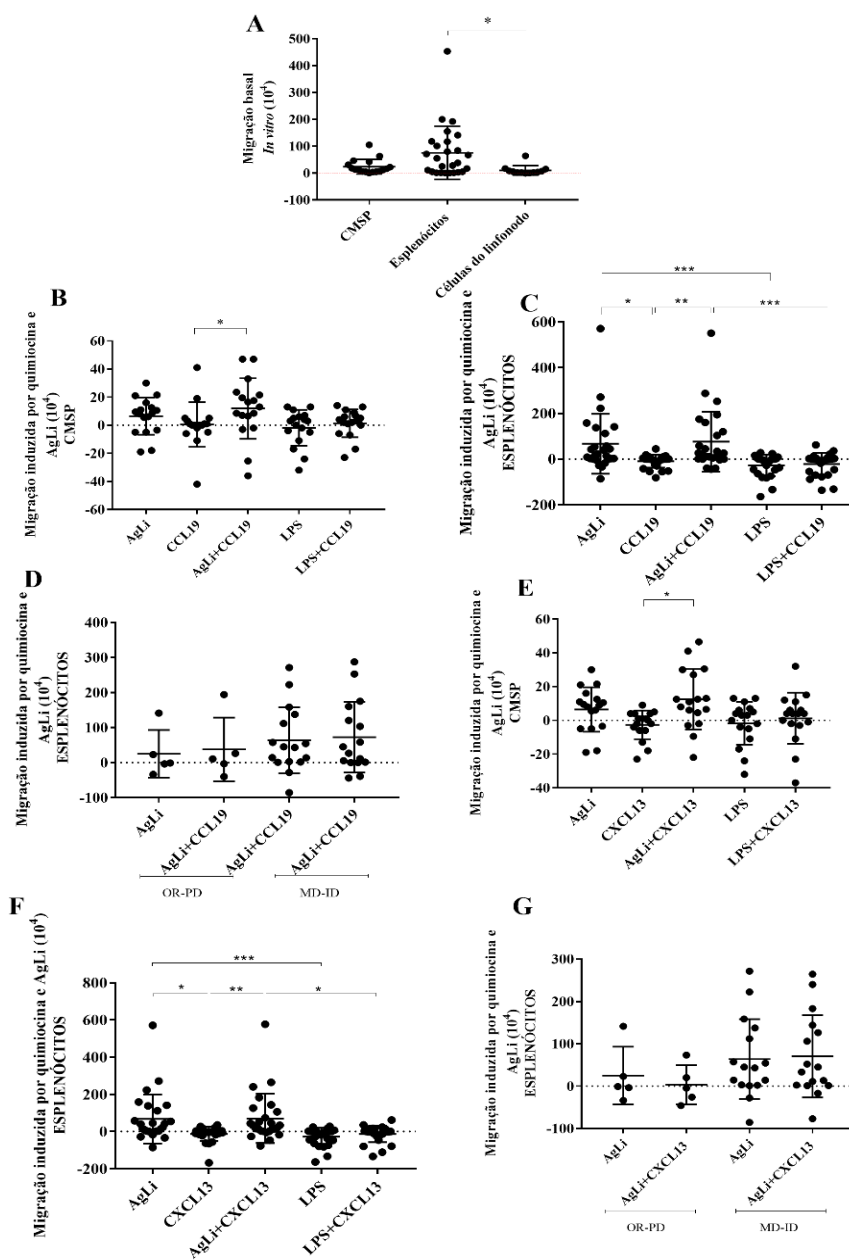


Figura 4.2.2 - A migração basal de esplenócitos foi preservada *in vitro* e aumentada com estímulo antigênico e quimiotático. O ensaio transwell foi realizado com CMSP, esplenócitos e células do linfonodo. Em A, a migração basal foi avaliada na ausência de estímulo antigênico e quimiotático (valor p 0,0124). Em B, as CMSP estimuladas com antígenos e CCL19 (p = 0,02). Em C, CMSP estimulado com antígenos e CXCL13 (p = 0,010). Em D, esplenócitos estimulados com antígenos e CCL19 (valor P * 0,032 [AgLi vs. CCL19]; ** 0,008 [CCL19 vs. AgLi + CCL19]; *** 0,0001 [AgLi + CCL19 vs. LPS + CCL19]; *** 0,0005 [AgLi vs. LPS]). Em E, esplenócitos estimulados com antígenos e CXCL13 (valor P * 0,01 [AgLi vs. CXCL13]; ** 0,0049 [CXCL13 vs. AgLi + CXCL13]; * 0,013 [AgLi + CXCL13 vs. LPS + CXCL13]; *** 0,0006 [AgLi vs. LPS]). Em F, esplenócitos estimulados com antígenos e CCL19. Em G, esplenócitos estimulados com antígenos e CXCL13 de acordo com a organização da polpa esplênica branca. Em B-G, os dados são representados pelo número total de células que migraram menos o número de células que migraram espontaneamente. Teste de Kruskal-Wallis e comparações de múltiplos de Dunn. OR-PD: polpa esplênica branca organizada a levemente desorganizada. MD-ID: polpa esplênica branca desorganizada moderada a intensamente. AgLi: antígeno de *Leishmania infantum*. LPS: lipopolissacarídeo. Número de animais aplicados neste experimento: Baço: 26 animais; Linfonodo: 12 animais e CMSP: 17 animais.

Além disso, observamos a capacidade migratória de células estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania (L.) infantum* (AgLi) e gradiente quimiotático (CCL19 ou CXCL13). Assim, ao estimular CMSP com AgLi e na presença de CCL19, estas exibiram maior capacidade de migração quando comparadas às células que não foram cultivadas com estímulo antigênico (Figura 4.2.2 B p: 0,02 CCL19: mediana 0,00 Min-Max: [-23,0]-9; AgLi + CCL19: Mediana 11,0; Min-Max: [-22,0]-46,5). Para os esplenócitos, observamos o mesmo: após o estímulo por AgLi e na presença de CCL19, os esplenócitos migraram mais do que os esplenócitos que não receberam o estímulo de AgLi (Figura 4.2.2 C p: 0,008 AgLi + CCL19: mediana 25,0 Min-Max: [- 44,0]-551,0; CCL19: Mediana 0,00 Min-Max: [- 81,00]-45,00). Curiosamente, o AgLi sozinho foi capaz de induzir a migração dos esplenócitos quando comparado com as células que migraram na presença somente de CCL19 (Figura 4.2.2C p: 0,032 AgLi: Mediana 18,75 Mín- máx.: [- 85,50]-571,00; CCL19: Mediana 0,00 Mín-Max: [- 81,00]-45,00). Não observamos diferenças na migração de esplenócitos na presença de CCL19 e dos estímulos antigênicos de acordo com a organização da PBE (Figura 4.2.2 D).

Analisamos também a migração das células na presença de CXCL13, quimiocina recrutadora principalmente de linfócitos B. Assim, observamos que o número de CMSP migrantes

foi maior na presença de estímulo AgLi e CXCL13 em comparação com CMSP na ausência de estímulo AgLi (Figura 4.2.2 E p: 0,02 CXCL13: Mediana 0,00 Min-Max: [- 23,0]-9; AgLi + CXCL13: Mediana 11,0; Min-Max: [- 22,0]-46,5). Além disso, também observamos o comportamento migratório dos esplenócitos em função do estímulo quimiotático por CXCL13. Assim, vimos que o estímulo antigênico mediado apenas pelo AgLi tem maior efeito na indução da migração dos esplenócitos quando comparado aos esplenócitos que receberam apenas o estímulo quimiotático de CXCL13 (Figura 4.2.2 F p: 0,01 AgLi: Mediana 18,75 Mín- Máx: [- 85,50]-571,00; CXCL13: Mediana 11,00 Mín-Máx: [- 22,0]-46,50). Os esplenócitos estimulados com AgLi e CXCL13, apresentaram maior capacidade de migração quando comparados aos esplenócitos que receberam apenas o estímulo quimiotático de CXCL13 (Figura 4.2.2 F p: 0,0049 AgLi + CXCL13: Mediana 26,25 Min-Máx: [- 77,00]-577,00; CXCL13: Mediana -2,50 Min-Max: [- 168,00]-35,00). Não observamos diferença na migração de células na presença de CCL19 de acordo com a organização PBE (Figura 4.2.2 D).

4.2.2.4 Animais com médio escore clínico apresentaram redução de células CD40L⁺

As moléculas CD40 e CD40L participam do processo de ativação celular. Neste estudo, a expressão dessas moléculas foi analisada pela técnica de imunohistoquímica (Figura 4.2.3 A, C e E para CD40 e 4.2.4 B, D e F para CD40L. CD40 e CD40L: 39 animais).

Quando analisamos a expressão da molécula CD40, não observamos diferenças significativas quando os diferentes grupos foram comparados. Porém, quando analisamos a expressão do CD40L, observamos uma redução desta molécula em animais com médio escore clínico quando comparados a animais com baixo escore clínico (Figura 4.2.3 G p: 0,018 médio escore clínico: Mediana 43,37 Min-Máx: 23,82-90,67; baixo escore clínico: Mediana 67,02 Mín-Máx: 23,47-130,49).

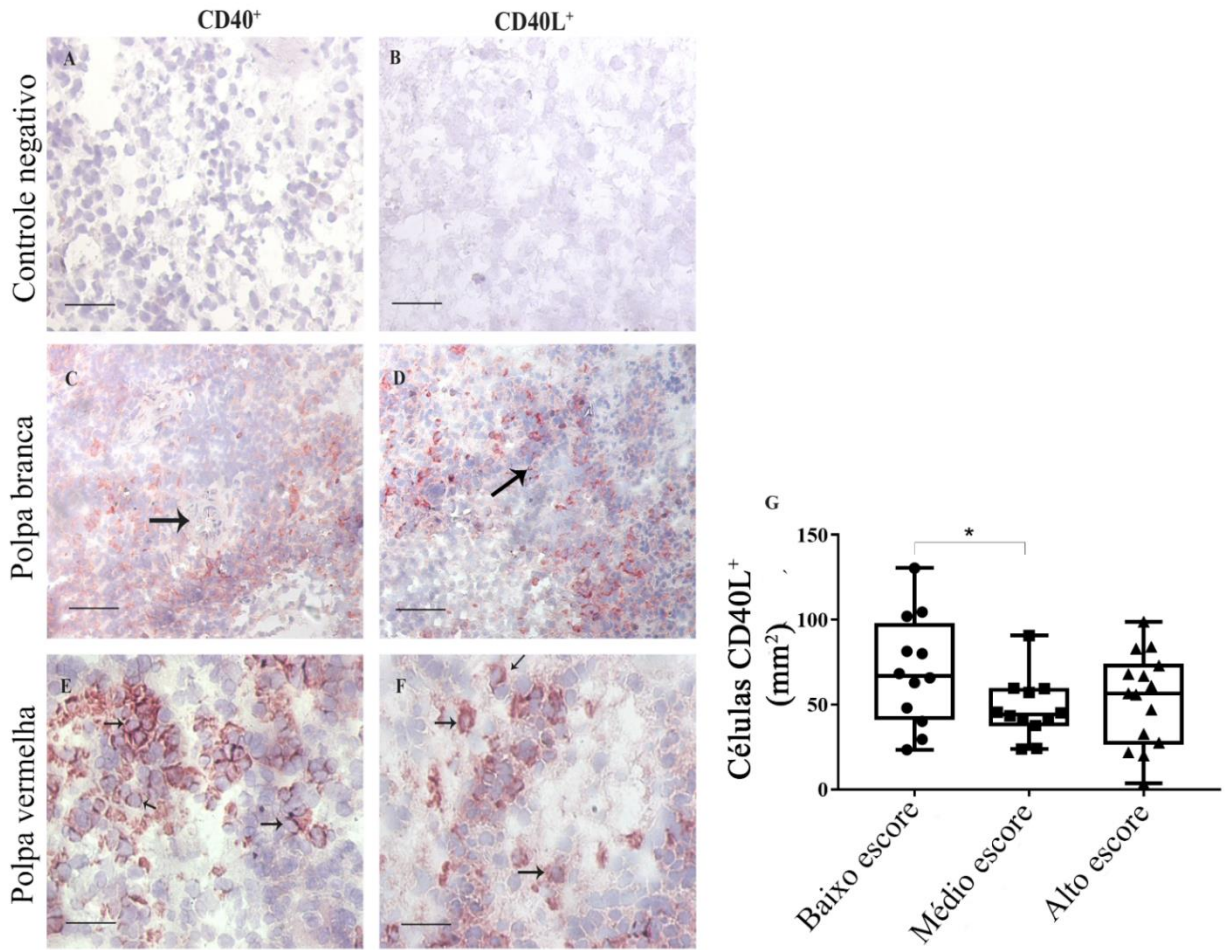


Figura 4.2.3- Cães com médio escore clínico apresentaram menor quantidade de células CD40L+ no baço. As células CD40L⁺ e CD40⁺ foram avaliadas por imunohistoquímica. Em A e B, controle negativo. Em C e D, células CD40⁺ e CD40L⁺ imunomarcadas na polpa branca. Em E e F, células CD40⁺ e CD40L⁺ na polpa vermelha. Em C e D, as setas indicam a arteriolar central da polpa branca. Em E e F, as setas indicam células marcadas. Cromogênio 3-amino-9-etilcarbazol-AEC e contracoloração com hematoxilina de Meyer. Barra de aumento A-F 25µm. Pvalue 0,018. Em G, quantificação de células CD40L⁺/mm² de acordo com o escore clínico. Teste ANOVA de uma via e teste de comparações múltiplas de Tukey. Número de animais aplicados neste experimento: CD40⁺ e CD40L⁺ 39 animais.

4.2.2.5 Animais com polpa branca desorganizada apresentaram menor quantidade de células iNOS⁺

A expressão de TNF- α e iNOS foi analisada pela técnica de imunohistoquímica nos diferentes grupos formados de acordo com a organização da PBE, escore clínico, carga parasitária e grupos combinados entre a carga parasitária e o grau de organização da PBE (Figura 4.2.4 A-F; número de animais avaliados neste estudo TNF- α e iNOS: 39 animais). A citocina TNF- α é tem como ação, ativar a função microbicida de macrófagos infectados. Ao avaliarmos a expressão do TNF- α , não observamos diferenças na expressão dessa citocina quando os grupos eram comparados. A expressão do TNF- α é uma importante ferramenta para a ativação da produção de compostos de ácidos tóxicos, como, por exemplo, o óxido nítrico produzido pela ação enzimática da enzima iNOS que atua no controle do crescimento e eliminação de *Leishmania (L) infantum*. Assim, ao avaliarmos a expressão dessa enzima, observamos que animais com PBE com média à intensa desorganização apresentaram menor expressão de iNOS do aqueles com a PBE organizada (Figura 4.2.4 p: 0,03 MD-ID: Mediana 9,73; Min-Máx: 2,96-29,25; OR-PD: Mediana 17,25 Min-Máx: 5,79-33,16). Além disso, quando observamos a expressão desta enzima em grupos combinados entre a carga parasitária e o grau de organização da PBE, observamos que animais com PBE desorganizada e baixa carga parasitária apresentaram redução na expressão de iNOS⁺ quando comparados aos animais com PBE organizada e baixa carga parasitária (Figura 4.2.4 H BCP/DS: Mediana 10,04 Min-Máx-: 4,14-28,26; BCP/OR: Mediana 17,90 Min-Máx: 5,79-33,16). Ao analisar os outros grupos, não observamos diferenças significativas na quantidade de células TNF- α e iNOS⁺.

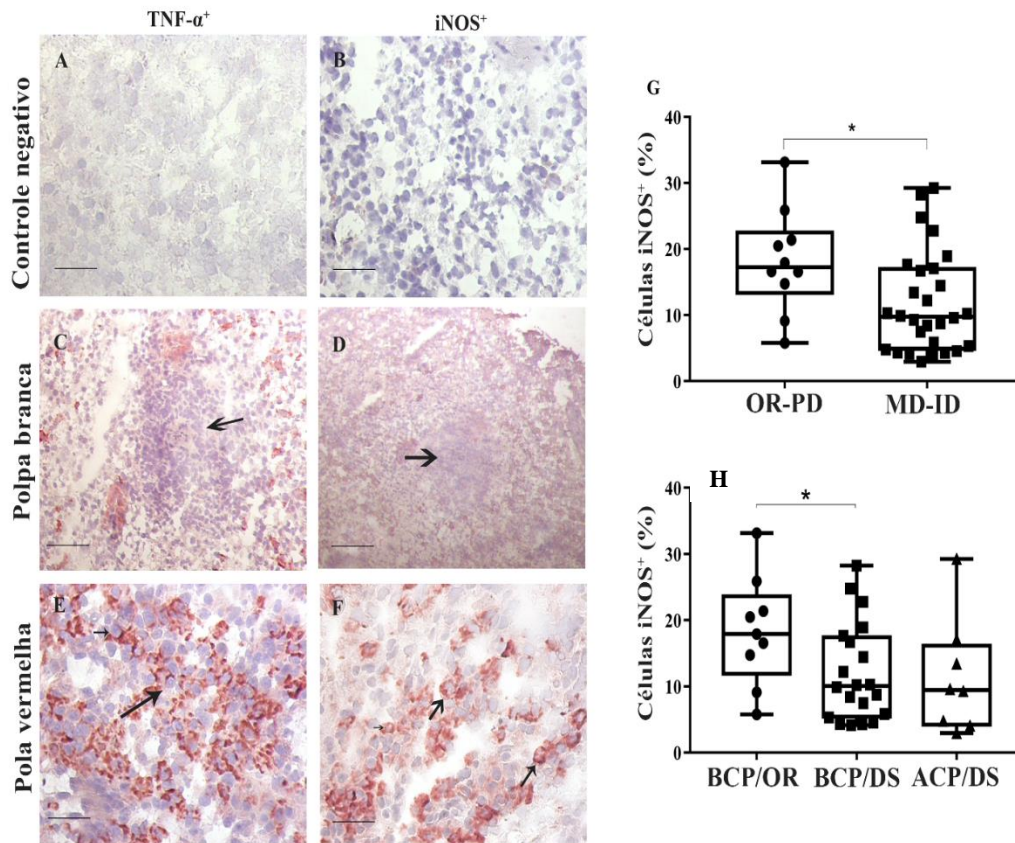


Figura 4.2.4 - A enzima iNOS foi menos expressa em baço de animais com polpa branca desorganizada. As células iNOS+ e TNF- α + foram detectadas por imunohistoquímica. Em A e B, controle negativo. Em C, células TNF- α + na polpa branca esplênica. Em D, células iNOS+ na polpa branca esplênica. As setas indicam a arteriolar central da polpa branca esplênica. Em E, células TNF- α + na polpa vermelha. Em F, células iNOS+ na polpa vermelha. As setas indicam células marcadas. Cromogênio 3-amino-9-etilcarbazol-AEC e contracoloração com hematoxilina de Meyer. Barra de ampliação A-F 25 μ m Em G,% iNOS+ de acordo com a carga do parasita (pvalor 0,03). Em H,% iNOS+ de acordo com a carga parasitária e organização da polpa esplênica branca (valor p 0,034). Teste de Meann-Whitney. OR-PD: polpa esplênica branca organizada À pouco desorganizada. MD-ID: polpa esplênica branca desorganizada moderada a intensamente. BCP: carga parasita baixa. ACP: alta carga parasitária. BCP/OR: baixa carga parasitária e polpa branca esplênica organizada. BCP/DS: baixa carga parasitária e polpa branca esplênica desorganizada. ACP/DS: alta carga parasitária e polpa branca esplênica desorganizada. Número amostral deste experimento: TNF- α + e iNOS+ 39 animais.

Tabela 4.2.2.1 Dados quantitativos da marcação dos alvos imunohistoquímicos aplicados no estudo.

Animal register	Escore clínico	Carga parasitária 10% Cells	Organização da PBE	Grupo combinado	Deposição de colágeno I/III mm ²	Deposição de colágeno IV/mm ²	Deposição de laminina/mm ²	Fibroblastos ER-TR7+ mm ²	Fibroblastos ER-TR7+ %	CD40+ mm ²	CD40L+ mm ²	B7+ cells mm ²	B7+ cells %	CD28+ mm ²	TNF- α + cells mm ²	iNOS+ cells %
001/2013	7	6,06	4	3	NA	39,41	3,18	16,85	NA	85,33	72,89	NA	NA	NA	21,07	29,25
002/2013	0	2,48	4	2	NA	54,23	NA	NA	25,26	15,64	40,18	NA	NA	64,36	13,66	4,55
003/2013	6	5,37	4	2	NA	42,19	NA	15,99	NA	NA	NA	NA	NA	NA	,22	NA
004/2013	6	3,98	3	2	2,93	68,42	29,33	NA	6,27	83,20	90,67	115,56	7,42	NA	26,88	24,77
001/2014	1	3,69	4	2	1,09	NA	NA	25,26	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
002/2014	2	4,66	4	2	NA	85,44	7,30	23,10	21,68	60,80	23,47	257,78	21,08	NA	19,19	16,70
003/2014	6	6,16	4	3	2,95	43,22	NA	25,88	9,06	25,60	43,38	298,67	5,12	1,07	11,21	9,59
004/2014	9	7,31	3	3	5,69	72,30	17,09	18,14	10,15	30,58	32,71	206,22	9,79	19,20	10,75	2,96
005/2014	2	4,86	4	2	3,66	67,45	25,85	18,16	7,12	97,07	68,27	NA	NA	27,02	22,57	28,26
006/2014	5	5,13	3	2	4,42	67,99	28,48	22,48	18,16	49,42	41,96	7,11	,32	34,13	27,84	18,91
007/2014	3	4,78	1	1	1,85	64,45	23,27	23,31	8,81	60,09	45,16	122,67	4,22	26,67	15,07	33,16
008/2014	3	6,84	3	3	6,41	86,64	19,94	14,40	9,14	32,71	24,18	206,22	6,84	42,67	3,05	4,77
009/2014	9	4,88	3	2	1,98	66,67	17,85	11,64	4,82	69,69	82,84	183,11	9,31	30,93	10,08	8,75
010/2014	5	4,23	4	2	5,62	51,57	NA	8,32	4,56	70,04	37,69	NA	NA	17,42	4,02	4,30
011/2014	8	4,33	3	2	8,80	75,52	13,96	NA	3,26	28,44	27,38	NA	NA	23,47	16,53	10,27
012/2014	7	4,57	2	1	2,67	77,01	14,86	NA	NA	33,78	19,91	122,67	4,67	NA	40,29	25,87
015/2014	2	5,22	4	2	1,38	55,61	14,25	19,51	NA	34,84	29,51	NA	NA	23,82	2,96	9,88
016/2014	4	4,06	1	1	1,75	65,75	9,24	56,03	7,65	70,04	57,24	211,56	10,70	NA	16,78	5,79
017/2014	0	6,16	2	NA	1,85	70,80	21,58	34,09	21,97	65,07	65,78	NA	NA	24,18	15,46	16,61
018/2014	6	4,41	3	2	7,91	19,96	1,73	58,11	13,37	39,82	59,38	136,89	5,39	38,04	11,11	12,21
019/2014	7	6,34	3	3	7,30	37,89	6,35	16,91	22,79	36,62	3,56	296,89	14,42	NA	8,30	4,04
020/2014	0	4,66	3	2	NA	46,45	24,36	NA	6,63	45,16	102,04	39,11	4,15	40,53	15,40	4,27
021/2014	0	4,63	2	1	0,91	37,71	NA	NA	NA	37,69	80,00	236,44	16,06	35,56	25,06	21,39
022/2014	0	2,16	2	1	1,35	5,74	NA	NA	NA	33,07	104,53	NA	NA	17,07	,35	20,49
023/2014	0	4,96	2	1	1,76	42,42	NA	21,32	NA	17,78	48,00	NA	NA	22,40	7,56	16,54
024/2014	8	5,02	2	1	1,46	48,41	NA	26,82	8,36	34,49	55,82	110,22	4,80	NA	11,17	14,75
025/2014	1	4,89	1	1	2,40	54,64	NA	25,08	10,52	56,18	62,93	74,67	9,01	56,53	10,54	9,11
026/2014	3	6,17	3	3	1,06	52,88	NA	44,90	9,83	19,20	59,73	369,78	21,85	26,67	9,70	13,41
027/2014	8	4,72	2	1	3,45	78,08	NA	91,13	17,61	40,18	60,89	190,22	7,28	NA	15,60	17,90
028/2014	2	2,29	3	2	1,04	37,88	NA	35,06	30,01	57,60	130,49	288,00	12,39	94,58	14,56	17,65
029/2014	8	5,11	4	2	NA	61,02	NA	19,28	13,75	17,07	67,91	NA	NA	68,98	5,96	14,45
030/2014	4	5,22	3	2	1,16	78,96	NA	NA	7,56	46,58	45,51	NA	NA	113,78	12,32	22,79
031/2014	5	5,78	4	3	3,90	25,27	NA	33,75	NA	46,22	98,84	NA	NA	NA	13,23	9,28
032/2014	0	2,50	4	2	2,79	64,47	NA	52,94	13,24	11,02	23,82	NA	NA	55,82	3,32	4,14
033/2014	9	4,32	4	2	2,28	59,57	NA	NA	20,76	35,56	56,53	131,56	6,10	46,93	1,96	7,47
034/2014	9	4,16	2	1	0,21	NA	NA	25,09	NA	31,29	81,42	NA	NA	NA	NA	NA
035/2014	6	6,61	3	3	1,06	66,73	NA	NA	9,84	48,71	83,91	416,00	29,62	66,84	6,46	17,07
036/2014	12	2,90	4	2	NA	48,96	NA	34,69	NA	40,89	66,84	NA	NA	NA	6,98	5,86
037/2014	10	2,49	4	2	NA	74,28	NA	57,70	13,60	18,49	41,24	53,33	3,99	28,44	10,51	8,40

NA: Não aplicados

Tabela 4.2.2.2 Dados quantitativos da análise da migração *in vitro* por ensaio de transwell

	Escore clínico	Carga parasitária	Organização da polpa branca esplênica	Migração basal Baço	Migração basal CPMS	Migração basal linfonodo	Índice de migração induzida AgLi Baço	Índice de migração induzida AgLi CMSP	Índice de migração induzida AgLi Linfonodo	Índice de migração induzida LPS Spleen	Índice de migração induzida LPS CMSP	Índice de migração induzida LPS linfonodo	Índice de migração CCL19 Baço	Índice de migração CMSP	Índice de migração induzida linfonodo	Índice de migração CXCL13 Baço	Índice de migração CXCL13 CMSP	Índice de migração induzida Linfonodo
Animal register																		
143/18	1,00	1,00	NA	67	NA	NA	-17,00	NA	NA	-47,00	NA	NA	23,50	NA	NA	32,50	NA	NA
144/18	1,00	2,00	NA	17	NA	NA	3,00	NA	NA	-14,00	NA	NA	15,00	NA	NA	16,00	NA	NA
145/18	2,00	2,00	NA	3	NA	NA	9,00	NA	NA	,00	NA	NA	10,50	NA	NA	14,50	NA	NA
146/18	1,00	1,00	1,00	5	NA	NA	-3,50	NA	NA	-4,00	NA	NA	-3,00	NA	NA	-4,50	NA	NA
147/18	2,00	1,00	2,00	0	NA	,00	3,00	NA	,00	,00	NA	,00	1,50	NA	,00	13,50	NA	,50
148/18	2,00	1,00	2,00	28	NA	NA	14,00	NA	NA	-8,00	NA	NA	27,00	NA	NA	11,00	NA	NA
149/18	1,00	1,00	1,00	80	NA	17,00	-1,00	NA	-8,00	-37,00	NA	-8,00	10,50	NA	11,50	-26,00	NA	-9,50
150/18	1,00	1,00	2,00	155	46,00	64,00	-28,00	-18,00	-48,50	-64,00	-17,00	-19,00	-39,00	21,50	-33,50	-17,00	41,00	-12,50
151/18	2,00	1,00	2,00	101	105,0	NA	43,00	-19,00	NA	-27,00	-24,00	NA	11,50	-36,00	NA	33,50	-22,00	NA
152/18	2,00	1,00	2,00	117	5,00	NA	112,00	5,50	NA	-74,00	7,00	NA	120,50	6,50	NA	144,00	6,00	NA
153/18	1,00	2,00	2,00	71	18,00	NA	45,00	21,00	NA	28,00	-5,00	NA	103,50	23,50	NA	106,00	46,50	NA
154/18	1,00	1,00	2,00	453	16,00	NA	-85,50	11,00	NA	-164,00	13,00	NA	-44,00	47,00	NA	-77,00	27,00	NA
155/18	1,00	1,00	1,00	141	63,00	NA	23,00	6,00	NA	-133,00	-11,00	NA	26,50	47,00	NA	20,00	30,00	NA
158/19	2,00	1,00	2,00	200	6,00	4,00	158,50	9,50	3,50	-82,00	6,00	-3,00	175,00	13,00	16,00	126,50	12,50	13,00
161/19	1,00	1,00	2,00	84	22,00	15,00	271,50	21,50	-5,00	-45,00	3,00	3,00	287,50	8,50	-1,00	264,50	11,00	-4,50
162/19	2,00	1,00	2,00	1	13,00	2,00	137,50	-5,00	1,00	24,00	-2,00	1,00	160,00	-3,00	3,50	183,00	-2,00	2,50
167/19	1,00	NA	1,00	118	42,00	NA	141,50	-5,00	NA	2,00	-32,00	NA	194,50	-25,50	NA	73,50	-9,50	NA
168/19	2,00	NA	1,00	192	12,00	NA	-33,50	9,00	NA	-80,00	4,00	NA	-40,00	7,00	NA	-46,00	4,50	NA
171/18	1,00	NA	NA	55	5,00	5,00	39,50	10,50	1,50	-17,00	5,00	-2,00	34,00	16,50	2,00	43,50	8,00	-1,50
172/18	1,00	NA	NA	5	31,00	7,00	571,00	30,00	-6,50	-2,00	13,00	-2,00	551,00	33,00	-2,00	577,00	30,50	4,00
173/19	2,00	NA	2,00	1	4,00	8,00	222,50	-3,50	-,50	7,00	11,00	2,00	253,00	-2,00	2,00	240,00	-3,00	,00
174/19	1,00	NA	2,00	11	7,00	2,00	54,50	16,00	2,50	9,00	3,00	-2,00	58,50	19,50	1,00	52,00	12,50	3,00
175/19	2,00	NA	2,00	25	,00	2,00	57,50	12,50	5,50	16,00	,00	4,00	45,00	8,50	9,50	45,00	13,00	8,00
176/19	2,00	NA	2,00	38	12,00	NA	14,50	8,00	NA	-2,00	-4,00	NA	5,50	17,50	NA	2,50	6,50	NA
177/18	2,00	NA	2,00	0	NA	NA	2,00	NA	NA	,00	NA	NA	,00	NA	NA	1,50	NA	NA
185/18	1,00	NA	2,00	1	NA	-1,00	1,00	NA	-3,00	1,00	NA	-3,00	,00	NA	-1,50	1,00	NA	-2,50

NA: Não aplicado

5.0 Discussão Geral

Os estudos de infecção natural na Leishmaniose visceral canina permitem o entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na interação *Leishmania* sp.-células do sistema imunológico canino, bem como o impacto desta interação no microambiente tecidual. Neste sentido, o baço vem ganhando destaque uma vez que, quando comparados aos demais órgãos passíveis de infecção, tem se mostrado um órgão de persistência parasitária. Assim, o presente estudo avaliou o impacto da presença da *Leishmania (L.) infantum* no microambiente esplênico e observamos que a desorganização deste microambiente foi um processo frequente nos cães analisados no estudo. Além disso, essa desorganização foi acompanhada pela alteração nos componentes estruturais da matriz extracelular (MEC). A desorganização da PBE ocorre ainda quando a carga parasitária é baixa e pode estar associada ao processo de depleção dos linfócitos T CD4⁺. O microambiente tímico é responsável por coordenar os eventos de maturação dos linfócitos T. Do timo, os linfócitos maduros ganham a circulação sanguínea e seguem para colonizar os órgãos linfoides secundários, incluindo o baço. Neste estudo, observamos que não somente o baço apresentava alterações em sua microarquitetura, mas também o timo. O timo foi passível de infecção por *Leishmania* e apresentava danos teciduais que podem impactar no processo de maturação dos linfócitos T e na liberação de linfócitos T maduros para a periferia. O dano tecidual no timo foi caracterizado por infiltrado inflamatório granulomatoso e piogranulomatoso, e a matriz extracelular estava alterada: houve um aumento na deposição de fibronectina em animais que apresentavam doença mais avançada. Assim, o microambiente tímico comprometido poderia levar a saída prematura dos linfócitos T imaturos que colonizariam o baço e influenciaria negativamente a resposta imune esplênica à infecção.

O timo é o principal órgão de maturação de linfócitos T e sua microarquitetura organiza os eventos de maturação deste perfil celular (190). Este órgão é dividido em região cortical e medular e estas regiões são fundamentais para a retenção das células, a partir da interação de integrinas e receptores de integrinas entre a MEC e os timócitos em estágio de maturação, interação entre timócitos e células dendríticas e seleção do repertório de CD4 ou CD8 e o seu comprometimento com estes receptores (171,193). Em estudos publicados em modelo experimental em camundongos, tem sido descrita a redução da razão entre as regiões córtico:medulares em camundongos desnutridos e infectados com *Leishmania (L.) infantum* (26,138,288). Além disso, neste mesmo microambiente, há redução de linfócitos T CD4⁺ CD8⁺ duplo positivos exemplificando que é possível que as

subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (288) circulantes poderiam estar afetadas, uma vez que eles deixam o microambiente intratímico ainda num estágio imaturo. Em uma robusta revisão, De Meis e colaboradores (289) descreveram o impacto de infecções no processo de maturação dos linfócitos T.

O microambiente tímico e a sua manutenção em córtex e região medular são fundamentais para o processo de maturação dos linfócitos T. Em processos infecciosos experimentais por vírus, parasitas como *Trypanosoma cruzi*, *Schistosoma mansoni* e *Plasmodium berghei*, o microambiente tímico sofre processo de atrofia associados à redução da divisão visível entre as regiões corticomedulares, locais para o primeiro contato do precursor de linfócitos T e início do processo de maturação dos linfócitos T (132,191,206,290,291). Assim, no artigo I que compõe essa tese, fizemos a primeira descrição da presença de amastigotas de *Leishmania. (L.) infantum* no timo de cães naturalmente infectados. A presença do parasita *Leishmania. (L.) infantum* induziu a formação de dano tecidual caracterizado por reação inflamatória granulomatosa e piogranulomatosa com a presença de infiltrados de macrófagos e neutrófilos. Além disso, a formação de reação granulomatosa não foi eficaz no controle da carga parasitária, uma vez que os macrófagos observados estavam intensamente parasitados. A resposta celular mediada por linfócitos T CD4⁺, macrófagos e granulomas bem formados tem sido associada ao quadro de controle da carga parasitária (292–294). No entanto, no presente trabalho observamos que em regiões de reação inflamatória granulomatosa e piogranulomatosa houve intenso parasitismo de macrófagos, principais células mediadoras da função de granulomas.

Ao olharmos para o microambiente intratímico, observamos que houve aumento na deposição de fibronectina, que atua na formação estrutural do timo e também no processo de migração celular, como a entrada de precursores de linfócitos T e saída dos linfócitos T maduros. O aumento desta proteína de MEC poderia levar a alteração no processo de maturação dos linfócitos T, permitindo que linfócitos T duplo positivos deixem o ambiente tímico antes de finalizar seus estágios de maturação, no entanto, outros pontos devem ser avaliados para confirmar esta hipótese (289). Além disso, em estudo murino desnutrido de infecção por *Leishmania (L.) infantum*, foi descrita a saída de linfócitos T duplo positivos do timo e a apoptose destes no baço (288). Contudo, nossos dados não nos permitem associar o timo ao baço, mas estudos sobre a cinética entre o timo e o baço devem ser avaliados levando em consideração o processo natural de involução tímica. É possível que a saída prematura de linfócitos T duplo positivos do timo, resultantes de um aumento de estímulo de

emigração, possam impactar a função imunoregulatória da resposta imune celular nos órgãos linfoides periféricos como o linfonodo e o baço.

A persistência parasitária no baço é um dos principais elementos que dificultam a cura dos animais. Vários estudos buscam entender quais fatores estariam associados a este fenômeno. Santana e colaboradores (77) descreveram a atrofia das regiões de compartimentalizações específicas para nichos linfoides. Cavalcanti e colaboradores (9) também observaram a atrofia folicular. No artigo II, foi realizada a análise da desorganização da polpa branca esplênica (PBE) de cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) infantum* (55). Assim, tomados dos resultados que compõem o estudo em questão, observamos que a desorganização da PBE é um processo que ocorre frequentemente na microarquitetura esplênica de cães infectados. Além disso, o grau de desorganização da PBE foi mais intenso em animais com maior escore clínico, exemplificando que o quadro clínico do animal poderia ser um marcador para o comprometimento da organização do tecido esplênico. Além disso, a maioria dos cães avaliados no estudo apresentaram baixa carga parasitária, sendo portanto, possível inferir que a desorganização da PBE é um processo que ocorre quando a carga parasitária ainda é baixa e tal desorganização pode favorecer a falha no controle da carga parasitária, uma vez que a ausência destes compartimentos afetaria diretamente o desenvolvimento da resposta imune mediada por linfócitos T e B (55,81,82).

A desorganização da PBE pode estar associada a múltiplos fatores. No artigo II, demonstramos que animais com PBE desorganizada apresentavam maior deposição de colágeno I/III e laminina, importantes componentes estruturais do arcabouço esplênico. Além disso, foi demonstrado aumento na expressão da metalopeptidase-9 (MMP-9) neste mesmo grupo, sugerindo uma possível alteração na dinâmica funcional do baço. Foi descrito ainda que animais com polpa branca desorganizada e baixa carga parasitária apresentaram redução nos nichos de linfócitos T CD4+, mas não houve alteração no perfil de proliferação celular. Muitos fatores podem estar associados a depleção dos linfócitos, entre eles danos na microarquitetura intratímica, barreiras físicas pelo intenso remodelamento da MEC, redução da capacidade responsiva migratória celular mediada por quimiocinas e receptores de quimiocinas (81,204).

Esses dados em conjunto, nos levaram a hipotetizar que o microambiente esplênico poderia estar comprometido e esse dano estaria associado à formação de barreiras migracionais devido ao remodelamento da MEC e alterações na deposição de laminina e colágeno. Assim, as células encontrariam dificuldade para migrar por este microambiente, tanto devido a formação de

barreira física, quanto pela redução da expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas no tecido esplênico que já vem sendo descritos por outros autores (9,81). As alterações na deposição dos componentes estruturais da PBE poderiam estar induzindo uma barreira migracional através do aumento na deposição dos componentes estruturais das proteínas laminina e colágeno I/III. Por outro lado, as células usam o sistema de condutas para se guiarem, através de um gradiente quimiotático, por dentro dos tecidos linfoides, dentre eles, o baço. O sistema de condutas é parte da matriz extracelular que compõe os órgãos linfoides e é formado por uma rede de canais que transportam moléculas de baixo peso molecular através do tecido linfóide. O interior dos canais do sistema de condutas é formado por proteínas estruturais da MEC, como por exemplo colágenos tipos I e III. As fibras de colágeno são envolvidas por fibroblastos reticulares que mantêm o conteúdo e selam os canais do sistema de condutas.

Assim, no artigo III que compõe os dados do presente estudo, reunimos os dados da literatura mais relevantes sobre o processo de remodelamento da MEC e do sistema de condutas, levando em consideração os seus compartimentos e estruturas necessárias para a promoção da migração de células que atuam no desenvolvimento da resposta imunológica frente às infecções. Neste artigo, estão descritos as enzimas e os estímulos que atuam nesse processo, além das alterações que ocorrem na composição do sistema de condutas, e o impacto do processo infeccioso neste sistema presente nos órgãos linfoides. Os fibroblastos reticulares ER-TR7+ são células responsáveis por secretarem proteínas que constituem o arcabouço estrutural da MEC. Além desta função, estes fibroblastos revestem o sistema de condutas e realizam a manutenção deste sistema. Em infecção experimental murina com L. (L.) major, foi descrita a infecção de fibroblastos reticulares indicando que estas células podem ser sítios de infecção e manutenção do parasita em cultura in vitro (295). Assim, com base nestes dados e nas alterações que tínhamos observado na MEC do baço de cães infectados, hipotetizamos que a desorganização da PBE poderia ser um reflexo tanto da barreira física migracional através da alteração dos componentes estruturais da MEC bem como da alteração na constituição e manutenção do sistema de condutas.

Para investigar o perfil migratório, os experimentos foram divididos em 2 etapas: 1) análise do sistema de condutas, 2) Análise do potencial migratório in vitro. Ao pensarmos nos processos migratórios levamos em consideração os sistemas de condutas, que são pouco explorados nos tecidos linfoides (176,188,296) e exercem importante função de guiar as células em processo de migração em função do gradiente de quimiocinas (188). Vale ressaltar que este sistema de condutas

é constituído por colágenos I, III e IV, laminina V, proteoglicans de heparan sulfato, nidogênio e revestido por fibroblastos reticulares que estão intimamente associados e interagindo com as células migrantes(187,188). O lúmen desse sistema é responsável por carrear pequenas moléculas proteicas, entre elas as quimiocinas e assim estão associados com a dinâmica migratória (189).

Desta forma, investigamos a presença de fibroblastos reticulares (ER-TR7+), e a expressão de laminina V e colágenos dos tipos I, III e IV e observamos que em animais com médio escore clínico a presença de fibroblastos reticulares foi menor quando comparados aos animais com baixo escore clínico. Além disso, juntamente com a redução de fibroblastos reticulares, observamos que a deposição de colágeno tipo I e III estava aumentada nestes mesmos animais e nos animais com polpa branca de médio à intensa desorganização, sugerindo alterações morfofuncionais no sistema de conduites, possivelmente em função da presença do parasita no baço de cães naturalmente infectados e assim resultando numa possível alteração no potencial migratório. Não observamos alteração na deposição de laminina V, no entanto, mais estudos devem explorar a deposição desta proteína da membrana basal.

Em adição ao estudo do sistema de conduites, analisamos o potencial migratório *in vitro* de células isoladas do baço, sangue e linfonodo. Assim, ao analisarmos a capacidade responsiva migratória na ausência de reforço antigênico e quimiotático (Basal), observamos que esplenócitos apresentaram maior capacidade responsiva migracional quando comparados às células isoladas de linfonodo, e não diferiram das células isoladas de sangue periférico. Este resultado sugere que esplenócitos mantiveram a sua capacidade de responder naturalmente aos estímulos quimiotáticos e antigênicos presentes no tecido esplênico.

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) estimuladas por AgLi e na presença de CXCL13 ou CCL19 apresentaram maior capacidade migracional quando comparadas às células estimuladas apenas por CXCL13 ou CCL19. Assim, o estímulo antigênico somado à ação quimiotática é capaz de estimular o potencial migratório de CMSP, ou seja, ao saírem do sítio de inoculação natural e entrarem nos vasos sanguíneos, as CMSP apresentam capacidade de migração e podem chegar a diferentes órgãos do mamífero, inclusive os órgãos linfáticos. Esse potencial de disseminação sistêmica é muito bem discutido em diferentes estudos tanto em modelo natural de infecção canina (Animais que foram infectados naturalmente via vetor em seus ambientes naturais de domicílio) quanto em modelo experimental em murinos(10,26,77,297–299). Tem sido descrito na literatura o papel de co-infecções e o impacto destas co-infecções sobre os patógenos e o sistema

imune hospedeiro (20,300). Em co-infecção com HIV e *Leishmania sp.* tem sido mostrado um papel sinérgico e benéfico para o crescimento tanto do vírus quanto do parasita, mas o poder/impacto na disseminação de células infectadas por HIV e demais patógenos não têm sido abordados (164,301–304). Ao avaliarmos a capacidade responsiva migracional de CMSP em estímulo por CCL19 observamos que CMSP também apresentaram elevada capacidade responsiva frente a esta quimiocina, mostrando que independente do estímulo quimiotático, as CMSP apresentam capacidade de responder e migrar em função do estímulo quimiotático e antigênico mediado por AgLi.

A próxima etapa foi investigar a capacidade migratória de esplenócitos, onde eles foram cultivados na ausência ou presença de estímulo com AgLi ou LPS. Após o estímulo, os esplenócitos foram cultivados em sistema transwell na presença ou ausência das quimiocinas CXCL13 e CCL19. Quando em presença de AgLi, esplenócitos apresentaram maior capacidade de migração quando comparados à esplenócitos que migraram na presença de somente CXCL13 ou CCL19. Assim, podemos inferir que os antígenos parasitários por si só já estimulam o processo migracional das células isoladas do baço. Quando comparamos os estímulos antigênicos, vimos que, em comparação ao LPS, o estímulo com AgLi foi capaz de induzir maior migração e o mesmo foi observado quando estimulamos esplenócitos com AgLi na presença das quimiocinas.

Ao compararmos os diferentes grupos baseados na organização da PBE, grupos clínicos e carga parasitária, não observamos diferenças significativas. Da Silva et al (81) descreveram que cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) infantum*, apresentaram atrofia da polpa branca esplênica e essa redução foi associada à redução da expressão do RNAm de CXCL13 o que poderia impactar na compartimentalização das subpopulações de linfócitos B. Neste estudo, os autores observaram também, redução das populações de linfócitos T e células dendríticas, principalmente nos animais com PBE desorganizada. No presente estudo, não observamos diferenças migracionais em relação aos grupos formados e este dado sugere que a redução da celularidade nos diferentes nichos de linfócitos não esteja relacionado a uma menor capacidade de expressão de receptores de quimiocinas ou de resposta às mesmas, mas provavelmente por um impedimento físico formado pelo aumento de depósito e/ou desorganização das moléculas de matrix extracelular (laminina e colágeno).

Em resumo, observamos que a migração espontânea de esplenócitos foi maior do que das células isoladas do sangue periférico ou linfonodo. Como os esplenócitos foram isolados de um ambiente onde a resposta imune anti-parasitária já foi iniciada, é possível que seus receptores de quimiocinas já estejam empenhados e por isso a migração basal tenha sido superior às células isoladas

de sangue periférico e de linfonodo. Isso também explicaria o motivo pelo qual, em muitos casos, a adição da quimiocina não tenha trazido efeito adicional à migração celular estimulada pelo AgLi isolado. Outro dado que nos chamou atenção foi a ausência de resposta das células isoladas do linfonodo. Não houve migração celular em nenhuma das situações testadas para estas células. Além disso, estudos em modelo de desnutrição murina tem demonstrado que o linfonodo perde sua capacidade de retenção de células infectadas no seu microambiente (139). Além de observarem a falha na barreira do linfonodo, Ibrahim e colaboradores (139) descreveram a presença de amastigotas *Leishmania (L.) infantum* na forma livre identificadas no interior da microarquitetura do linfonodo em associação com os sistemas de conduites, e que as mesmas deixam o microambiente sem que haja alguma reação ou resposta dos mecanismos imunológicos do linfonodo. Assim, essas amastigotas e demais células infectadas chegam ao baço e isso pode sobrecarregar o tecido esplênico, uma vez que o baço passa a ser o único tecido linfoide ativo.

Trabalhos recentes têm mostrado desorganização da microarquitetura do linfonodo de camundongos e cães infectados. Como a infecção ocorre naturalmente na pele e o parasita é regurgitado pelo flebotomíneo diretamente na junção dermo-epidérmica, onde os vasos linfáticos são mais abundantes que vasos sanguíneos (27,125,305,306), é possível que a infecção dos linfonodos preceda à infecção no baço, já que é provável que o parasita alcance primeiramente a circulação linfática, e posteriormente com a progressão da infecção, alcance a circulação sistêmica e o baço(139,199). Para verificação desta hipótese seguiremos com a análise das alterações histopatológicas dos linfonodos de cães naturalmente infectados incluídos neste estudo e a verificação da possível associação destas alterações com a perda de capacidade de resposta migratória.

A migração celular esplênica durante a LVC tem sido pouco explorada. Estudos em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) infantum* demonstraram que no baço desses animais há aumento dos níveis de CCL5 e CXCL10, importantes quimiocinas recrutadoras de leucócitos e linfócitos T efetores em função do aumento de IFN- γ (307). Por outro lado, em infecção experimental neste mesmo modelo, foi descrito aumento de CCL2, CCL3 e CXCL13 associado ao possível aumento do recrutamento de monócitos, linfócitos TCD4+ e TCD8+ (307). No entanto, no artigo II, demonstramos que em cães naturalmente infectados com PBE desorganizada há redução nas subpopulações de linfócitos T CD4+, reforçando a hipótese de que em um microambiente desorganizado, as células poderiam encontrar barreiras migracionais devido a danos na matriz extracelular e no sistema de conduites. Além disso, embora não tenhamos observado dano na

capacidade responsiva frente a quimocina, é descrito na literatura que existe a redução de quimiocinas e seus receptores em infecção natural canina por *Leishmania (L.) infantum* (81). Esta redução associada a atrofia folicular gera uma dificuldade para a célula em alcançar seus sítios específicos afetando o processo de ativação e produção de reagentes como óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral (TNF) que são fundamentais no combate a infecção por parasita intracelular.

Para testar a hipótese de que a desorganização da PBE e os consequentes danos no processo migratório poderiam estar associados a um déficit na ativação celular, investigamos a via de coestímulo mediada pela interação entre CD40 e CD40L. As células apresentadoras de antígenos expressam o receptor CD40 e seu ligante, CD40L é expresso principalmente pela subpopulação de linfócitos T CD4+. Assim, ao observarmos a expressão de CD40, não vimos alterações na expressão desta molécula quando os grupos foram comparados. No entanto, quando avaliamos a expressão de CD40L, observamos que animais com médio escore clínico apresentam redução da expressão de CD40L quando comparados com animais com baixo escore clínico. De forma interessante, neste mesmo grupo de animais houve redução dos fibroblastos reticulares que revestem o sistema de conduite. Assim, os linfócitos T poderiam sofrer apoptose uma vez que não conseguem chegar nos seus respectivos nichos devido a danos no sistema de conduite e redução de quimiocinas e seus receptores (81). Assim as células entrariam em processo de anergia seguida por apoptose influenciando na resposta imune mediada por células, no controle da carga parasitária e assim progressão da doença.

A resposta imune mediada por células é fundamental na eliminação do parasita intracelular obrigatório *Leishmania sp* através da produção das citocinas IFN- γ e TNF- α que atuam na ativação microbicida de macrófagos que produzem NO e assim eliminam o parasita intracelular (128,308,309). No presente estudo investigamos a expressão de TNF- α e a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS). Assim, não observamos diferença significativa na expressão de TNF- α nas variáveis aplicadas no estudo. Porém, quando analisamos a expressão de iNOS, enzima produtora de NO, observamos que animais com polpa branca desorganizada apresentaram redução da expressão desta enzima quando comparados aos animais com polpa branca organizada. Assim, podemos inferir que a redução de iNOS acarreta na redução da expressão de NO, que é um dos principais componentes eficazes contra a *L. (L.) infantum* durante a resposta imune adaptativa e isso favoreceria o crescimento parasitário e persistência do mesmo no microambiente esplênico, afetando assim a homeostase do remodelamento da matriz extracelular esplênica. Para complementar este

resultado, observamos que animais com baixa carga parasitária e polpa branca desorganizada apresentaram redução na expressão desta enzima quando comparados ao grupo composto por animais com polpa branca organizada e baixa carga parasitária. A redução da expressão de iNOS pode favorecer o aumento da carga parasitária e progressão da doença. Este dado exemplifica o processo de imunossupressão que é frequentemente observado em cães com Leishmaniose visceral. Vale ressaltar que a redução da expressão desta enzima pode ser um fator associado a depleção de linfócitos T CD4+ e da expressão de CD40L+ que são importantes células e moléculas envolvidas na resposta imune adaptativa (277,308).

6.0 Conclusão

A desorganização da polpa branca esplênica é uma alteração frequentemente encontrada em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) infantum* mesmo quando a carga parasitária ainda é baixa. Esta alteração é acompanhada de redução dos nichos de células CD4⁺ e aumento da expressão de metalopeptidase-9 e moléculas de matriz extracelular como laminina e colágenos tipos I e III. Concluimos então que há um processo de remodelamento da matriz extracelular esplênica em cães infectados com *Leishmania infantum*.

A redução dos nichos de células CD4⁺ não é devida a alterações na capacidade de proliferação e nem na capacidade de migração celular *in vitro*. No entanto, componentes do sistema de conduítes, como por exemplo fibroblastos reticulares ER-TR4⁺ e colágeno tipo I/III se mostraram alterados o que poderia comprometer a migração dos linfócitos *in vivo* para seus respectivos compartimentos na polpa branca. A cooperação celular ficaria comprometida, assim como a ativação de macrófagos e linfócitos, representados pela redução respectivamente de iNOS e CD40L. Haveria perda do controle da replicação parasitária e progressão da doença.

Não somente o baço, mas também o timo pode ser afetado durante a LVC uma vez que parasitas foram identificados neste órgão linfoide, assim como alterações inflamatórias e danos teciduais. Nele, também há remodelamento na MEC caracterizado pelo aumento de fibronectina nos animais sintomáticos. É possível que estas alterações impactem nos processos de maturação de linfócitos T, e assim como em outros modelos de infecção, a liberação de linfócitos imaturos para a circulação sistêmica prejudiquem a resposta imune nos órgãos linfoides secundários.

7.0 Referências

1. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2095–128.
2. Pigott DM, Bhatt S, Golding N, Duda KA, Battle KE, Brady OJ, et al. Global distribution maps of the leishmaniasis. *Elife*. 2014;3.
3. Alvar J. *Las leishmaniasis: de la biología al control*. Madrid: Instituto de Salud Carlos III; 2019. 200 p. 2. Almeida AB, Sousa VR, Gasparetto ND, da Silva GF, Figueiredo FB, Dutra V, Nakazato L MMC visceral leishmaniasis: diagnostic approaches based on polymerase chain reaction employing different biological samples. *DMID* 2013; 76(3): 321-4, 3. Amato V, Amato J, Nicodemo A, Uip D A-NVT of mucocutaneous leishmaniasis with pentamidine isethionate. *ADV* 1998;125(8):492-5., 4. Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis [Internet]. 2019. 166 p. Available from: www.paho.org
4. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5).
5. Edoardo Torres-Guerrero MRQ-C, Julieta Ruiz-Esmenjaud RA. Leishmaniasis: a review. *F1000Research* [Internet]. 2017 May [cited 2020 Aug 5];6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5464238/>
6. da Silva DA, Madeira M de F, Figueiredo FB. Expansão geográfica da leishmaniose visceral canina no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015;57(5):435–8.
7. Arenas R, Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J. Leishmaniasis: A review [Internet]. Vol. 6, *F1000Research*. Faculty of 1000 Ltd; 2017 [cited 2020 Aug 12]. Available from: [/pmc/articles/PMC5464238/?report=abstract](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5464238/?report=abstract)
8. da Graça GC, Volpini AC, Romero GAS, Neto MP de O, Hueb M, Porrozzi R, et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(5):664–74.
9. Cavalcanti AS, Ribeiro-Alves M, De O. R. Pereira L, Mestre GL, Ferreira ABR, Morgado

- FN, et al. Parasite load induces progressive spleen architecture breakage and impairs cytokine mRNA expression in *Leishmania infantum*-naturally infected dogs. *PLoS One*. 2015;10(4).
10. Morgado FN, Cavalcanti A dos S, Miranda LH de, O'Dwyer LH, Silva MRL da, Menezes RC, et al. Hepatozoon canis and *Leishmania* spp. coinfection in dogs diagnosed with visceral leishmaniasis. *Rev Bras Parasitol Veterinária* [Internet]. 2016 Dec 1;25(4):450–8. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612016000400450&lng=en&tlng=en
 11. Parmentier L, Cusini A, Müller N, Zangger H, Hartley MA, Desponds C, et al. Case Report: Severe cutaneous leishmaniasis in a human immunodeficiency virus patient coinfecting with *Leishmania braziliensis* and its endosymbiotic virus. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;
 12. Oliveira V da C, Boechat VC, Mendes Junior AAV, Madeira M de F, Ferreira LC, Figueiredo FB, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* in the central nervous system of naturally infected dogs: Parasite load, viability, co-infections and histological alterations. Stäger S, editor. *PLoS One* [Internet]. 2017 Apr 18;12(4):e0175588. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0175588>
 13. de Oliveira GM, Madeira M de F, Oliveira FS, Pires MQ, Pacheco R da S. Canine Cutaneous Leishmaniasis: Dissemination and Tissue Tropism of Genetically Distinct *Leishmania (Viannia) braziliensis* Populations. *Vet Med Int* [Internet]. 2013;2013:1–5. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/vmi/2013/982183/>
 14. Travi BL, Osorio EY, Saldarriaga OA, Cadena H, Tabares CJ, Peniche A, et al. Clinical, parasitologic, and immunologic evolution in dogs experimentally infected with sand fly-derived *Leishmania chagasi* promastigotes. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;
 15. Magalhães-Junior JT, Mota TF, Porfirio-Passos G, Lorangeira DF, Franke CR, Barrouin-Melo SM. Xenodiagnosis on dogs with visceral leishmaniasis: Canine and sand fly aspects related to the parasite transmission. *Vet Parasitol* [Internet]. 2016 Jun [cited 2018 May 22];223:120–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440171630142X>
 16. de Carvalho FLN, Riboldi E de O, Bello GL, Ramos RR, Barcellos RB, Gehlen M, et al. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: a comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. *Epidemiol Infect* [Internet]. 2018 Apr 26;146(5):571–6. Available from:

- https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0950268818000225/type/journal_article
17. Rebouças-Silva J, Celes FS, Lima JB, Barud HS, De Oliveira CI, Berretta AA, et al. Parasite Killing of *Leishmania (V) braziliensis* by Standardized Propolis Extracts. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2017;2017.
 18. Nunes RV, Quaresma PF, Rugani JMN, Teixeira-Neto RG, Saboia Vahia L, da Silva ES. Molecular characterization of *Leishmania infantum* isolates in municipalities of the state of Minas Gerais, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 2018 Jan 1;112(1):43–5. Available from: <https://academic.oup.com/trstmh/article/112/1/43/4939454>
 19. Saporito L, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C. Visceral leishmaniasis: Host-parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2013;17(8):e572–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2012.12.024>
 20. Lindoso JAL, Cunha MA, Queiroz IT, Moreira CHV. Leishmaniasis–HIV coinfection: Current challenges. *HIV/AIDS - Res Palliat Care*. 2016;8:147–56.
 21. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. Bañuls A-L, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2016 Mar 3;10(3):e0004349. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
 22. Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G. A Revised Classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today* [Internet]. 2000 Apr;16(4):142–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169475899016099>
 23. Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasites and Vectors*. 2017;10(1):1–10.
 24. Brazil. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. [Internet]. Editora MS; 2014. 120 p. Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf
 25. Gupta G, Oghumu S, Satoskar AR. Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. In 2013 [cited 2018 May 22]. p. 155–84. Available from: <https://www.google.com.br/search?q=Gupta+G%2C+Oghumu+S%2C+Satoskar+AR.+Mechanisms+of+immune+evasion+in+leishmaniasis.+Adv+Appl+Microbiol.+2013%3B82%3A155-84.&dq=Gupta+G%2C+Oghumu+S%2C+Satoskar+AR.+Mechanisms+of+immune+eva>

- sion+in+leishmaniasis.+Adv+Appl+Mi
26. Losada-Barragán M, Umaña-Pérez A, Cuervo-Escobar S, Berbert LR, Porrozzi R, Morgado FN, et al. Protein malnutrition promotes dysregulation of molecules involved in T cell migration in the thymus of mice infected with *Leishmania infantum*. *Sci Rep*. 2017;
 27. Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* [Internet]. 2007 Aug [cited 2019 Mar 11];37(10):1097–106. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2675784/>
 28. Lainson R, Ryan L, Shaw JJ. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 1987 Sep;82(3):421–4. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761987000300015&lng=en&tlng=en
 29. Sacks DL, Pimenta PFP, McConville MJ, Schneider P, Turco SJ. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med* [Internet]. 1995 Feb 1;181(2):685–97. Available from: <https://rupress.org/jem/article/181/2/685/50670/Stagespecific-binding-of-Leishmania-donovani-to>
 30. Da Silva IA, Morato CI, Quixabeira VBL, De Araújo Pereira LI, Dorta ML, De Oliveira MAP, et al. In Vitro Metacyclogenesis of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* clinical field isolates, as evaluated by morphology, complement resistance, and infectivity to human macrophages. *Biomed Res Int*. 2015;2015(Lcl).
 31. Sant’Anna MR, Nascimento A, Alexander B, Dilger E, Cavalcante RR, Diaz-Albiter HM, et al. Chicken blood provides a suitable meal for the sand fly *Lutzomyia longipalpis* and does not inhibit *Leishmania* development in the gut. *Parasites and Vectors*. 2010;3(1):1–11.
 32. Vianna EN, Morais MHF, de Almeida AS, Sabroza PC, Reis IA, Dias ES, et al. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* in urban households as risk factor of transmission of visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111(5):302–10.
 33. Ursine RL, Dias JVL, Morais HA, Pires HHR. Human and canine visceral leishmaniasis in an emerging focus in Araçuaí, Minas Gerais: spatial distribution and socio-environmental factors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2016 Jul 4 [cited 2019 Feb

- 3];111(8):505–11. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4981116/>
34. Moraes CS, Aguiar-Martins K, Costa SG, Bates PA, Dillon RJ, Genta FA. Second Blood Meal by Female *Lutzomyia longipalpis*: Enhancement by Oviposition and Its Effects on Digestion, Longevity, and Leishmania Infection. *Biomed Res Int*. 2018;2018.
 35. Vercosa BB, Melo CC, Mendonca II, Silva SS, Carvalho SS, Goto HH, et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. *BMC Vet Res* [Internet]. 2008 Nov;4(1):45. Available from: <http://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-6148-4-45>
 36. Costa DJ, Carvalho RM de A, Abbehusen M, Teixeira C, Pitombo M, Trigo J, et al. Experimental Infection of Dogs with *Leishmania* and Saliva as a Model to Study Canine Visceral Leishmaniasis. *PLoS One*. 2013;
 37. Aslan H, Oliveira F, Meneses C, Castrovinci P, Gomes R, Teixeira C, et al. New insights into the transmissibility of *leishmania infantum* from dogs to sand flies: Experimental vector-transmission reveals persistent parasite depots at bite sites. *J Infect Dis*. 2016;
 38. Werneck GL. Visceral leishmaniasis in Brazil: Rationale and concerns related to reservoir control. *Rev Saude Publica*. 2014;48(5):851–6.
 39. Alemayehu B, Alemayehu M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. *Heal Sci J*. 2017;11(4):1–6.
 40. Lainson R, Rangel BF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;
 41. Rangel EF, Vilela ML. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2008;24(12):2948–52.
 42. Gomes R, Oliveira F. The immune response to sand fly salivary proteins and its influence on *Leishmania* immunity. *Front Immunol*. 2012;3(MAY):1–8.
 43. Lainson R, Rangel BF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(8):811–27.
 44. Carregaro V, Costa DL, Brodskyn C, Barral AM, Barral-Netto M, Cunha FQ, et al. Dual effect of *Lutzomyia longipalpis* saliva on *Leishmania braziliensis* infection is mediated by distinct saliva-induced cellular recruitment into BALB/c mice ear. *BMC Microbiol*.

- 2013;13(1).
45. Tibúrcio R, Nunes S, Nunes I, Ampuero MR, Silva IB, Lima R, et al. Molecular aspects of dendritic cell activation in leishmaniasis: An immunobiological view. *Front Immunol*. 2019;10(FEB).
 46. Liu D, Uzonna JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2012;2(June):83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22919674> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3417671>
 47. Engwerda CR, Ato M, Kaye PM. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *Trends in Parasitology*. 2004.
 48. Vitoriano-Souza J, Reis AB, Moreira ND, Giunchetti RC, Correa-Oliveira R, Carneiro CM. Kinetics of cell migration to the dermis and hypodermis in dogs vaccinated with antigenic compounds of *Leishmania braziliensis* plus saponin. *Vaccine*. 2008;26(31):3922–31.
 49. Martin CJ, Peters KN, Behar SM. Macrophages clean up: Efferocytosis and microbial control. *Curr Opin Microbiol*. 2014;17(1):17–23.
 50. DeSouza-Vieira T, Guimarães-Costa A, Rochael NC, Lira MN, Nascimento MT, Lima-Gomez P de S, et al. Neutrophil extracellular traps release induced by *Leishmania* : role of PI3K γ , ERK, PI3K σ , PKC, and [Ca²⁺]. *J Leukoc Biol*. 2016 Oct;100(4):801–10.
 51. Flannery AR, Renberg RL, Andrews NW. Pathways of iron acquisition and utilization in *Leishmania*. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2013 Dec;16(6):716–21. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527413001197>
 52. Silva-Gomes S, Vale-Costa S, Appelberg R, Gomes MS. Iron in intracellular infection: To provide or to deprive? *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3(DEC):1–11.
 53. Podinovskaia M, Descoteaux A. *Leishmania* and the macrophage: A multifaceted interaction. *Future Microbiol*. 2015;10(1):111–29.
 54. Teixeira DE, Benchimol M, Rodrigues JCF, Crepaldi PH, Pimenta PFP, de Souza W. The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. *PLoS Pathog*. 2013;9(10):8–11.
 55. da Silva AVA, Figueiredo FB, Menezes RC, Mendes-Junior AA, de Miranda LHM, Cupolillo E, 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 Negl Trop Dis*. 2018 Apr 20;12(4).
56. Silva AVA, Souza TL, Figueiredo FB, Mendes AA V., Ferreira LC, Filgueira CPB, et al. Detection of amastigotes and histopathological alterations in the thymus of *Leishmania infantum* -infected dogs. *Immunity, Inflamm Dis* [Internet]. 2020 Jun 24 [cited 2020 Mar 25];8(2):127–39. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/iid3.285>
 57. Solbach W, Laskay T. The Host Response to *Leishmania* Infection. *Adv Immunol*. 1999;74:275–317.
 58. Silva LC, Castro RS, Figueiredo MM, Michalick MSM, Tafuri WL, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease. *Int J Exp Pathol* [Internet]. 2013 Apr [cited 2018 May 22];94(2):133–43. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3607142/>
 59. de Vasconcelos TCB, Doyen N, Cavaillon J-M, Bruno SF, de Campos MP, de Miranda LHM, et al. Cytokine and iNOS profiles in lymph nodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* and their association with the parasitic DNA load and clinical and histopathological features. *Vet Parasitol* [Internet]. 2016 Aug [cited 2018 May 22];227:8–14. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030440171630276X>
 60. Kelly PH, Bahr SM, Serafim TD, Ajami NJ, Petrosino JF, Meneses C, et al. The gut microbiome of the vector *Lutzomyia longipalpis* is essential for survival of *Leishmania infantum*. *MBio*. 2017;
 61. Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl* [Internet]. 2014 Dec;3(3):251–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.08.004>
 62. Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol* [Internet]. 1996 Sep;14(5):523–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0738081X96000417>
 63. Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson MK. Identifying reservoirs of infection: A conceptual and practical challenge. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(12):1468–73.
 64. dos Santos Nogueira F, Avino VC, Galvis-Ovallos F, Pereira-Chiocola VL, Moreira MAB, Romariz APPL, et al. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasit Vectors* [Internet]. 2019 Dec 8 [cited 2019 Feb 23];12(1):79. Available from: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-019-3323-0>

65. Sev AP, Ovallos FG, Amaku M, Carrillo E, Moreno J, Galati EAB, et al. Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. Traub-Csek YM, editor. PLoS One [Internet]. 2016 Jul 29 [cited 2018 May 22];11(7):e0160058. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0160058>
66. Borja LS, Sousa OMF de, Solc M da S, Bastos LA, Bordoni M, Magalhães JT, et al. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. *Vet Parasitol* [Internet]. 2016;229:110–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.10.004>
67. Nunes CM, Pires MM, da Silva KM, Assis FD, Filho JG, Perri SHV. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. *Vet Parasitol* [Internet]. 2010 May [cited 2018 May 22];170(1–2):131–3. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401710000786>
68. Laurenti MD, Rossi CN, Matta VLR da, Tomokane TY, Corbett CEP, Secundino NFC, et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi to the natural vector. *Vet Parasitol*. 2013;
69. PANARO MA, BRANDONISIO O, CIANCIULLI A, CAVALLO P, LACASELLA V, PARADIES P, et al. Cytokine expression in dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Parasitology* [Internet]. 2009 Jul 2;136(8):823–31. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182009006155/type/journal_article
70. Rocha MAN, Matos-Rocha TJ, Ribeiro CMB, Abreu SRO. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in State of Alagoas, Northeast, Brazil. *Brazilian J Biol* [Internet]. 2018 Feb 5 [cited 2020 May 28];78(4):609–14. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842018000400609&lng=en&tlng=en
71. Nunes CM, Lima VMF de, Paula HB de, Perri SHV, Andrade AM de, Dias FEF, et al. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol*. 2008;153(1–2):19–23.
72. Nunes CM, Pires MM, da Silva KM, Assis FD, Filho JG, Perri SHV. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. *Vet Parasitol*. 2010;170(1–2):131–3.
73. Ortega-Pacheco A, Jimenez-Coello M. Debate For and Against Euthanasia in the Control of Dog Populations. In: *Euthanasia - The “Good Death” Controversy in Humans and*

- Animals [Internet]. InTech; 2011. Available from: <http://www.intechopen.com/books/euthanasia-the-good-death-controversy-in-humans-and-animals/debate-for-and-against-euthanasia-in-the-control-of-dog-populations>
74. Vaz TP, Gama-Melo MO, Quaresma PF, Gontijo CMF, Santos G, Barbosa FS, et al. Evaluation of the euthanasia of seropositive dogs for canine visceral leishmaniasis as the only method of controlling the disease in the enzootic area in the Midwestern Minas Gerais. *Pesqui Veterinária Bras* [Internet]. 2020 Feb;40(2):107–12. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2020000200107&tlng=en
 75. Márquez M, Pedregosa JR, López J, Marco-Salazar P, Fondevila D, Pumarola M. Leishmania amastigotes in the central nervous system of a naturally infected dog. *J Vet Diagnostic Investig* [Internet]. 2013 Jan 19;25(1):142–6. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1040638712466728>
 76. Mendes RS, Gurjão TA, Oliveira LM, Santana VL, Tafuri WL, Santos JRS, et al. Miocardite crônica em um cão naturalmente infectado com Leishmania (Leishmania) infantum chagasi: Aspectos clínicos e patológicos. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 2014;66(1):79–84.
 77. SANTANA CC, VASSALLO J, DE FREITAS LAR, OLIVEIRA GGS, PONTES-DE-CARVALHO LC, DOS-SANTOS WLC. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. *Parasite Immunol* [Internet]. 2008 Oct;30(10):515–24. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3024.2008.01051.x>
 78. Abbehusen MMC, Dos Anjos Almeida V, Da SM, Da Silva Pereira L, Costa DJ, Gil-Santana L, et al. Clinical and immunopathological findings during long term follow-up in Leishmania infantum experimentally infected dogs. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–11.
 79. Santana CC, de Freitas LAR, Oliveira GGS, Dos-Santos WLC. Disorganization of spleen compartments and dermatitis in canine visceral leishmaniasis. *Surg Exp Pathol* [Internet]. 2019 Dec 30;2(1):14. Available from: <https://www.surgexppathol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s42047-019-0040-0>
 80. Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2009 Mar [cited 2018 Apr 1];128(1–3):87–95. Available from:

- <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165242708003929>
81. Silva JS, Andrade AC, Santana CC, Santos LQ, de Oliveira CI, Veras PST, et al. Low CXCL13 expression, splenic lymphoid tissue atrophy and germinal center disruption in severe canine visceral leishmaniasis. *PLoS One*. 2012;
 82. Lima IS, Silva JS, Almeida VA, Junior FGL, Souza PA, Larangeira DF, et al. Severe Clinical Presentation of Visceral Leishmaniasis in Naturally Infected Dogs with Disruption of the Splenic White Pulp. Schallig HDFH, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Feb 3 [cited 2018 May 22];9(2):e87742. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0087742>
 83. Silva JN da, Cotrim AC, Conceição LAV da, Marins CMF, Marchi PGF de, Honorio-França AC, et al. Immunohaematological and rheological parameters in canine visceral leishmaniasis. *Rev Bras Parasitol Veterinária* [Internet]. 2018 May 24;27(2):211–7. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612018000200211&lng=en&tlng=en
 84. Paranhos-Silva M, Grimaldi G, Santos WC, Oliveira-Dos-Santos AJ, Pontes-de-Carvalho LC, Freitas LAR. A Cross-Sectional Serodiagnostic Survey of Canine Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1996 Jul 1;55(1):39–44. Available from: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.1996.55.39>
 85. Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a Cohort of Brazilian Dogs: Why Culling Fails to Control Visceral Leishmaniasis in Areas of High Transmission. *J Infect Dis* [Internet]. 2002 Nov;186(9):1314–20. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/344312>
 86. Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenber J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun* [Internet]. 1994;62(1):229–35. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=186091&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 87. Manna L, Paciello O, Morte R, Gravino A. Detection of *Leishmania* parasites in the testis of a dog affected by orchitis: case report. *Parasit Vectors* [Internet]. 2012;5(1):216. Available from: *Parasites & Vectors*
 88. Rodriguez-Cortes A, Martori C, Martinez-Florez A, Clop A, Amills M, Kubejko J, et al. Canine Leishmaniasis Progression is Associated with Vitamin D Deficiency. 2017;(May):1–10. Available from: <https://pdf-nature-com.sire.ub.edu/redirect->

- nature?ddsId=art:10.1038/s41598-017-03662-4&originUrl=https://www.nature.com/articles/s41598-017-03662-4&contentType=pdf
89. Moreira PRR, Fernando FS, Montassier HJ, André MR, de Oliveira Vasconcelos R. Polarized M2 macrophages in dogs with visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* [Internet]. 2016 Aug;226:69–73. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401716302515>
 90. Moreira PRR, Franciscato DA, Rossit SM, Munari DP, Vasconcelos R de O. Influence of apoptosis on liver and spleen resistance in dogs with visceral leishmaniosis. *Rev Bras Parasitol Veterinária*. 2016;25(3):342–7.
 91. Ministério da Saúde. Leishmaniose Visceral [Internet]. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 2014. 120 p. Available from: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf
 92. Brasil. Ministério da Saúde. Tegumentar americana. 2013. Ministério da Saúde da 2013. Manual de vigilância.
 93. Marcondes M, de Lima VMF, de Araújo M de FL, Hiramoto RM, Tolezano JE, Vieira RFC, et al. Longitudinal analysis of serological tests officially adopted by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune®. *Vet Parasitol*. 2013;197(3–4):649–52.
 94. DEPLAZES P, SMITH NC, ARNOLD P, LUTZ H, ECKERT J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol* [Internet]. 1995 Sep;17(9):451–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3024.1995.tb00914.x>
 95. De Oliveira Mendes C, Paraguai De Souza E, Borja-Cabrera GP, Melo Batista LM, Aparecida Dos Santos M, Parra LE, et al. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniosis. *Vaccine*. 2003;
 96. Hashiguchi Y, Gomez EL, Kato H, Martini LR, Velez LN, Uezato H. Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: Clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. Vol. 44, *Tropical Medicine and Health*. BioMed Central Ltd.; 2016.
 97. Laranjeira DF, Da Matta VLR, Tomokane TY, Marcondes M, Corbet CEP, Laurenti MD. Serological and infection statuses of dogs from a visceral leishmaniasis-endemic area. *Rev Saude Publica*. 2014;48(4):563–70.
 98. Faria AR, Andrade HM de. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes

- avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Rev Pan-Amazônica Saúde*. 2012;3(2):47–57.
99. Testasica MC d. S, dos Santos MS, Machado LM, Serufo AV, Doro D, Avelar D, et al. Antibody responses induced by Leish-Tec®, an A2-based vaccine for visceral leishmaniasis, in a heterogeneous canine population. *Vet Parasitol [Internet]*. 2014;204(3–4):169–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.04.025>
 100. Figueiredo FB, Vasconcelos TCB de, Madeira M de F, Menezes RC, Maia-Elkhoury ANS, Marcelino AP, et al. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]*. 2018 Nov 1;113(11):e180260. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762018001100303&lng=en&tlng=en
 101. Lage RS, Oliveira GC, Busek SU, Guerra LL, Giunchetti RC, Corrêa-Oliveira R, et al. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2007;115(1–2):135–45.
 102. Castellanos-Gonzalez A, Saldarriaga OA, Tartaglino L, Gacek R, Temple E, Sparks H, et al. A novel molecular test to diagnose canine visceral leishmaniasis at the point of care. *Am J Trop Med Hyg*. 2015 Nov 4;93(5):970–5.
 103. Velez R, Ballart C, Domenech E, Abras A, Fernández-Arévalo A, Gómez SA, et al. Seroprevalence of canine *Leishmania infantum* infection in the Mediterranean region and identification of risk factors: The example of North-Eastern and Pyrenean areas of Spain. *Prev Vet Med*. 2019;162(April 2018):67–75.
 104. Salomón OD, Pérez AA, Riarte AR, Casas N, Fragueiro-Frías V, Negri V, et al. Performance of rapid tests for canine visceral leishmaniasis diagnosis in Argentina. *Medicina (B Aires)*. 2020;80(2):103–10.
 105. Proverbio D, Spada E, Giorgi GB de, Perego R. Failure of miltefosine treatment in two dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Case Reports Vet Med*. 2014;2014:640151-Article ID 640151.
 106. Dorlo TPC, Balasegaram M, Beijnen JH, de vries PJ. Miltefosine: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(11):2576–97.
 107. Manna L, Vitale F, Reale S, Picillo E, Neglia G, Vescio F, et al. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniasis. *Vet J [Internet]*. 2009;182(3):441–

5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.08.009>
108. Pinto-Martinez AK, Rodriguez-Durán J, Serrano-Martin X, Hernandez-Rodriguez V, Benaim G. Mechanism of Action of Miltefosine on *Leishmania donovani* Involves the Impairment of Acidocalcisome Function and the Activation of the Sphingosine-Dependent Plasma Membrane Ca²⁺ Channel. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2017 Oct 23;62(1):1–10. Available from: <https://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01614-17>
109. Farca AM, Miniscalco B, Badino P, Odore R, Monticelli P, Triscioglio A, et al. Canine leishmaniasis: In vitro efficacy of miltefosine and marbofloxacin alone or in combination with allopurinol against clinical strains of *Leishmania infantum*. *Parasitol Res*. 2012;110(6):2509–13.
110. Santos MF, Alexandre-Pires G, Pereira MA, Marques CS, Gomes J, Correia J, et al. Meglumine antimoniate and miltefosine combined with allopurinol sustain pro-inflammatory immune environments during canine leishmaniasis treatment. *Front Vet Sci*. 2019;6(October).
111. Vouldoukis I, Rougier S, Dugas B, Pino P, Mazier D, Woehrlé F. Canine visceral leishmaniasis: Comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. *Vet Parasitol* [Internet]. 2006 Jan [cited 2018 Apr 2];135(2):137–46. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401705004450>
112. Travi BL, Cordeiro-da-Silva A, Dantas-Torres F, Miró G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. Büscher P, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2018 Jan 11;12(1):e0006082. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0006082>
113. Dorlo TPC, Balasegaram M, Beijnen JH, de vries PJ. Miltefosine: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. Vol. 67, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012. p. 2576–97.
114. Rijal S, Ostry B, Uranw S, Rai K, Bhattarai NR, Dorlo TPC, et al. Increasing Failure of Miltefosine in the Treatment of Kala-azar in Nepal and the Potential Role of Parasite Drug Resistance, Reinfection, or Noncompliance. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2013 Jun 1;56(11):1530–8. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/cit102>
115. Mishra J, Singh S. Miltefosine resistance in *Leishmania donovani* involves suppression of

- oxidative stress-induced programmed cell death. *Exp Parasitol* [Internet]. 2013;135(2):397–406. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.08.004>
116. Van Bockstal L, Bulté D, Hendrickx S, Sadlova J, Volf P, Maes L, et al. Impact of clinically acquired miltefosine resistance by *Leishmania infantum* on mouse and sand fly infection. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* [Internet]. 2020;13(April):16–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.04.004>
 117. Palumbo E. Oral miltefosine treatment in children with visceral leishmaniasis: A brief review. *Brazilian J Infect Dis*. 2008;12(1):2–4.
 118. Sundar S, Olliaro PL. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. *Ther Clin Risk Manag* [Internet]. 2007 Oct;3(5):733–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18472998>
 119. Monge-Maillo B, Lopez-Velez R. Miltefosine for Visceral and Cutaneous Leishmaniasis: Drug Characteristics and Evidence-Based Treatment Recommendations. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2015 Jan 18;60(9):1398–404. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/civ004>
 120. Velez R, Gállego M. Commercially approved vaccines for canine leishmaniosis: a review of available data on their safety and efficacy. *Trop Med Int Heal*. 2020;25(5):540–57.
 121. Araújo MSS, Andrade RA de, Vianna LR, Mayrink W, Reis AB, Sathler-Avelar R, et al. Despite Leishvaccine and Leishmune® trigger distinct immune profiles, their ability to activate phagocytes and CD8+ T-cells support their high-quality immunogenic potential against canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*. 2008;
 122. Campos MP de, Luca PM De, Renzetti AR dos S, Souza SMM de, Mendes Júnior AAV, Barros RS, et al. Can vaccines against canine visceral leishmaniasis interfere with the serological diagnostics recommended by the Brazilian Ministry of Health? *Ciência Rural*. 2017;47(4):1–6.
 123. Nogueira FS, Moreira MAB, Borja-Cabrera GP, Santos FN, Menz I, Parra LE, et al. Leishmune® vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: Absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine*. 2005;23(40):4805–10.
 124. Tavares NM, Santos DM, de Oliveira CI, Brodskyn CI. Tégias De V a Cinação Contra Leishmaniose Visceral E Cutânea : Estratégias Va Lições Dos Modelos Experiment Ais Experimentais Vaccination Strategies Against Visceral and Cutaneous Leishmaniasis : *Gaz Médica da Bahia*. 2009;79(96):110–21.

125. Rogers KA, DeKrey GK, Mbow ML, Gillespie RD, Brodskyn CI, Titus RG. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2002;209(1):1–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12007646>
126. Khadem F, Uzonna JE. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. *Futur Microbiol*. 2014;9(7):901–15.
127. Rodrigues A, Claro M, Alexandre-Pires G, Santos-Mateus D, Martins C, Val??rio-Bolas A, et al. *Leishmania infantum* antigens modulate memory cell subsets of liver resident T lymphocyte. *Immunobiology*. 2017;
128. Bogdan C, Röllinghoff M. The immune response to *Leishmania*: Mechanisms of parasite control and evasion. In: *International Journal for Parasitology*. 1998.
129. Remer KA, Apetrei C, Schwarz T, Linden C, Moll H. Vaccination with plasmacytoid dendritic cells induces protection against infection with *Leishmania major* in mice. *Eur J Immunol* [Internet]. 2007 Sep;37(9):2463–73. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.200636780>
130. de Souza TL, da Silva AVA, Pereira L de OR, Figueiredo FB, Mendes Junior AAV, Menezes RC, et al. Pro-Cellular Exhaustion Markers are Associated with Splenic Microarchitecture Disorganization and Parasite Load in Dogs with Visceral Leishmaniasis. *Sci Rep* [Internet]. 2019 Dec 10;9(1):12962. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-49344-1>
131. Oliveira VVG de, Alves LC, Silva Junior VA da. Patologias genitais associadas à leishmaniose visceral canina. *Ciência Rural* [Internet]. 2012;42(9):1614–20. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782012000900016&lng=pt&nrm=iso&tlng=en
132. Majumdar S, Nandi D. Thymic Atrophy: Experimental Studies and Therapeutic Interventions. *Scand J Immunol* [Internet]. 2018 Jan;87(1):4–14. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/sji.12618>
133. de Freitas EO, Leoratti FM de S, Freire-de-Lima CG, Morrot A, Feijó DF. The contribution of immune evasive mechanisms to parasite persistence in visceral Leishmaniasis. *Front Immunol*. 2016;7(APR):1–7.
134. Korom S, Hancock WW, Coito AJ, Kupiec-Weglinski JW. BLOCKADE OF VERY LATE ANTIGEN-4 INTEGRIN BINDING TO FIBRONECTIN IN ALLOGRAFT RECIPIENTS. *Transplantation* [Internet]. 1998 Mar;65(6):854–9. Available from: <http://journals.lww.com/00007890-199803270-00014>

135. Menezes, Juliana Perrone de EMS and B da R-A. The site of the bite: Leishmania interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. *Parasit Vectors* [Internet]. 2016;1–8. Available from: <http://download.springer.com/static/pdf/509/art%3A10.1186%2Fs13071-016-1540-3.pdf?originUrl=http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/article/10.1186/s13071-016-1540-3&token2=exp=1462793074~acl=/static/pdf/509/art%25253A10.1186%25>
136. Wyler DJ, Sypek JP, McDonald JA. In vitro parasite-monocyte interactions in human leishmaniasis: Possible role of fibronectin in parasite attachment. *Infect Immun*. 1985;49(2):305–11.
137. Dye C, Williams BG. Malnutrition, Age and the Risk of Parasitic Disease: Visceral Leishmaniasis Revisited. *Proc R Soc B Biol Sci*. 1993;
138. Losada-Barragán M, Umaña-Pérez A, Durães J, Cuervo-Escobar S, Rodríguez-Vega A, Ribeiro-Gomes FL, et al. Thymic microenvironment is modified by malnutrition and *Leishmania infantum* infection. Vol. 9, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2019.
139. Ibrahim MK, Barnes JL, Anstead GM, Jimenez F, Travi BL, Peniche AG, et al. The Malnutrition-Related Increase in Early Visceralization of *Leishmania donovani* Is Associated with a Reduced Number of Lymph Node Phagocytes and Altered Conduit System Flow. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(8).
140. Papadogiannakis EI, Koutinas AF. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2015;163(3–4):94–102. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.11.011>
141. Hurrell BP, Regli IB, Tacchini-Cottier F. Different *Leishmania* Species Drive Distinct Neutrophil Functions. *Trends Parasitol* [Internet]. 2016;32(5):392–401. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2016.02.003>
142. Abdo JM, Sopko NA, Milner SM. The applied anatomy of human skin: A model for regeneration. *Wound Med* [Internet]. 2020;28(January):100179. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.wndm.2020.100179>
143. Menon GK, Cleary GW, Lane ME. The structure and function of the stratum corneum. *Int J Pharm* [Internet]. 2012;435(1):3–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.005>
144. Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC, Wong JK. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Exp Dermatol*. 2016;25(2):92–8.

145. Lerner EA, Ribeiro JMC, Nelson RJ, Lerner MR. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem*. 1991;266(17):11234–6.
146. Brodie TM, Smith MC, Morris R V., Titus RG. Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages. *Infect Immun*. 2007;75(5):2359–65.
147. Morris R V., Shoemaker CB, David JR, Lanzaro GC, Titus RG. Sandfly Maxadilan Exacerbates Infection with *Leishmania major* and Vaccinating Against It Protects Against *L. major* Infection . *J Immunol*. 2001;167(9):5226–30.
148. Tavares NM, Silva RA, Costa DJ, Pitombo MA, Fukutani KF, Miranda JC, et al. *Lutzomyia longipalpis* saliva or salivary protein LJM19 protects against *Leishmania braziliensis* and the saliva of its vector, *Lutzomyia intermedia*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(5).
149. Gurung P, Kanneganti TD. Innate immunity against *Leishmania* infections. *Cellular Microbiology*. 2015.
150. Joshi PB, Kelly BL, Kamhawi S, Sacks DL, McMaster WR. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol Biochem Parasitol*. 2002;120(1):33–40.
151. Späth GF, Lye LF, Segawa H, Sacks DL, Turco SJ, Beverley SM. Persistence without pathology in phosphoglycan-deficient *Leishmania major*. *Science* (80-). 2003;301(5637):1241–3.
152. Yao C, Dixit UG, Barker JH, Teesch LM, Love-Homan L, Donelson JE, et al. Attenuation of *Leishmania infantum* chagasi metacyclic promastigotes by sterol depletion. *Infect Immun*. 2013;81(7):2507–17.
153. Anversa L s., Tiburcio MGS, Richini-Pereira V nia B, Ramirez LE. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. Vol. 64, *Revista da Associacao Medica Brasileira*. *Associacao Medica Brasileira*; 2018. p. 281–9.
154. Lima MHF, Sacramento LA, Quirino GFS, Ferreira MD, Benevides L, Santana AKM, et al. *Leishmania infantum* Parasites Subvert the Host Inflammatory Response through the Adenosine A2A Receptor to Promote the Establishment of Infection. *Front Immunol* [Internet]. 2017 Jul 20 [cited 2018 Mar 30];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5517451/>
155. Franco LH, Beverley SM, Zamboni DS. Innate immune activation and subversion of

- mammalian functions by *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Parasitol Res.* 2012;2012.
156. Rossi CN, Tomokane TY, Batista LFDS, Marcondes M, Larsson CE, Laurenti MD. In situ cutaneous cellular immune response in dogs naturally affected by visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2016 Jul 11;58.
 157. Rossi M, Fasel N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! *Int Immunol* [Internet]. 2018 Mar 10 [cited 2019 Feb 24];30(3):103–11. Available from: <https://academic.oup.com/intimm/article/30/3/103/4774287>
 158. Morgado FN, Nascimento MTC, Saraiva EM, De Oliveira-Ribeiro C, De Fátima Madeira M, Da Costa-Santos M, et al. Are neutrophil extracellular traps playing a role in the parasite control in active American tegumentary leishmaniasis lesions? *PLoS One.* 2015;10(7):1–15.
 159. Melo FA, Moura EP, Ribeiro RR, Alves CF, Caliari MV, Tafuri WL, et al. Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Int J Exp Pathol.* 2009;90(5):538–48.
 160. Schifferli JA, Ng YC, Peters DK. The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *N Engl J Med* [Internet]. 1986;315(8):488–95. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198608213150805>
 161. Esmann L, Idel C, Sarkar A, Hellberg L, Behnen M, Möller S, et al. Phagocytosis of apoptotic cells by neutrophil granulocytes: diminished proinflammatory neutrophil functions in the presence of apoptotic cells. *J Immunol* [Internet]. 2010;184(1):391–400. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19949068>
 162. Stenger S, Donhauser N, Thiiring H, 1161 linghamoff M, Bogdan C. Reactivation of Latent Leishmaniasis by Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase.
 163. Nahrevanian H. Involvement of nitric oxide and its up/down stream molecules in the immunity against parasitic infections. *Braz J Infect Dis* [Internet]. 2009;13(6):440–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20464336>
 164. Cassetta L, Cassol E, Poli G. Macrophage polarization in health and disease. *ScientificWorldJournal.* 2011;11:2391–402.
 165. Mukhopadhyay D, Mukherjee S, Roy S, Dalton JE, Kundu S, Sarkar A, et al. M2 Polarization of Monocytes-Macrophages Is a Hallmark of Indian Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(10):1–19.
 166. Tomiotto-Pellissier F, Bortoleti BT da S, Assolini JP, Gonçalves MD, Carloto ACM, Miranda-Sapla MM, et al. Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening

- Horizons. *Front Immunol.* 2018;9(October):2529.
167. Bajénoff M, Egen JG, Koo LY, Laugier JP, Brau F, Glaichenhaus N, et al. Stromal Cell Networks Regulate Lymphocyte Entry, Migration, and Territoriality in Lymph Nodes. *Immunity.* 2006;
 168. Von Stebut E, Belkaid Y, Jakob T, Sacks DL, Udey MC. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: Implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *J Exp Med.* 1998;188(8):1547–52.
 169. Moll H, Scharner A, Kämpgen E. Increased interleukin 4 (IL-4) receptor expression and IL-4-induced decrease in IL-12 production by langerhans cells infected with *Leishmania major*. *Infect Immun.* 2002;70(3):1627–30.
 170. Baldwin T, Henri S, Curtis J, Vremec D, Shortman K, Handman E. Dendritic Cell Populations in. *Society.* 2004;72(4):1991–2001.
 171. Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Silva JS, Dardenne M, Cotta-de-Almeida V. Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? *Trends Immunol* [Internet]. 2002 Jun;23(6):305–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147149060202224X>
 172. Alexander J, Brombacher F. T helper1/T helper2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: Is this paradigm still relevant? *Front Immunol.* 2012;3(APR):1–13.
 173. Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Silvestre R, Estaquier J. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. *Parasit Vectors* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2018 May 22];9(1):118. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4774109/>
 174. Morrot A, Villar SR, González FB, Pérez AR. Evasion and Immuno-Endocrine Regulation in Parasite Infection: Two Sides of the Same Coin in Chagas Disease? *Front Microbiol* [Internet]. 2016 May 23;7:704. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00704/abstract>
 175. Tomei AA, Siegert S, Britschgi MR, Luther SA, Swartz MA. Fluid Flow Regulates Stromal Cell Organization and CCL21 Expression in a Tissue-Engineered Lymph Node Microenvironment. *J Immunol.* 2009 Oct 1;183(7):4273–83.
 176. Roozendaal R, Mempel TR, Pitcher LA, Gonzalez SF, Verschoor A, Mebius RE, et al. Conduits Mediate Transport of Low-Molecular-Weight Antigen to Lymph Node Follicles. *Immunity.* 2009 Feb 20;30(2):264–76.

177. Stranford S, Ruddle NH. Follicular dendritic cells, conduits, lymphatic vessels, and high endothelial venules in tertiary lymphoid organs: Parallels with lymph node stroma. *Front Immunol.* 2012;3(NOV):1–6.
178. Hunter MC, Teijeira A, Halin C. T cell trafficking through lymphatic vessels. *Front Immunol.* 2016;7(DEC).
179. Costa MMS, Lima WG, Figueiredo MM, Michalick MSM, Tafuri WL, Tafuri WL. Cervical, mandibular, and parotid lymph nodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: A histopathologic and immunohistochemistry study and its correlation with facial skin lesions. *Vet Pathol.* 2008 Sep;45(5):613–6.
180. Egawa G, Kabashima K. Skin as a peripheral lymphoid organ: Revisiting the concept of skin-associated lymphoid tissues. *J Invest Dermatol [Internet].* 2011;131(11):2178–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2011.198>
181. den Haan JM, Mebius RE, Kraal G. Stromal cells of the mouse spleen. *Front Immunol.* 2012;3(JUL):1–5.
182. Chen Y, Pikkarainen T, Elomaa O, Soininen R, Kodama T, Kraal G, et al. Defective microarchitecture of the spleen marginal zone and impaired response to a thymus-independent type 2 antigen in mice lacking scavenger receptors MARCO and SR-A. *J Immunol.* 2005;175:8173–80.
183. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. Vol. 5, *Nature Reviews Immunology.* 2005. p. 606–16.
184. Haley PJ. The lymphoid system: A review of species differences. *J Toxicol Pathol.* 2017;30(2):111–23.
185. Bromley SK, Mempel TR, Luster AD. Orchestrating the orchestrators: Chemokines in control of T cell traffic. Vol. 9, *Nature Immunology.* 2008. p. 970–80.
186. Morgado FN, da Silva AVA, Porrozzi R. Infectious Diseases and the Lymphoid Extracellular Matrix Remodeling: A Focus on Conduit System. *Cells.* 2020 Mar 16;9(3):725.
187. Sixt M, Kanazawa N, Selg M, Samson T, Roos G, Reinhardt DP, et al. The Conduit System Transports Soluble Antigens from the Afferent Lymph to Resident Dendritic Cells in the T Cell Area of the Lymph Node. *Immunity [Internet].* 2005 Jan [cited 2019 Feb 24];22(1):19–29. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761304003759>
188. Song J, Lokmic Z, Lämmermann T, Rolf J, Wu C, Zhang X, et al. Extracellular matrix of

- secondary lymphoid organs impacts on B-cell fate and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013;110(31):E2915-24. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3732919&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
189. Lokmic Z, Lämmermann T, Sixt M, Cardell S, Hallmann R, Sorokin L. The extracellular matrix of the spleen as a potential organizer of immune cell compartments. *Vol. 20, Seminars in Immunology*. 2008. p. 4–13.
 190. Kumar B V., Connors TJ, Farber DL. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity* [Internet]. 2018;48(2):202–13. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007>
 191. Savino W, Dardenne M, Marche C, Trophilme D, Dupuy JM, Pekovic D, et al. Thymic epithelium in AIDS. An immunohistologic study. *Am J Pathol*. 1986;122(2):302–7.
 192. Cardillo F, Nomizo A, Mengel J. The role of the thymus in modulating $\gamma\delta$ T cell suppressor activity during experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Int Immunol*. 1998;10(2):107–16.
 193. Farias-de-Oliveira DA, Cotta-de-Almeida V, Villa-Verde DMS, Riederer I, de Meis J, Savino W. Fibronectin modulates thymocyte-thymic epithelial cell interactions following *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108(7):825–31.
 194. Blackburn CC, Manley NR. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(4):278–89.
 195. Savino W, Dardenne M. Neuroendocrine Control of Thymus Physiology*. *Endocr Rev* [Internet]. 2000 Aug 1;21(4):412–43. Available from: <https://academic.oup.com/edrv/article/21/4/412/2423959>
 196. Suniara RK, Jenkinson EJ, Owen JJT. An essential role for thymic mesenchyme in early T cell development. *J Exp Med*. 2000;191(6):1051–6.
 197. Ocampo JSP, Brito JM de, Corr??a-de-Santana E, Borojevic R, Villa-Verde DMS, Savino W. Laminin-211 controls thymocyte-thymic epithelial cell interactions. *Cell Immunol* [Internet]. 2008;254(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2008.06.005>
 198. Boer OJ de, Loos CM van der, Teeling P, Wal AC van der, Teunissen MBM. Immunohistochemical Analysis of Regulatory T Cell Markers FOXP3 and GITR on CD4 + CD25 + T Cells in Normal Skin and Inflammatory Dermatoses. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 2007 Sep 3 [cited 2018 May 22];55(9):891–8. Available from:

- <http://journals.sagepub.com/doi/10.1369/jhc.6A7119.2007>
199. Drumea-Mirancea M. Characterization of a conduit system containing laminin-5 in the human thymus: a potential transport system for small molecules. *J Cell Sci* [Internet]. 2006 Apr 1;119(7):1396–405. Available from: <http://jcs.biologists.org/content/119/7/1396.abstract>
 200. Savino W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. *PLoS Pathog.* 2006;2(6):0472–83.
 201. Villa-Verde DMS, Silva-Monteiro E, Jasiulionis MG, Farias-De-Oliveira DA, Brentani RR, Savino W, et al. Galectin-3 modulates carbohydrate-dependent thymocyte interactions with the thymic microenvironment. *Eur J Immunol.* 2002;32(5):1434–44.
 202. Savino W, Ayres Martins S, Neves-dos-Santos S, Smaniotto S, Ocampo JSP, Mendes-da-Cruz DA, et al. Thymocyte migration: an affair of multiple cellular interactions? *Brazilian J Med Biol Res* [Internet]. 2003 Aug;36(8):1015–25. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2003000800007&lng=en&tlng=en
 203. Lynch HE, Goldberg GL, Chidgey A, Van den Brink MRM, Boyd R, Sempowski GD. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol* [Internet]. 2009 Jul [cited 2018 Apr 1];30(7):366–73. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2750859/>
 204. da Silva AVA, de Souza TL, Figueiredo FB, Mendes AAV, Ferreira LC, Filgueira CPB, et al. Detection of amastigotes and histopathological alterations in the thymus of *Leishmania infantum*-infected dogs. *Immunity, Inflamm Dis.* 2020;8(2):127–39.
 205. Marino APMP, Silva AA, Pinho RT, Lannes-Vieira J. Trypanosoma cruzi infection: A continuous invader-host cell cross talk with participation of extracellular matrix and adhesion and chemoattractant molecules. *Brazilian J Med Biol Res.* 2003;36(8):1121–33.
 206. Wellhausen SR, Boros DL. Atrophy of the thymic cortex in mice with granulomatous *Schistosomiasis mansoni*. *Infect Immun.* 1982;35(3):1063–9.
 207. Tanner CE, Lim HC, Faubert G. *Trichinella spiralis*: Changes caused in the mouse's thymic, splenic, and lymph node cell populations. *Exp Parasitol.* 1978;45(1):116–27.
 208. Bourke CD, Berkley JA, Prendergast AJ. Immune Dysfunction as a Cause and Consequence of Malnutrition. *Trends Immunol* [Internet]. 2016;37(6):386–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2016.04.003>
 209. Kurd N, Robey EA. T-cell selection in the thymus: a spatial and temporal perspective.

- Immunol Rev [Internet]. 2016 May [cited 2019 Nov 26];271(1):114–26. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/imr.12398>
210. Savino W, Vieira JL. Is there a role for extracellular matrix in thymus physiology and pathology? *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 1991;86(suppl 3):91–7. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761991000700013&lng=en&tlng=en
 211. Petrie HT, Zúñiga-Pflücker JC. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. Vol. 25, *Annual Review of Immunology*. 2007. p. 649–79.
 212. Foussat A, Rietze R, Pottier E, Schryver B, Thompson ML, Ehrhardt RO. Effective Cryopreservation and Recovery of Human Regulatory T Cells. Kassiotis G, Liston A, editors. *Bioprocess Int* [Internet]. 2014;707(2):1–4. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-61737-979-6>
 213. Silva DT da, Alves ML, Spada JCP, Silva AC da, Silveira R de CV da, Oliveira TMF de S, et al. T lymphocytes and macrophages in the intestinal tissues of dogs infected with *Leishmania infantum*. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2017;26(2):159–70.
 214. Medina-Colorado AA, Osorio EY, Saldarriaga OA, Travi BL, Kong F, Spratt H, 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*. 2017;12(1):1–19.
 215. Tomura M, Itoh K, Kanagawa O. Naive CD4 + T Lymphocytes Circulate through Lymphoid Organs To Interact with Endogenous Antigens and Upregulate Their Function . *J Immunol*. 2010;184(9):4646–53.
 216. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):601–10.
 217. Golubovskaya V, Wu L. Different subsets of T cells, memory, effector functions, and CAR-T immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2016;8(3).
 218. Gautam S, Kumar R, Singh N, Singh AK, Rai M, Sacks D, et al. CD8 T Cell Exhaustion in Human Visceral Leishmaniasis.
 219. Glatzová D, Cebecauer M. Dual role of CD4 in peripheral T lymphocytes. *Front Immunol*. 2019;10(APR).
 220. Cesta MF. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. *Toxicol Pathol*. 2006;34:455–65.

221. Lewis SM, Williams A, Eisenbarth SC. Structure and function of the immune system in the spleen. *Sci Immunol* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2019 Dec 1];4(33):eaau6085. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6495537/>
222. Borges Da Silva H, Fonseca R, Pereira RM, Cassado AA, Álvarez JM, D'Império Lima MR. Splenic macrophage subsets and their function during blood-borne infections. Vol. 6, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2015.
223. Sanchez MA, Diaz NL, Zerpa O, Negron E, Convit J, Tapia FJ. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: Analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;70(6):618–24.
224. Sorokin L. The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2010 Oct 24;10(10):712–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2852>
225. Mak KM, Mei R. Basement Membrane Type IV Collagen and Laminin: An Overview of Their Biology and Value as Fibrosis Biomarkers of Liver Disease. *Anat Rec* [Internet]. 2017 Aug [cited 2019 Nov 10];300(8):1371–90. Available from: <https://anatomypubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ar.23567>
226. Nyström A, Bornert O, Köhl T, Gretzmeier C, Thriene K, Dengjel J, et al. Impaired lymphoid extracellular matrix impedes antibacterial immunity in epidermolysis bullosa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(4):E705–14.
227. Feitosa NM, Richardson R, Bloch W, Hammerschmidt M. Basement Membrane Diseases in Zebrafish. Vol. 105, *Methods in Cell Biology*. 2011. 191–222 p.
228. Nawaz M, Shah N, Zanetti B, Maugeri M, Silvestre R, Fatima F, et al. Extracellular Vesicles and Matrix Remodeling Enzymes: The Emerging Roles in Extracellular Matrix Remodeling, Progression of Diseases and Tissue Repair. *Cells*. 2018;7(10):167.
229. Shaabani N, Khairnar V, Duhan V, Zhou F, Tur RF, Häussinger D, et al. Two separate mechanisms of enforced viral replication balance innate and adaptive immune activation. *J Autoimmun*. 2016;67:82–9.
230. Lynch MD, Watt FM, Lynch MD, Watt FM. Fibroblast heterogeneity : implications for human disease Find the latest version : Fibroblast heterogeneity : implications for human disease. *J Clin Invest*. 2018;128(1):26–35.
231. Roozendaal R, Mebius RE, Kraal G. The conduit system of the lymph node. *Int Immunol*. 2008;20(12):1483–7.
232. Nolte M a, Beliën J a M, Schadee-Eestermans I, Jansen W, Unger WWJ, van Rooijen N, et al. A conduit system distributes chemokines and small blood-borne molecules through

- the splenic white pulp. *J Exp Med*. 2003;198(3):505–12.
233. Rantakari P, Auvinen K, Jäppinen N, Kapraali M, Valtonen J, Karikoski M, et al. The endothelial protein PLVAP in lymphatics controls the entry of lymphocytes and antigens into lymph nodes. *Nat Immunol*. 2015 Mar 19;16(4):386–96.
 234. Py BF, Gonzalez SF, Long K, Kim MS, Kim YA, Zhu H, et al. Cochlin Produced by Follicular Dendritic Cells Promotes Antibacterial Innate Immunity. *Immunity*. 2013;38(5):1063–72.
 235. Schonherr E, Hausser HJ. Extracellular matrix and cytokines: A functional unit. *Dev Immunol*. 2000;7(2–4):89–101.
 236. Vaday GG, Lider O. Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: Dynamic effects on immune cell behavior and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2000;67(2):149–59.
 237. Benedict CA, De Trez C, Schneider K, Ha S, Patterson G, Ware CF. Specific remodeling of splenic architecture by cytomegalovirus. *PLoS Pathog*. 2006;
 238. Daley WP, Peters SB, Larsen M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. Vol. 121, *Journal of Cell Science*. 2008. p. 255–64.
 239. Krafts KP. Tissue repair. 2010;(December):225–33.
 240. Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2010.
 241. Ansari NA, Katara GK, Ramesh V, Salotra P. Evidence for involvement of TNFR1 and TIMPs in pathogenesis of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*. 2008;
 242. Schuindt SHS, Oliveira BC de L, Pimentel PM de O, Resende TL, Retamal CA, DaMatta RA, et al. Secretion of multi-protein migratory complex induced by *Toxoplasma gondii* infection in macrophages involves the uPA/uPAR activation system. *Vet Parasitol* [Internet]. 2012;186(3–4):207–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.035>
 243. Melo GD, Marangoni NR, Marcondes M, Lima VMF, Machado GF. High levels of serum matrix metalloproteinases in dogs with natural visceral leishmaniasis: A preliminary report. *Vet J* [Internet]. 2011 May;188(2):243–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.03.017>
 244. Lim SC. Interrelation between expression of adam 10 and mmp 9 and synthesis of peroxynitrite in doxorubicin induced cardiomyopathy. *Biomol Ther*. 2013;21(5):371–80.
 245. Rohani MG, Parks WC. Matrix remodeling by MMPs during wound repair. *Matrix Biol*

- [Internet]. 2015;44–46:113–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2015.03.002>
246. Saarialho-Kere UK, Kovacs SO, Pentland AP, Olerud JE, Welgus HG, Parks WC. Cell-matrix interactions modulate interstitial collagenase expression by human keratinocytes actively involved in wound healing. *J Clin Invest*. 1993;92(6):2858–66.
 247. Van Griensven J, Carrillo E, López-Vélez R, Lynen L, Moreno J. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014.
 248. P.S.T.Veras¹, W.L.C.dos-Santos¹, A, T.F.lmeida¹ and CATR. PRIMARY IMMUNE RESPONSE AND PARASITE DISSEMINATION IN CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS. *Anim Biol J* [Internet]. 2004 Apr;1(4):205–21. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104731>
 249. Kraal G, Rodrigues H, Hoeben K, Van Rooijen N. Lymphocyte migration in the spleen: the effect of macrophage elimination. *Immunology* [Internet]. 1989;68(2):227–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2807380><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1385422>
 250. Hampton HR, Chtanova T. Lymphatic migration of immune cells. *Front Immunol*. 2019;10(MAY):19–23.
 251. Ibrahim MK, Barnes JL, Osorio EY, Anstead GM, Jimenez F, Osterholzer JJ, et al. Deficiency of Lymph Node-Resident Dendritic Cells (DCs) and Dysregulation of DC Chemoattractants in a Malnourished Mouse Model of *Leishmania donovani* Infection. Appleton JA, editor. *Infect Immun* [Internet]. 2014 Aug;82(8):3098–112. Available from: <https://iai.asm.org/content/82/8/3098>
 252. Nombela-arrieta C, Controlan QUE, Tráfico EL. Intracellular signaling pathways mediating lymphocyte trafficking. *Transfusion* [Internet]. 2008;27(4):192–204. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0213-9626\(08\)70067-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0213-9626(08)70067-2)
 253. Roozendaal R, Mempel TR, Pitcher LA, Santiago F, Verschoor A, Mebius RE, et al. NIH Public Access. *Mol Cell*. 2010;30(2):264–76.
 254. de Amorim IFG, Da Silva SM, Figueiredo MM, Moura EP, de Castro RS, de Souza Lima TK, et al. Toll receptors type-2 and CR3 expression of canine monocytes and its correlation with immunohistochemistry and xenodiagnosis in visceral leishmaniasis. *PLoS One*. 2011;6(11).
 255. Giunchetti RC, Martins-Filho OA, Carneiro CM, Mayrink W, Marques MJ, Tafuri WL, et

- al. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008;121(1–2):23–33.
256. Cowan JE, Jenkinson WE, Anderson G. Thymus medulla fosters generation of natural Treg cells, invariant $\gamma\delta$ T cells, and invariant NKT cells: What we learn from intrathymic migration. *Eur J Immunol* [Internet]. 2015 Mar;45(3):652–60. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201445108>
 257. Bihl F, Pecheur J, Bréart B, Poupon G, Cazareth J, Julia V, et al. Primed antigen-specific CD4+ T cells are required for NK cell activation in vivo upon *Leishmania major* infection. *J Immunol* [Internet]. 2010;185(4):2174–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20624944>
 258. Cortese L, Annunziatella M, Palatucci AT, Rubino V, Piantedosi D, Di Loria A, et al. Regulatory T cells, Cytotoxic T lymphocytes and a TH1 cytokine profile in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Res Vet Sci* [Internet]. 2013 Dec;95(3):942–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528813002877>
 259. Favali C, Costa D, Afonso L, Conceição V, Rosato A, Oliveira F, et al. Role of costimulatory molecules in immune response of patients with cutaneous leishmaniasis. *Microbes Infect*. 2005;
 260. Attanavanich K, Kearney JF. Marginal Zone, but Not Follicular B Cells, Are Potent Activators of Naive CD4 T Cells. *J Immunol*. 2004;
 261. Tubo NJ, Jenkins MK. CD4+ T cells: Guardians of the phagosome. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(2):200–13.
 262. Miralles GD, Stoeckle MY, McDermott DF, Finkelman FD, Murray HW. Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral Leishmaniasis. *Infect Immun*. 1994;62(3):1058–63.
 263. Quinnell RJ, Courtenay O, Shaw M-A, Day MJ, Garcez LM, Dye C, et al. Tissue Cytokine Responses in Canine Visceral Leishmaniasis.
 264. Loria-Cervera EN, Andrade-Narvaez FJ. ANIMAL MODELS FOR THE STUDY OF LEISHMANIASIS IMMUNOLOGY. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2014 Jan [cited 2018 Mar 30];56(1):1–11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4085833/>
 265. Mohrs M, Ledermann B, Köhler G, Dorfmueller A, Gessner A, Brombacher F. Differences between IL-4- and IL-4 receptor alpha-deficient mice in chronic leishmaniasis reveal a protective role for IL-13 receptor signaling. *J Immunol* [Internet]. 1999;162(12):7302–8.

Available from: <http://www.jimmunol.org/content/162/12/7302.full>

266. Neto RGT, Giunchetti RC, Carneiro CM, Vitor RW de A, Coura-Vital W, Quaresma PF, et al. Relationship of Leishmania-specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* [Internet]. 2010 May;169(3–4):248–57. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401710000427>
267. de Oliveira FA, Vanessa Oliveira Silva C, Damascena NP, Passos RO, Duthie MS, Guderian JA, et al. High levels of soluble CD40 ligand and matrix metalloproteinase-9 in serum are associated with favorable clinical evolution in human visceral leishmaniasis. *BMC Infect Dis*. 2013;
268. Muraille E, Leo O, Moser M. Th1/Th2 paradigm extended: Macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? *Front Immunol*. 2014;5(NOV):1–12.
269. De Freitas JCC, Pinheiro DCSN. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania* spp Cellular and molecular aspects of immune response to *Leishmania* spp.
270. Iniesta V, Gómez-Nieto LC, Molano I, Mohedano A, Carcelén J, Mirón C, et al. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol*. 2002;24(3):113–8.
271. Vogel IT. CD28/CTLA-4/B7 and CD40/CD40L costimulation and activation of regulatory T cells. *World J Immunol*. 2014;
272. Pereira-Fonseca DCM, Oliveira-Rovai FM, Rodas LAC, Beloti CAC, Torrecilha RBP, Ito PKRK, et al. Dog skin parasite load, TLR-2, IL-10 and TNF- α expression and infectiousness. *Parasite Immunol* [Internet]. 2017 Nov;39(11):e12493. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/pim.12493>
273. Howland KC, Ausubel LJ, London CA, Abbas AK. The Roles of CD28 and CD40 Ligand in T Cell Activation and Tolerance. *J Immunol*. 2000;164(9):4465–70.
274. Esch KJ, Juelsgaard R, Martinez PA, Jones DE, Petersen CA. Programmed Death 1-Mediated T Cell Exhaustion during Visceral Leishmaniasis Impairs Phagocyte Function. *J Immunol*. 2013;
275. Pinelli E, Rutten VPMG, Bruysters M, Moore PF, Ruitenber EJ. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. *Infect Immun*. 1999;67(1):237–43.

276. Chiku VM, Silva KLO, de Almeida BFM, Venturin GL, Leal AAC, de Martini CC, et al. PD-1 function in apoptosis of T lymphocytes in canine visceral leishmaniasis. *Immunobiology*. 2016 Aug 1;221(8):879–88.
277. Murray HW, Lu CM, Brooks EB, Fichtl RE, DeVecchio JL, Heinzl FP. Modulation of T-Cell Costimulation as Immunotherapy or Immunochemotherapy in Experimental Visceral Leishmaniasis. *Infect Immun* [Internet]. 2003 Nov;71(11):6453–62. Available from: <https://iai.asm.org/content/71/11/6453>
278. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. THE B7 FAMILY REVISITED. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2005 Apr;23(1):515–48. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115611>
279. Lima VMF de, Fattori KR, de Souza F, Eugênio FR, Santos PSP dos, Rozza DB, et al. Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral blood of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. *Vet Parasitol*. 2012;184(2–4):147–53.
280. Rodríguez-Cortés A, Carrillo E, Martorell S, Todolí F, Ojeda A, Martínez-Flórez A, et al. Compartmentalized immune response in leishmaniasis: Changing patterns throughout the disease. *PLoS One*. 2016;11(5).
281. MARANGONI NR, MELO GD, MORAES OC, SOUZA MS, PERRI SH V., MACHADO GF. Levels of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol* [Internet]. 2011 Jun;33(6):330–4. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3024.2011.01285.x>
282. Hermida M d. ER, de Melo CVB, Lima IDS, Oliveira GG de S, Dos-Santos WLC. Histological Disorganization of Spleen Compartments and Severe Visceral Leishmaniasis. Vol. 8, *Frontiers in cellular and infection microbiology*. NLM (Medline); 2018. p. 394.
283. da Silva Santos C, Brodskyn CI. The Role of CD4 and CD8 T Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis. *Front public Heal* [Internet]. 2014;2(September):165. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4178373&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
284. Silva-O'Hare J, De Oliveira IS, Klevorn T, Almeida VA, Oliveira GGS, Atta AM, et al. Disruption of splenic lymphoid tissue and plasmacytosis in canine visceral leishmaniasis: Changes in homing and survival of plasma cells. *PLoS One*. 2016;11(5):1–17.
285. Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez LM, Kaye PM, Shaw MA, Dye C, et al. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol*

- Immunopathol [Internet]. 2003 Feb;91(3–4):161–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165242702003112>
286. Prina E, Roux E, Mattei D, Milon G. Leishmania DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes Infect.* 2007;9(11):1307–15.
 287. Morgado FN, Schubach A, Rosalino CMV, Quintella LP, Santos G, Salgueiro M, et al. Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? *Br J Dermatol* [Internet]. 2007 Oct 18 [cited 2020 May 30];0(0):071018080405005-??? Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2133.2007.08255.x>
 288. Cuervo-Escobar S, Losada-Barragán M, Umaña-Pérez A, Porrozzi R, Saboia-Vahia L, Miranda LHM, et al. T-Cell populations and cytokine expression are impaired in thymus and spleen of protein malnourished balb/c mice infected with leishmania infantum. *PLoS One.* 2014;9(12).
 289. De Meis J, Aurélio Farias-De-Oliveira D, Nunes Panzenhagen PH, Maran N, Villa-Verde DMS, Morrot A, et al. Thymus atrophy and double-positive escape are common features in infectious diseases. *J Parasitol Res.* 2012;2012.
 290. Leite-de-Moraes MC, Hontebeyrie-Joskowicz M, Dardenne M, Savino W. Modulation of thymocyte subsets during acute and chronic phases of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology* [Internet]. 1992;77(1):95–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1398769> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1421586>
 291. Seixas E, Ostler D. *Plasmodium chabaudi chabaudi* (AS): Differential cellular responses to infection in resistant and susceptible mice. *Exp Parasitol.* 2005;110(4):394–405.
 292. Ordeix L, Dalmau A, Osso M, Llull J, Montserrat-Sangrà S, Solano-Gallego L. Histological and parasitological distinctive findings in clinically-lesioned and normal-looking skin of dogs with different clinical stages of leishmaniosis. *Parasites and Vectors.* 2017;10(1):1–8.
 293. Tiwananthagorn S, Iwabuchi K, Ato M, Sakurai T, Kato H, Katakura K. Involvement of CD4⁺ Foxp3⁺ Regulatory T Cells in Persistence of *Leishmania donovani* in the Liver of Alymphoplastic aly/aly Mice. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(8).
 294. Bagues NCT, Pinheiro CGM de, Bastos LA, Fraga DBM, Veras PST, Pontes-de-Carvalho LC, et al. Parasitic load and histological aspects in different regions of the spleen of dogs

- with visceral leishmaniasis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2018;56(November 2017):14–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.11.003>
295. Bogdan C, Donhauser N, Döring R, Röllinghoff M, Diefenbach A, Rittig MG. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. *J Exp Med*. 2000;191(12):2121–30.
296. Nolte MA, Beliën JAM, Schadee-Eestermans I, Jansen W, Unger WWJ, van Rooijen N, et al. A Conduit System Distributes Chemokines and Small Blood-borne Molecules through the Splenic White Pulp. *J Exp Med* [Internet]. 2003 Aug 4 [cited 2019 Feb 24];198(3):505–12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2194088/>
297. Martins N dos S, Coelho GB, dos Santos LS, de Sousa RA, Abreu Silva AL, Melo FA. Alterações da matriz extracelular esplênica em cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi. *Cienc Anim Bras*. 2015;16(1):103–15.
298. Wege AK, Florian C, Ernst W, Zimara N, Schleicher U, Hanses F, et al. *Leishmania major* infection in humanized mice induces systemic infection and provokes a nonprotective human immune response. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012 Jul;6(7).
299. Nicolato R de C, Abreu RT de, Roatt BM, Aguiar-Soares RD de O, Reis LES, Carvalho M das G, et al. Clinical Forms of Canine Visceral Leishmaniasis in Naturally *Leishmania infantum*-Infected Dogs and Related Myelogram and Hemogram Changes. Arez AP, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Dec 23 [cited 2020 May 28];8(12):e82947. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002329>
300. Samal J, Kelly S, Na-Shatal A, Elhakiem A, Das A, Ding M, et al. Human immunodeficiency virus infection induces lymphoid fibrosis in the BM-liver-thymus-spleen humanized mouse model. *JCI insight*. 2018 Sep 20;3(18).
301. Borges AS, Machado AA, Ferreira MS, de Castro Figueiredo JF, Silva GF, Cimerman S, et al. [Concurrent leishmaniasis and human immunodeficiency virus (HIV) infection: a study of four cases]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999;32(6):713–9.
302. Craft N, Ezra N, Ochoa M. Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. *J Glob Infect Dis*. 2010;
303. Morgado FN, Cavalcanti S, Miranda LH De, Dwyer LHO, Regina M, Menezes RC, et al. in Dogs Diagnosed With Visceral Leishmaniasis. 2016;2961:450–8.
304. Cardinot CB, Silva JES, Yamatogi RS, Nunes CM, Biondo AW, Vieira RFC, et al. Detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli*, and *Toxoplasma gondii* DNA in the Brain

- of Dogs Naturally Infected with *Leishmania infantum*. *J Parasitol* [Internet]. 2016 Apr;102(2):275–9. Available from: <http://www.journalofparasitology.org/doi/10.1645/15-821>
305. Milon G. Perpetuation of leishmania: Some novel insight into elegant developmental programs. *Vet Res*. 2009;40(2).
306. Araújo VEM de, Pinheiro LC, Almeida MC de M, Menezes FC de, Morais MHF, Reis IA, et al. Relative Risk of Visceral Leishmaniasis in Brazil: A Spatial Analysis in Urban Area. Kamhawi S, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2013 Nov 7 [cited 2018 May 22];7(11):e2540. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002540>
307. Strauss-Ayali D, Baneth G, Jaffe CL. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. *Vet Res*. 2007;38(4):547–64.
308. Goto H, Prianti M das G. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2009 Oct [cited 2018 May 4];51(5):241–6. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652009000500002&lng=en&tlng=en
309. Gershkovich P, Wasan EK, Sivak O, Li R, Zhu X, Werbovetz KA, et al. Visceral leishmaniasis affects liver and spleen concentrations of amphotericin B following administration to mice. *J Antimicrob Chemother*. 2009;65(3):535–7.

Anexo 2- pro-cellular exhaustion Markers are Associated with Splenic Microarchitecture Disorganization and parasite Load in Dogs with Visceral Leishmaniasis

Este artigo foi inserido na presente tese como artigo complementar à atuação da aluna durante seu período de doutorado.

Na Leishmaniose visceral canina (CVL), a desorganização da polpa branca esplênica (SWP) foi associada à progressão da doença, redução da expressão de citocinas e quimiocinas e falha no controle da carga parasitária. Esse perfil é compatível com o esgotamento celular anteriormente demonstrado na Leishmaniose visceral humana. O presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão *in situ* de marcadores de exaustão celular e sua relação com sinais clínicos, desorganização SWP e carga parasitária. Quarenta cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* foram agrupados de acordo com os níveis de organização SWP e carga parasitária. A desorganização do SWP foi associada a reduções na bainha linfática periarteriolar e folículos linfoides/mm² e piora da doença. Células apoptóticas que expressam CTLA-4⁺ aumentaram em cães com SWP desorganizado e uma alta carga parasitária. No mesmo grupo, expressão dos genes PD-L1 e LAG-3 foram reduzidos. Um número maior de células B CD21⁺ TIM-3⁺ foi detectado em baços desorganizados do que em baços organizados. A apoptose está envolvida na redução da bainha linfática periarteriolar e na atrofia do folículo linfoide e está associada à redução das células CTLA-4⁺ no tecido esplênico de cães com Leishmaniose visceral (LV). Foi observada falha no controle da carga parasitária, sugerindo que a exaustão celular seguida de apoptose de células T e B desempenha um papel na imunossupressão observada em CVL.

open pro-cellular exhaustion Markers are Associated with Splenic Microarchitecture Disorganization and parasite Load in Dogs with Visceral Leishmaniasis

Received: 8 January 2019
 Accepted: 23 August 2019
 Published online: 10 September 2019

tainã Luís de Souza¹, Aurea Virginia Andrade da Silva¹, Luiza de oliveira Ramos pereira¹, fabiano Borges figueiredo², Artur Augusto Velho Mendes Junior³, Rodrigo caldas Menezes^{1,3}, Daniella Areas Mendes-da-cruz⁴, Mariana côrtes Boité^{1,3}, elisa cupolillo¹, Renato porrozz¹ & fernanda nazaré Morgado¹

in canine visceral leishmaniasis (cVL), splenic white pulp (SWp) disorganization has been associated with disease progression, reduced cytokine and chemokine expression and failure to control the parasite load. This profile is compatible with the cellular exhaustion previously shown in human visceral leishmaniasis. the present study aimed to evaluate the *in situ* expression of cellular exhaustion markers and their relation to clinical signs, SWp disorganization and parasite load. forty dogs naturally infected by *Leishmania infantum* were grouped according to levels of SWp organization and parasite load. SWp disorganization was associated with reductions in the periarteriolar lymphatic sheath and lymphoid follicles/mm² and worsening of the disease. Apoptotic cells expressing CTLA-4⁺ increased in dogs with disorganized SWP and a high parasite load. In the same group, PD-L1 and LAG-3 gene expression were reduced. A higher number of CD21⁺TIM-3⁺ B cells was detected in disorganized spleens than in organized spleens. Apoptosis is involved in periarteriolar lymphatic sheath reduction and lymphoid follicle atrophy and is associated with CTLA-4⁺ cell reductions in the splenic tissue of dogs with visceral leishmaniasis (VL). failure to control the parasite load was observed, suggesting that cell exhaustion followed by t and B cell apoptosis plays a role in the immunosuppression observed in cVL.

Zoonotic visceral leishmaniasis (ZVL) is a tropical and subtropical disease caused by *Leishmania infantum*, an intracellular protozoan that is transmitted to its vertebrate hosts by the blood feeding of female sand flies of the genera *Phlebotomus* and *Lutzomyia*. Dogs have been implicated as the main urban reservoir of *L. infantum* and source of infection for the vector *Lutzomyia longipalpis*, the known vector in South America. Infected dogs present high parasite loads in the skin and blood¹ and are major targets for control measures. Furthermore, dogs are considered good models for understanding the immunopathogenesis of ZVL².

L. infantum infection affects several organs in dogs, and the spleen is an important target. Notably, disorganization of the splenic white pulp (SWP) has been reported in naturally infected dogs³⁻⁷. However, little is known about the mechanisms triggering splenic disorganization or the influence of parasites or the immune response on this process. The maintenance of the splenic microarchitecture and areas of segregation in the spleen is important for the activation of effector lymphocytes and for the development of specific immune responses^{8,9}. It has been generally demonstrated that the progression of an *L. infantum* infection to active disease is characterized by a

¹Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

²Laboratório de Biologia Celular, Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Paraná, Brazil. ³Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. ⁴Laboratório de Pesquisas Sobre o Timo, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. Renato Porrozz¹ and Fernanda Nazaré Morgado contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.N.M. (email: morgado@ioc.fiocruz.br)

marked humoral response, depression of the cellular response against the parasite, and the emergence of clinical signs². Recent studies have correlated the progression of disease with the disorganization of the splenic microarchitecture^{3,10}, leading to increased parasite load and reduced expression of cytokines, chemokines and chemokine receptors¹¹, which is compatible with the cellular exhaustion profile. T cell exhaustion is defined by decreased effector function, sustained expression of inhibitory receptors and a transcriptional state distinct from that of functional effector or memory T cells¹². Cellular exhaustion characterized by programmed death 1 (PD-1) expression was first described in viral infection¹³. PD-1 expression is induced by repeated antigenic stimulation in T and B lymphocytes, and this non-responsive state is termed exhaustion¹⁴. The ligand of PD-1, PD-L1, is constitutively expressed by B lymphocytes, T lymphocytes, macrophages and dendritic cells in the spleen¹⁴. Activation of PD-1 induces apoptosis and inhibits cell proliferation as well as cytokine production¹⁵. It was further demonstrated that exhaustion could be reversed *in vivo* and *in vitro* by the administration of antibodies specific to the ligand (PD-L1), leading to recovery of the proliferative capacity of CD8⁺ cells, secretion of cytokines, elimination of infected cells and reduction in the viral load¹³. The expression of PD-1 and cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) by peripheral and splenic CD8⁺ cells has been demonstrated in human visceral leishmaniasis (VL)¹⁶ and in mice experimentally infected with *Leishmania donovani*, another *Leishmania* species that causes VL¹⁵⁻¹⁷. Administration of anti-CTLA-4 blocking antibodies *in vivo* led to increased frequencies of IFN- γ - and IL-4-producing cells in the liver and spleen of the experimentally infected mice and accelerated the development of the hepatic granulomatous response associated with a reduction in the parasite load¹⁷. The emergence of exhausted CD8⁺ cells was accompanied by a reduction in inflammatory cytokine levels¹⁵. It has also been shown that receptor blockade does not influence IFN- γ production; however, in a murine experimental model, PD-L1 (B7-H1) blockade led to control of the parasite load even with unchanged induction of cytokine production¹⁵. In an evaluation of splenic cells from patients with VL, blocking the PD-1/PD-L1 or CTLA-4 pathways did not alter IFN- γ production or parasite survival *in vitro*¹⁶. We hypothesized that failures in mounting an effective immune response and in controlling the parasite load are associated with the disorganization of the SWP and cellular exhaustion in dogs presenting with VL. Thus, we evaluated the expression of the exhaustion markers PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3 and LAG-3 in the spleen of dogs naturally infected with *L. infantum* and correlated the results with the clinical signs, organization of the SWP and parasite load observed in the animals.

Results

Associations among clinical score, parasite load and SWP disorganization in dogs naturally infected with *L. infantum*.

In the present study, 40 dogs naturally infected with *L. infantum* were included. The six clinical signs most frequently observed in the dogs with ZVL were evaluated: onychogryphosis, keratoconjunctivitis, dermatitis, body condition score, lymphadenomegaly and alopecia. Considering the intensity of the clinical signs, the animals were grouped into low (n = 13), medium (n = 13) and high clinical score (n = 14) groups. According to the degree of SWP organization and the parasite load, the dogs were grouped as follows: 1- organized SWP and low parasite load (OL; n = 10); 2- disorganized SWP and low parasite load (DL; n = 22); and 3- disorganized SWP and high parasite load (DH; n = 8).

The disorganization of the SWP was characterized by a reduction in the number and loss of compartmentalization of the lymphoid follicles, which were atrophied in the dogs with severe ZVL (Supplementary Fig. S1). Moreover, there was a reduction in cell number in the periarteriolar lymphatic sheath, an area composed of T lymphocytes. This histopathological sign was observed in most animals (30/40, 75%). Furthermore, this alteration was associated with disease progression since the dogs with disorganized SWP showed significantly higher clinical scores than those with organized SWP (Mann-Whitney p = 0.0235) (Supplementary Fig. S1E).

Qualitative and quantitative analysis of the CD4⁺, CD8⁺ and CD21⁺ cells in the spleen of dogs naturally infected with *L. infantum*.

CD4⁺, CD8⁺ and CD21⁺ cells were detected in the red and white pulps of the spleen by immunohistochemistry (Fig. 1A,D,G). Cellular quantification was performed in the red pulp, as it is a cell transition area and the site where parasitized macrophages are concentrated. It should be noted that follicle size may vary even in the same analysed field, and several animals did not present follicles in the splenic sections, justifying the use of the red pulp for these analyses.

CD4⁺ and CD8⁺ cells were concentrated in the periarteriolar lymphoid sheath and homogeneously distributed in the red pulp, whereas CD21⁺ cells were more concentrated in the lymphoid follicles. Lower numbers of CD4⁺ cells were observed in the DL animals than in the DH animals. In association with periarteriolar lymphoid sheath atrophy, these data suggested the retention of these cells in the red pulp (Fig. 1B,C). No differences were observed in the numbers of CD8⁺ and CD21⁺ cells among the OL, DL and DH groups (Fig. 1E,F,H,I). In addition, there were no significant differences in the cellular profile when the OL, DL and DH groups were compared according to clinical score (Supplementary Fig. S2).

Qualitative and quantitative analysis of cytokine expression (IFN- γ and IL-10) and cell proliferation (Ki-67) in the spleen of dogs naturally infected with *L. infantum*.

IFN- γ ⁺, IL-10⁺ and Ki-67⁺ cells were detected in the spleen of naturally infected dogs (Fig. 2A,D,G). These cells were homogeneously distributed in the splenic red pulp and were poorly identified in the white pulp. When the groups stratified according to SWP organization and parasite load were compared, no significant differences in the numbers of IFN- γ ⁺, IL-10⁺ and Ki-67⁺ cells were observed (Supplementary Fig. S3).

Further comparison of these three groups revealed no difference in the number of IFN- γ ⁺ cells (Fig. 2B,C) or in the number of Ki-67⁺ cells (Fig. 2H-I). However, fewer IL-10⁺ cells were observed in the animals with the highest clinical score (Fig. 2E,F).

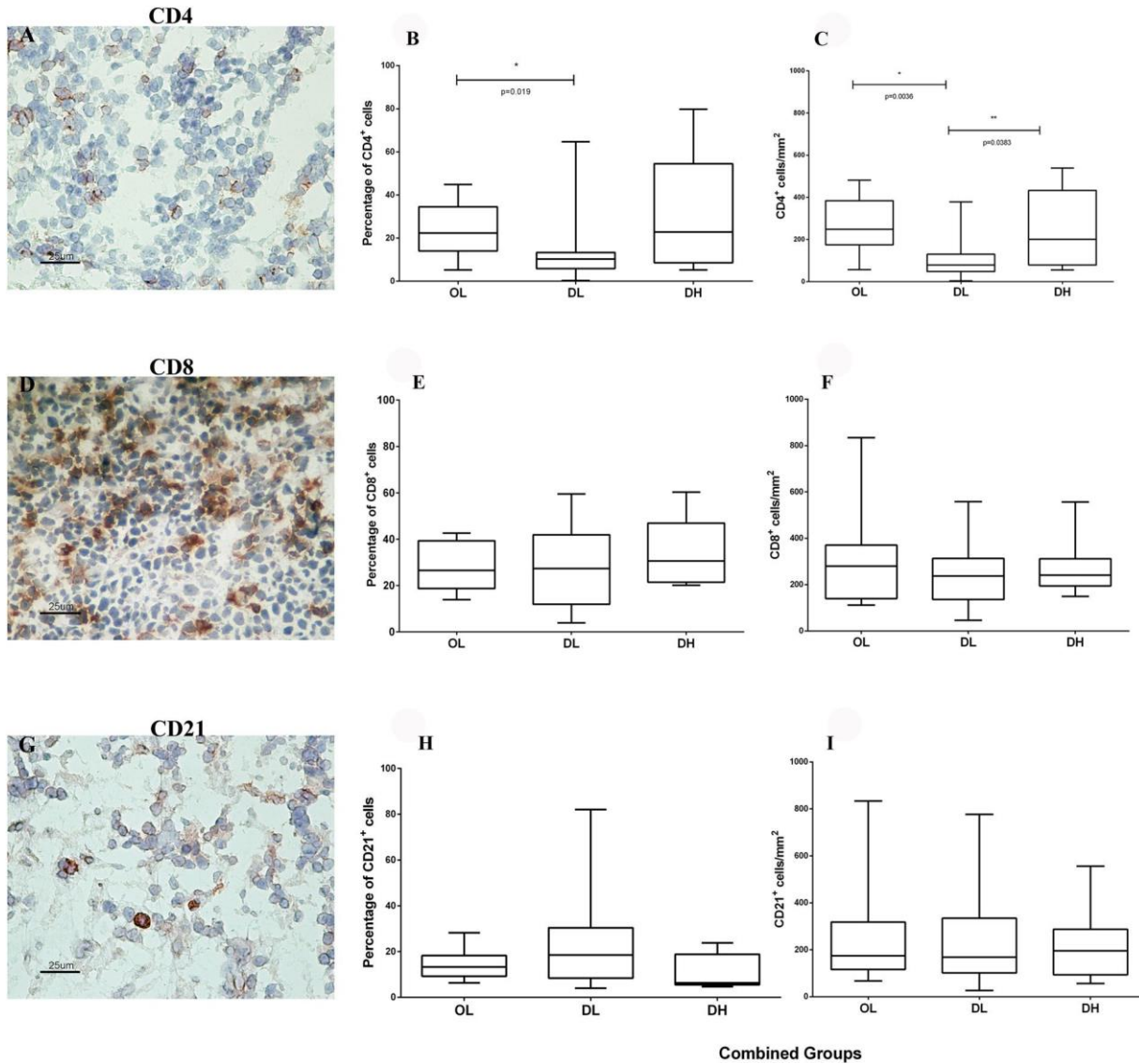


Figure 1. Identification of (A–C) CD4⁺, (D–F) CD8⁺, and (G–I) CD21⁺ cells by immunohistochemistry and quantitative analysis of the spleen of dogs naturally infected with *L. infantum* grouped according to the disorganization of the splenic white pulp and the parasite load: (B) percentage of CD4⁺ cells, (C) CD4⁺ cells/mm², (E) percentage of CD8⁺ cells, (F) CD8⁺ cells/mm², (H) percentage of CD21⁺ cells, and (I) CD21⁺ cells/mm². Mann-Whitney test: (B) *p = 0.019; (C) *p = 0.0036, **p = 0.0383. Kruskal-Wallis test: (B) p = 0.031; (C) p = 0.021.

Qualitative and quantitative analysis of TIM-3, CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, and LAG-3 expression in the spleen of dogs naturally infected with *L. infantum*. TIM-3⁺ and CTLA-4⁺ cells were detected in the spleen of each naturally infected dog (Fig. 3A,D). These cells were more abundant in the splenic red pulp and were homogeneously distributed in this region. Animals in the OL and DL groups showed more CTLA-4⁺ cells than did those in the DH group (Fig. 3). We also observed that TIM-3 expression was high in all groups, and, although not significant, TIM-3⁺ cell numbers were higher in animals with disorganized SWP and those with high parasite loads than in the other animals (Fig. 3B,C). Furthermore, animals with more intense clinical scores presented higher numbers of TIM-3⁺ cells than did those with low clinical scores (Supplementary Fig. S4A,B). There were no differences between the clinical groups when comparing the numbers of CTLA-4⁺ cells (Supplementary Fig. S4C,D). PD-1⁺ and LAG-3⁺ cells could not be identified by immunohistochemistry in this study, perhaps due to the limited ability of this technique to analyse molecules with low expression. Therefore, the gene expression of these exhaustion markers plus PD-L1 and PD-L2 was assayed by qRT-PCR (Fig. 4). The expression of the four markers was reduced in the groups that presented greater disorganization and higher parasite load in the spleen; significant differences were found for PD-L1 and LAG-3. In addition, PD-L1 expression was lower in the groups that presented low clinical scores than in the groups with intermediate or high clinical scores (Fig. 5).

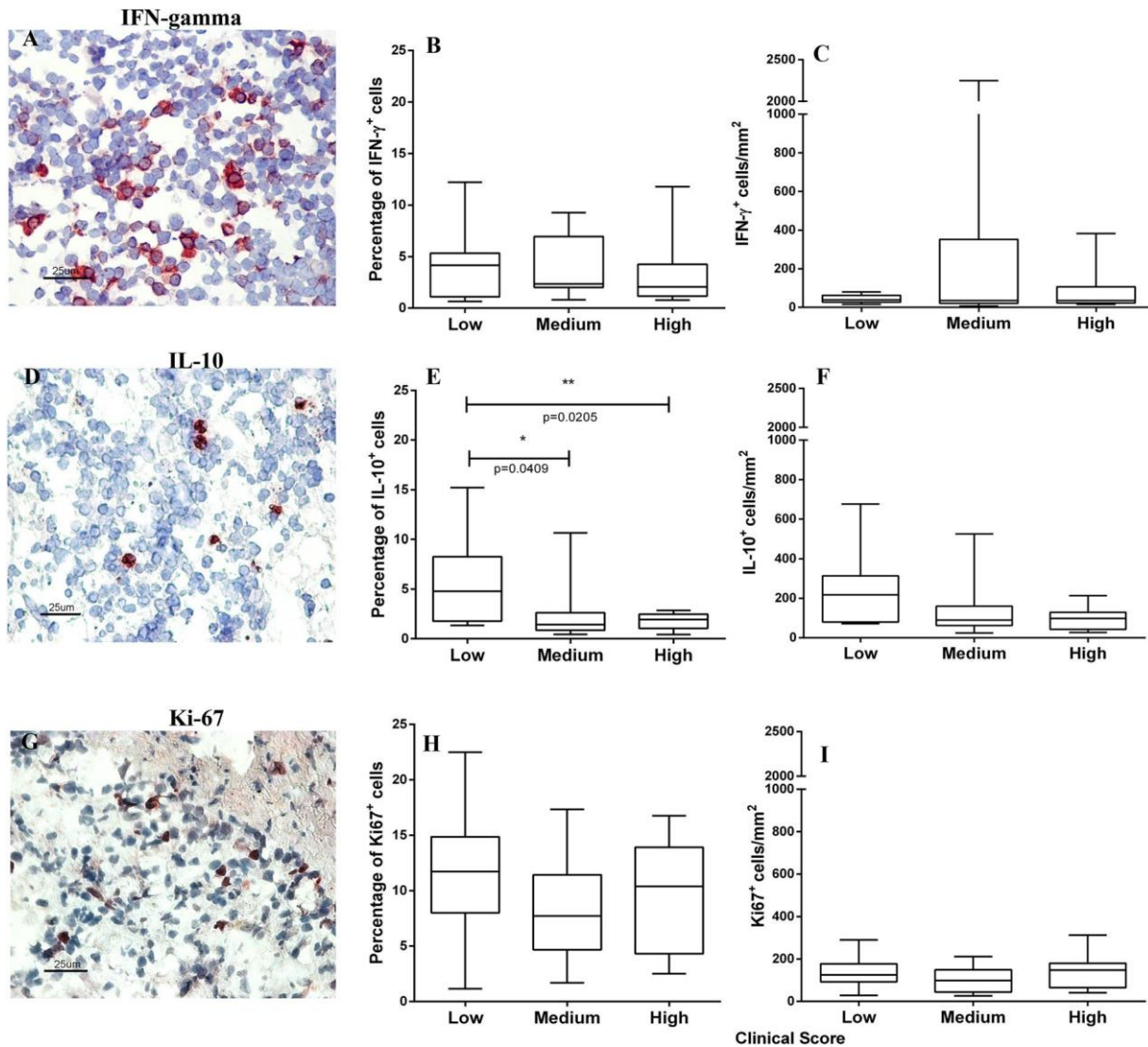


Figure 2. Identification of (A–C) IFN- γ^+ , (D–F) IL-10 $^+$, and (G–I) Ki-67 $^+$ cells by immunohistochemistry and quantitative analysis of the spleen of dogs naturally infected with *L. infantum* grouped according to the clinical score: (B) percentage of IFN- γ^+ cells, (C) IFN- γ cells/mm 2 , (E) percentage of IL-10 $^+$ cells, (F) IL-10 $^+$ cells/mm 2 , (H) percentage of Ki-67 $^+$ cells and (I) Ki-67 $^+$ cells/mm 2 . Mann-Whitney test: (E) *p = 0.0409, **p = 0.0205. Kruskal-Wallis test: (E) p = 0.026.

Quantitative analysis of CD4 $^+$ and CD8 $^+$ subpopulations expressing the exhaustion receptors TIM-3 and CTLA-4. Splenocytes were isolated from animals in the OL (n = 5; Media 8.2×10^6 , min-max 2.8 – 14.0×10^6 cells/ml), DL (n = 5; Media 11.1×10^6 , min-max 2.5 – 21.5×10^6 cells/ml) and DH (n = 5; Media 4.95×10^6 , min-max 3.8 – 6.1×10^6 cells/ml) groups.

We detected CD4 $^+$ and CD8 $^+$ cells expressing both exhaustion receptors (TIM-3 and CTLA-4) (Supplementary Fig. S5). Although we did not observe significant differences among the groups, the DL group presented the highest CD4 $^+$ CTLA-4 $^+$ counts, similar to that observed for CTLA-4 $^+$ cells count in the red pulp by immunohistochemistry.

Qualitative analysis of the B cells expressing the exhaustion marker TIM-3 (CD21 $^+$ TIM-3 $^+$) in the spleen of dogs naturally infected with *L. infantum*. The number of TIM-3 $^+$ cells was similar between the dogs with disorganized SWP and those with organized SWP, despite periarteriolar lymphoid sheath atrophy and a reduction in the number of CD4 $^+$ cells. Histopathological analysis revealed similar distributions of B lymphocytes in the OL, DL and DH groups. We questioned whether B cells could express TIM-3 in these dogs. Thus, double labelling was performed *in situ* using fluorescent antibodies. CD21 $^+$ B lymphocytes expressing the molecule TIM-3 were found (Fig. 6), and these cells were observed more frequently in the spleens with disorganized SWP.

Quantitative and qualitative analysis of apoptotic cells in the spleen of dogs naturally infected with *L. infantum*. We observed fewer CTLA-4 $^+$ cells in the DH group than in the OL and DL groups. Acknowledging that the endpoint of cellular exhaustion is apoptosis, we hypothesized that these cells could be

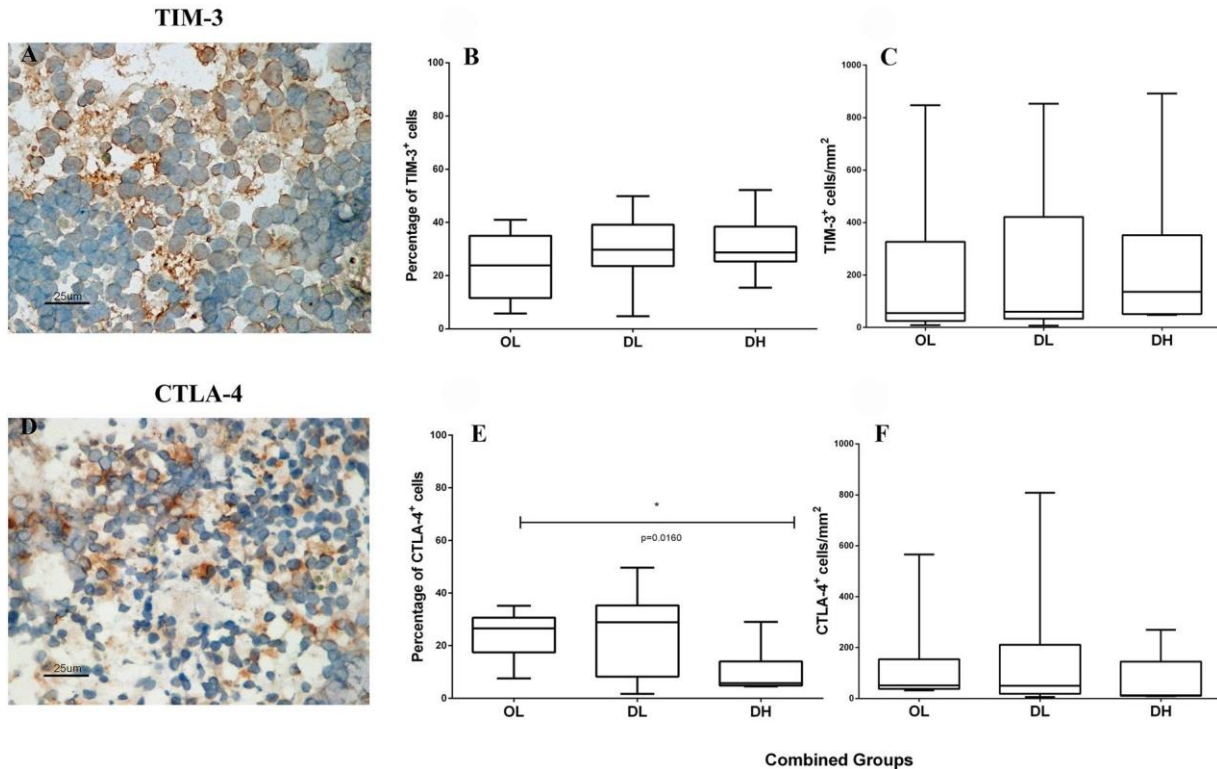


Figure 3. Identification of (A–C) TIM-3⁺ and (D–F) CTLA-4⁺ cells by immunohistochemistry and quantitative analysis of exhausted cells in the spleen of dogs naturally infected with *L. infantum* grouped according to the disorganization of the splenic white pulp and the parasite load: (B) percentage of TIM-3⁺ cells, (C) TIM-3 cells/mm², (E) percentage of CTLA-4⁺ cells, and (F) CTLA-4⁺ cells/mm². Mann-Whitney test: (E) *p = 0.00160. Kruskal-Wallis test: (E) p = 0.021.

dying, leading to atrophy of the periarteriolar lymphatic sheath. Therefore, apoptotic cells in the spleens were analysed (Fig. 7A–D), identified by TUNEL staining, and quantified in both red pulp and white pulp. We found that apoptotic cells were homogeneously distributed throughout the SWP and red pulp.

Although apoptotic cells could be visualized in the OL, DL and DH groups, they were more frequently observed in the animals with a low parasite load (Fig. 7E). We also performed double labelling for CTLA-4 and apoptosis marker expression in dogs in all groups, and the highest number of CTLA-4⁺ cells undergoing apoptosis was detected in the DH group (Fig. 8).

Discussion

In the present study, we evaluated the spleens of 40 dogs naturally infected with *L. infantum*. Markers for the exhaustion phenotype were quantified, and the association of marker expression with clinical evaluation, organization of the SWP and parasite load were tested. The animals were grouped into low, medium and high clinical score groups. When these groups were compared, the number of IL-10⁺ cells was significantly lower in the animals with higher clinical scores (medium and high) than in the animals with low clinical scores. A previous study showed a reduction in the expression of IL-10 in animals with a high parasite load⁶. The reduction in IL-10 expression observed in the present study was associated with cellular exhaustion processes defined by the expression of different markers, such as PD-1, PD-L1, CTLA-4 and TIM-3. Interestingly, IL-10 has been related to VL progression in some studies^{9,18,19}, while conversely, others have found no association^{20,21}. In part, these conflicting results can be due to the model studied as well as the use of naturally infected animals, which prevents the verification of the time and evolution of the infection.

A study based on the PD-1 receptor showed an association among the cellular exhaustion process, a reduction in proliferative capacity and a decline in cytokine levels in the peripheral blood of polysymptomatic animals²². In another study using a mouse model chronically infected with lymphocytic choriomeningitis virus, the immune exhaustion process manifested in the early stages of infection, followed by increased expression of the PD-1 surface molecule induced by the pathogen¹³. It has been demonstrated in mice infected with *Plasmodium chabaudi*, *Plasmodium vinckei* and *Plasmodium berghei* that as soon as 6 days after infection, CD4⁺ T cells start to express PD-1 and LAG-3, suggesting that the inhibition of immune responses via these receptors may occur immediately after the onset of T cell activation²³. Although ZVL was already established in the dogs evaluated in the present study, results similar to those reported in the abovementioned works were observed: the dogs with organized spleens and low parasite loads expressed considerable numbers of PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4 and LAG-3. Activation of PD-1 induces apoptosis and inhibits cell proliferation and cytokine production¹⁵. Nevertheless, in

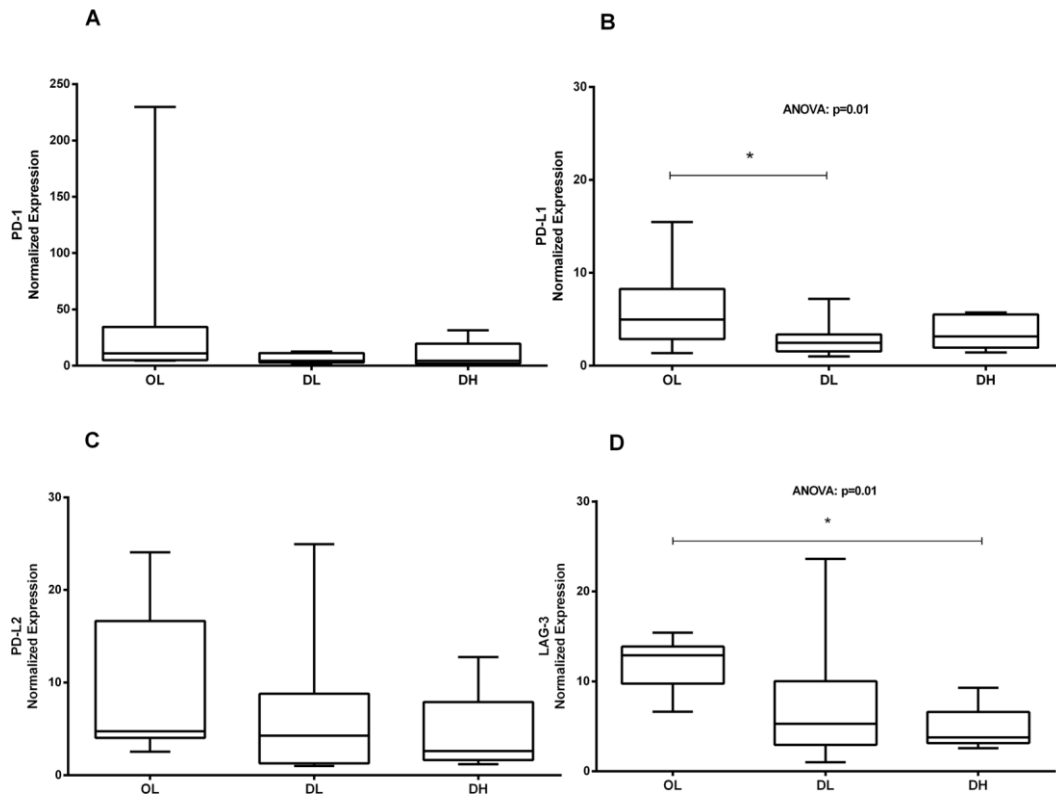


Figure 4. Gene expression of exhaustion markers in the spleen of dogs naturally infected with *L. infantum*. *Ex vivo* analysis by qPCR of the mRNA levels in the spleen of dogs classified according to the parasite load and splenic disorganization. Gene expression values were normalized to those of the constitutive genes HPRT and GAPDH. ANOVA: **(B)** $p = 0.01$; **(D)** $p = 0.01$. Tukey's test (*): **(B)** $p < 0.05$; **(D)** $p < 0.05$.

the present study, PD-1⁺ and LAG-3⁺ cells was not detected in splenic tissue by immunohistochemistry, which could be explained by the low resolution of this technique. It is also possible that antigenic re-stimulation of these cells for several days may be needed to enable the detection of the PD-1 and LAG-3 receptors *in situ*. Previous studies that identified exhausted cells in dogs used flow cytometry and re-stimulated the cells for a few days before using them in the analysis^{22,24,25}. However, it has been shown that the expression of PD-L1 in canine oral melanoma, osteosarcoma, haemangiosarcoma, mast cell tumour, mammary adenocarcinoma and prostate adenocarcinoma can be identified by immunohistochemistry²⁶. Human studies have reported a wide range of tissues that normally express PD-1 linker transcripts, with high levels of expression observed in the placenta, heart, lungs and liver and low levels of expression observed in the spleen, lymph nodes and thymus²⁷⁻³⁰. In this study, CTLA-4⁺ cells and the PD-1, PD-L1, PD-L2 and LAG-3 genes were expressed at lower levels in the groups with greater disorganization and higher parasite load in the spleen, with significant differences observed for CTLA-4, PD-L1 and LAG-3. In a study of a BALB/C mouse model infected with *L. donovani*, the authors observed an increase in CTLA-4⁺ expression in the initial stages of infection, 24–48 hours after infection¹⁷. In the present study, we observed fewer CTLA-4⁺ cells and decreased gene expression of the other exhaustion markers in the animals with disorganized SWP and high parasite load, possibly as a consequence of cell apoptosis, as the apoptotic profile was detected across all groups. The number of apoptotic cells was higher in the group presenting a low parasite load and in the group exhibiting disorganized white pulp than in the other groups. The lowest number of apoptotic cells was observed in the animals with disorganized spleen microarchitecture and high parasite load, a result similar to that observed for CTLA-4⁺ cells and the mRNA expression of PD-1 and LAG-3. In addition, we observed that the majority of apoptotic cells in the spleen of dogs in the DH group were CTLA-4⁺. This finding corroborates the hypothesis that the lower number of exhausted cells observed in the DH group is due to cell death with the substantial reduction in cellularity leading to immunosuppression. In macrophages, the PD-1/ SHP2 signalling axis has been reported to negatively regulate the activation of AKT and that the H₂O₂-mediated induction of PD-1 expression contributes to apoptosis³¹. Currently, the involvement of CTLA-4 in the induction of apoptosis is not well defined. In a murine model, the binding of a monoclonal antibody (mAb) to the CTLA-4 receptor on the surface of activated T cells has been shown to induce apoptosis in a Fas-independent manner³². CTLA-4 can trigger apoptosis in CTLA-4-expressing tumour cells after the cells interact with soluble CD80 or CD86 recombinant ligands, and the induction of apoptosis occurs through a caspase-8-dependent mechanism³³. In dogs infected with *L. infantum*, apoptosis has been observed in the lymph nodes and skin and is more frequently observed in organs with higher parasite loads³⁴. The liver and spleen of infected dogs with *L. infantum* show a larger number of cells undergoing apoptosis (lymphocytes), suggesting that this process may contribute

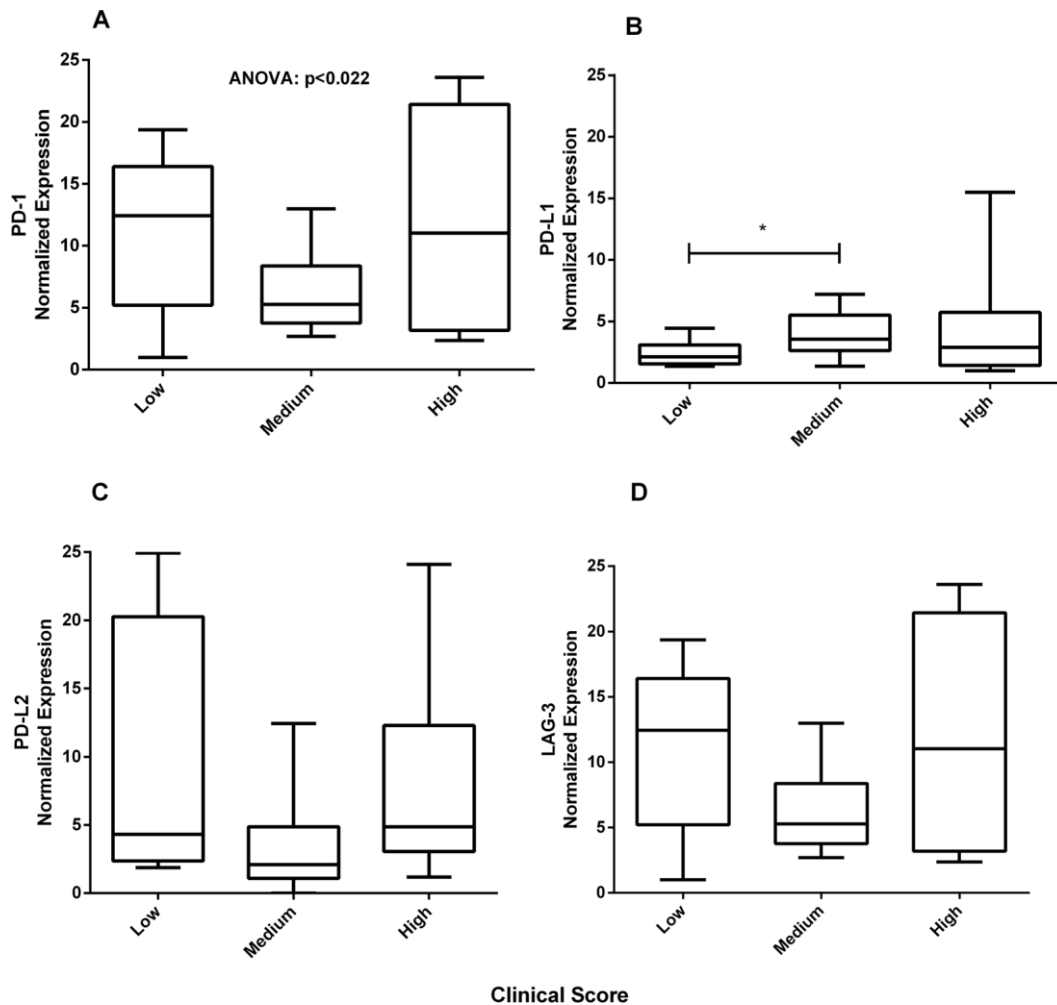


Figure 5. Gene expression of exhaustion markers in the spleen of dogs naturally infected with *L. infantum*. *Ex vivo* analysis by qPCR of the mRNA levels in the spleen of dogs classified according to the clinical score. Gene expression values were normalized to those of the constitutive genes HPRT and GAPDH. ANOVA: (A) $p < 0.022$. (*) Mann-Whitney test: (B) $p < 0.036$.

to the survival of *Leishmania* in these organs since lymphocytes undergoing apoptosis are not able to fight against parasites³⁴. These results corroborate those of another study that observed apoptosis in T cells from the spleen and peripheral blood, suggesting that *Leishmania* parasites can induce apoptosis in T cells in association with a decrease in cell-mediated immunity³⁵. Altogether, the data presented in this study suggest that apoptosis may be the mechanism involved in periarteriolar lymphatic sheath atrophy, lymphoid follicle atrophy, and the reduction in CD4⁺ and CTLA-4⁺ cell numbers.

The reduction in the number of CD4⁺ cells in the red pulp of animals in the DL group and the increase in these cells in the red pulp of animals in the DH group have been discussed in our previous work⁷. The accumulation of CD4⁺ cells in the red pulp of animals in the DH group was associated with atrophy of the periarteriolar lymphatic sheath. This finding suggests that these cells present defects in homing to their specific compartments in the white pulp and thus accumulate in the red pulp, where they eventually undergo apoptosis. In other studies, similar numbers of CD4⁺ cells were found in healthy and infected dogs, showing no correlation with clinical status³⁶, which it may be indicative of the large individual variability among the dogs³⁷. This reduction in cellularity was also evidenced by the reduced numbers of cells isolated from the spleen in dogs in the DH group and by the detection of periarteriolar lymphatic sheath and lymphoid follicle atrophy. T lymphocytes were few in number or absent from the white pulp and could be found in red pulp, which represents most of the remaining tissue. However, the number of B lymphocytes and plasma cells increased and accumulated in this area³⁸, which may contribute to the total number of apoptotic cells in the DL and DH groups. Finally, we also detected CD4⁺ and CD8⁺ cells expressing both TIM-3 and CTLA-4 exhaustion receptors. However, no significant differences were found among the groups. When analysing naturally infected dogs, a high degree of variability is inevitable, which can influence the results. However, the DL group presented the highest CD4⁺CTLA-4⁺ counts, similar to that observed for the CTLA-4⁺ cell count in the red pulp by immunohistochemistry.

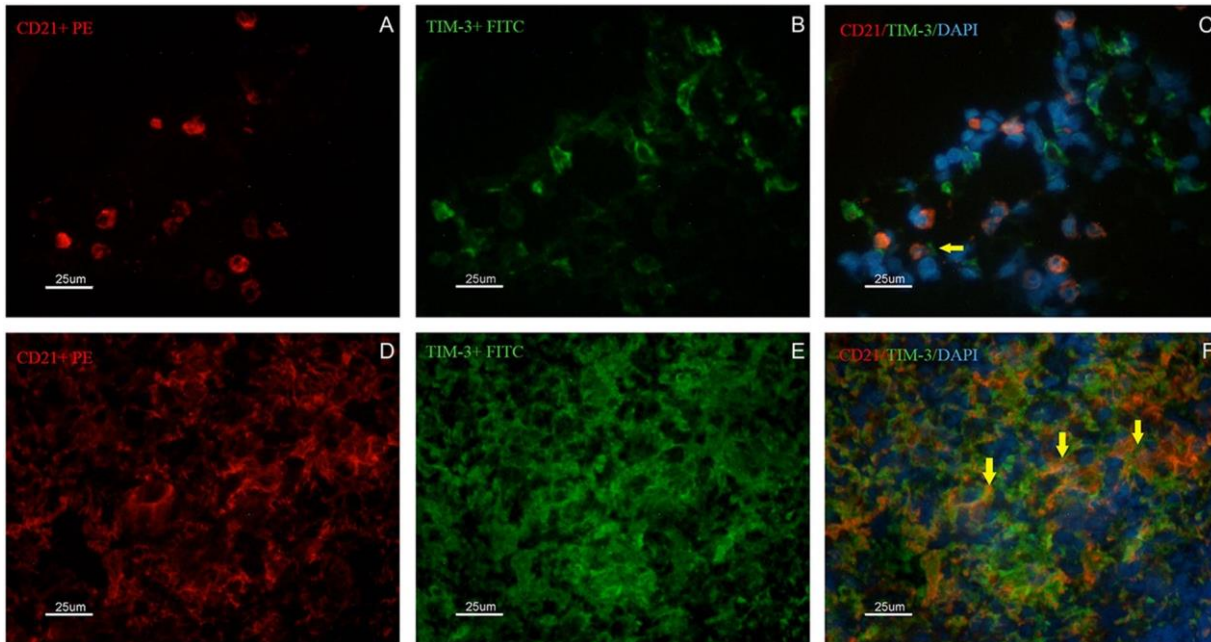


Figure 6. Identification of CD21⁺ and TIM-3⁺ cells by immunofluorescence in the spleen of dogs naturally infected by *L. infantum* presenting organized (A–C) or disorganized (D–F) splenic white pulp. In (A,D) the presence of CD21⁺ cells/B lymphocytes (red PE) is shown. In (B,E) the presence of TIM-3⁺ cells (green FITC) is shown. In (C,F) overlapping images (red PE/green FITC/blue DAPI) are shown. Yellow arrows indicate CD21⁺ cells also expressing TIM-3⁺. Scale bar: 25 μm.

Interestingly, despite lower quantities of T lymphocytes, as measured by periarteriolar lymphatic sheath atrophy and the detection of apoptotic cells, we observed that the expression of TIM-3 was high in all groups. We hypothesized that exhaustion receptors are expressed on cells other than T lymphocytes—possibly B lymphocytes, as B lymphocytes represent a frequently observed subpopulation in the spleen. To answer this question, we identified CD21⁺TIM3⁺ B cells in the spleen of infected dogs, suggesting that the cellular exhaustion process may also occur in B cells during the parasitism of dogs by *L. infantum*. Studies examining exhausted B lymphocytes expressing TIM-4⁺ have already been performed in mice³⁹, but the role of TIM-3 in leishmaniasis has not yet been clarified. In dogs infected by *L. infantum*, the association of SWP microarchitecture disruption with the accumulation of plasma cells in the spleen has been demonstrated. In addition, dogs with active infection and disorganization of the white pulp present more severe dysproteinemia and an increased serum globulin fraction, which also correlates with the intensity of the accumulation of plasma cells⁴⁰. Thus, IgG-producing cells are predominantly responsible for the increase in plasma cell density in the spleen⁴⁰. In addition, the expression levels of CXCL12, APRIL and BAFF, molecules associated with the localization and survival of plasma cells⁴¹, are elevated in the splenic tissue of animals with active infection and disorganization of the SWP⁴⁰. Thus, it is reasonable to speculate that polyclonal activation of B cells contributed to diminished apoptotic cells in DH dogs. Plasmacytosis in secondary lymphoid organs has been proposed to be primarily responsible for the hypergammaglobulinemia associated with chronic inflammatory diseases⁴². Moreover, splenic plasmacytosis has been reported to be strongly associated with high serum globulin concentrations, a relative increase in the serum gamma globulin fraction and serum dysproteinemia⁴⁰. Serum protein electrophoresis has revealed that the hypergammaglobulinemia presented by animals with infection and the disorganization of the SWP are clearly distributed polyclonally⁴³. The role of PD-L1 in B cell function and experimentally induced chronic inflammatory responses in dogs has been demonstrated, and the presence of a novel and critical molecule for B cell regulation, the B10 regulator, has been shown to induce the expression of IgD during progressive VL⁴⁴. Cells expressing B10 produce IL-10, which induces other B cells and T cells to produce IL-10 and suppresses IFN-γ through PD-L1/PD1. PD-L1⁺ cell types were not characterized in the present study, although PD-L1 gene expression was detected. Despite these published data, the role of exhausted B cells in the immunopathogenesis of VL requires further clarification.

Splenic disorganization caused by *L. infantum* infection and/or coinfections appears as rupture of the splenic microarchitecture, hindering the activation of lymphocytes and the immune response against antigens and thereby suppressing the immune response against *Leishmania* and other pathogens. Our data support the hypothesis that the alteration of the extracellular matrix of the spleen is related to the cellular exhaustion process and, consequently, to immunosuppression. This hypothesis may explain the development of clinical signs and the failure to control the parasite load in animals with SWP disorganization. We observed that most of the dogs presented disorganization of the microarchitecture of the SWP (N = 30, 73.2%). Additionally, we observed reductions in the size and number of lymphoid follicles, the number of cells in the periarteriolar lymphatic sheath, and the quantity of CD4⁺ lymphocytes in the red pulp. These results indicate that T and B lymphocytes may not migrate to their specific sites and/or are dying by apoptosis. According to the present data and the data reported

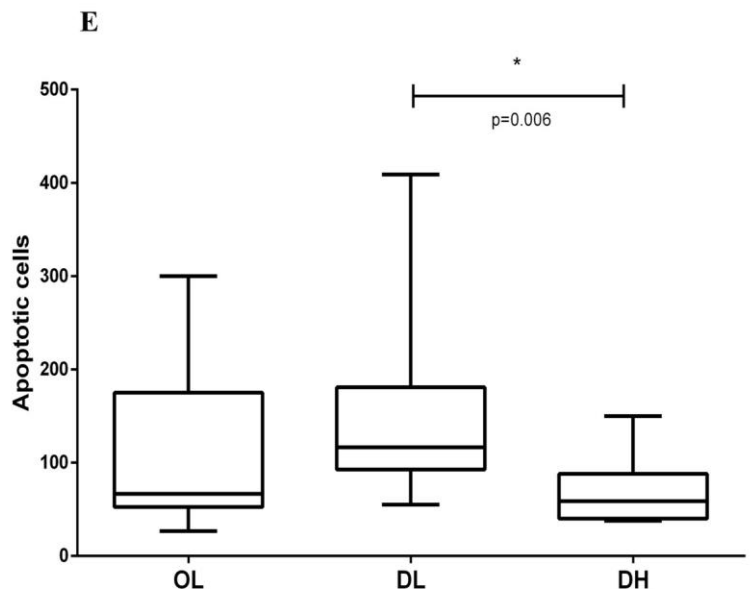
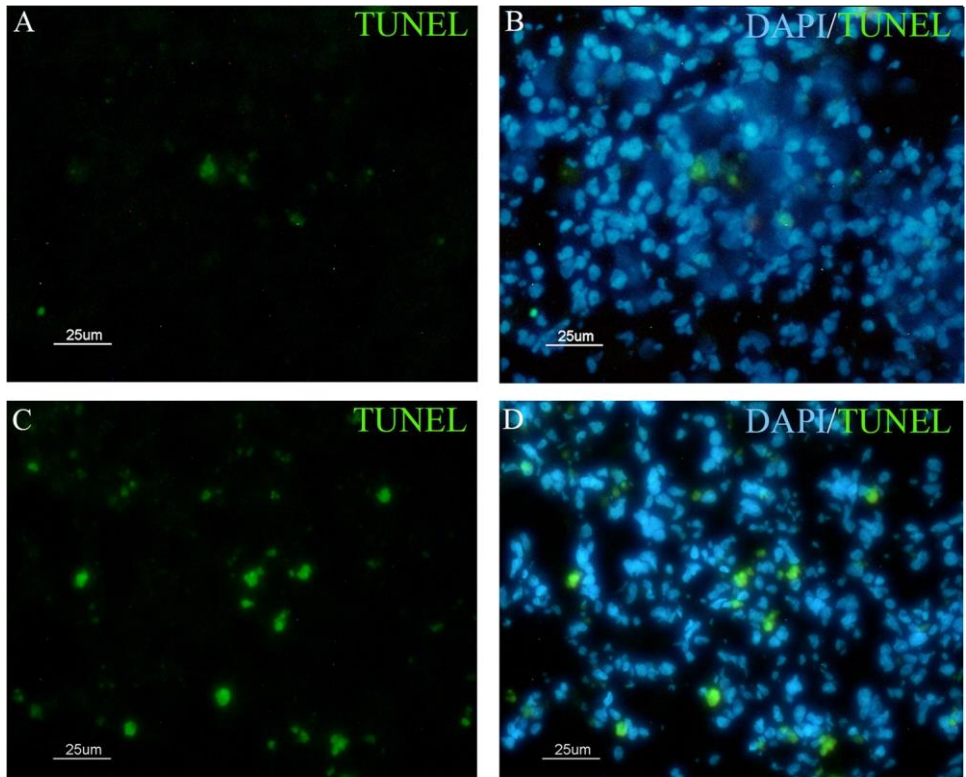


Figure 7. Identification of apoptotic cells by TUNEL staining of the spleen of dogs naturally infected by *L. infantum* presenting organized (A,B) or disorganized (C,D) splenic white pulp. Scale bar: 25 µm. (E) Quantitative analysis of apoptotic cells according to the disorganization of the splenic white pulp and the parasite load.

by other authors³⁵, the association between a high percentage of T cell apoptosis and structural disorganization of the SWP contributes to the inefficient cell-mediated immune response in dogs infected by *L. infantum*. The presence of apoptotic cells has also been reported, and naturally infected dogs have been demonstrated to exhibit a decreased total population of T lymphocytes and an increased percentage of apoptotic cells in the spleen and peripheral blood⁴.

Our results indicate that T and B cell exhaustion occurs in the spleen of dogs naturally infected with *L. infantum*. To the best of our knowledge, this is the first description of the expression of CTLA-4, TIM-3 and LAG-3 in the spleen of naturally infected dogs. The high expression levels of these markers indicate that they should be

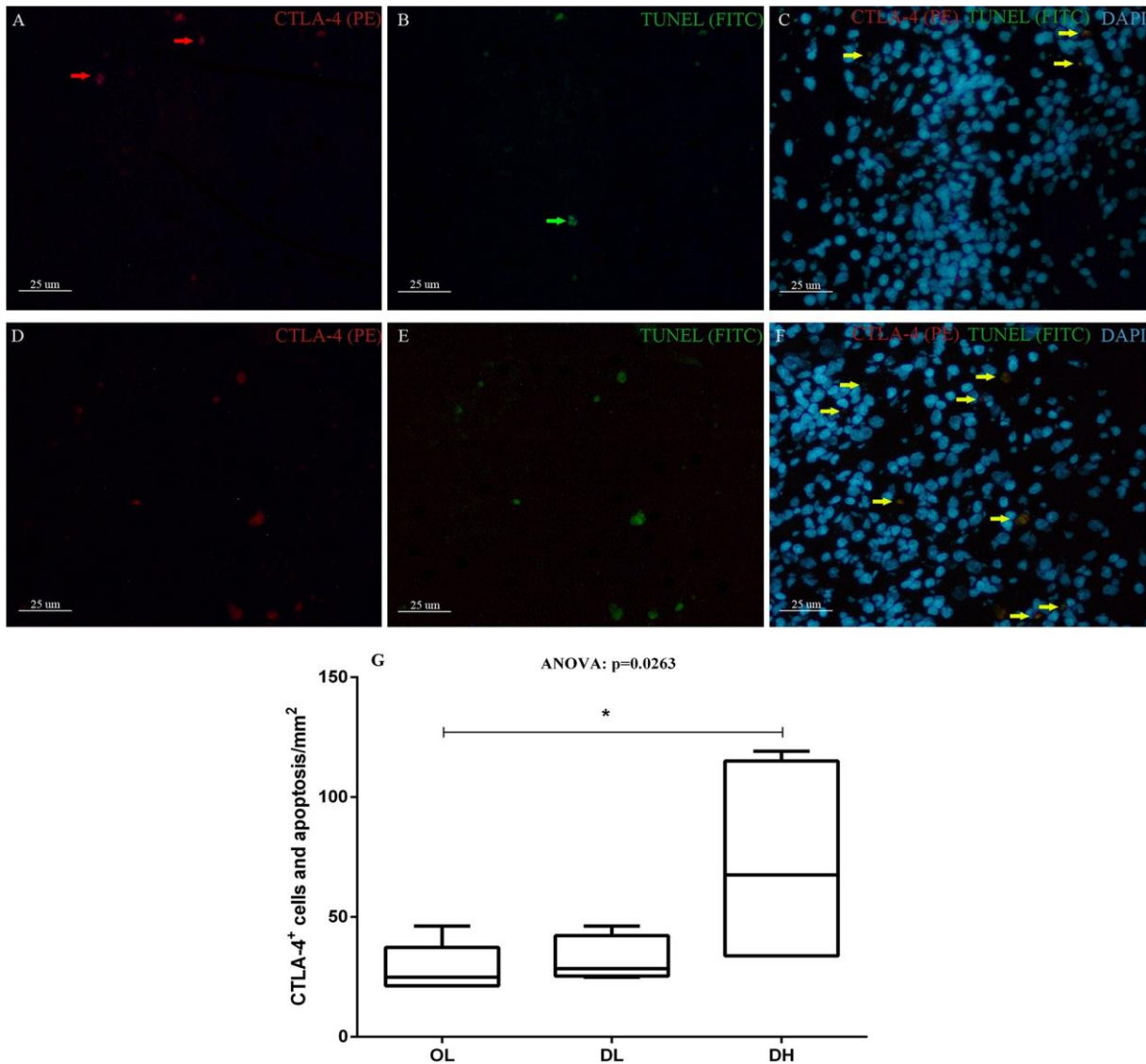


Figure 8. Identification of apoptotic CTLA-4⁺ cells by TUNEL staining of the spleen of dogs naturally infected by *L. infantum* presenting organized (A–C) or disorganized (D–F) splenic white pulp. Scale bar: 25 μ m. Red arrows indicate isolated CTLA-4 expression. Green arrows indicate cells undergoing apoptosis without expressing CTLA-4. Yellow arrows indicate double labelling (CTLA-4⁺ + apoptosis). (G) Quantitative analysis of CTLA-4⁺ cells and apoptotic cells/mm² according to the disorganization of the splenic white pulp and the parasite load. ANOVA: $p = 0.0263$. Mann-Whitney test (*): (B) $p = 0.0303$.

considered in approaches involving exhaustion process blockade, with immunomodulation of molecular pathways as an alternative therapeutic strategy for dogs with ZVL. Ultimately, we demonstrated associations among cellular exhaustion, apoptosis, splenic disorganization, reduction in CD4⁺ lymphocyte numbers, failure to control the parasite load and the worsening of disease.

Methods

ethics statement. The animals included in this study were dogs naturally infected with *L. infantum* that were destined for euthanasia, as recommended by the policies of the Brazilian Ministry of Health. All dog owners provided formal written consent for study participation. The samples were collected during necropsies conducted by veterinarians from the Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO-INI/FIOCRUZ). This study was approved by Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA-Fiocruz) under the licence LW-54/13 and conducted according to the Brazilian Law 11794/08 and Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Animals. Forty dogs from Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brazil, with a confirmed diagnosis of infection by *L. infantum* referred for compulsory euthanasia at the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases (INI/FIOCRUZ) were evaluated. Euthanasia was performed by the veterinarians as follows: a) 1.0% (1.0 mL/kg) thiopental (Thiopentax®, Cristalia) was administered intravenously; and b) after the detection of the absence

of a corneal reflex, which was induced by deep anaesthesia, 10 mL of 19.1% potassium chloride (Isofarma) was administered intravenously. The biological samples were obtained (the spleen and peripheral blood) during necropsy, and clinical data were scored prior to necropsy by two veterinarians.

clinical evaluation of the animals. Clinical evaluation was performed by two veterinarians who assessed the 6 typical clinical signs of ZVL in dogs: dermatitis, onychogryphosis, conjunctivitis, loss of body condition, alopecia and lymphadenomegaly. Each clinical sign was evaluated on the following scale: 0 (absent), 1 (mild), 2 (moderate) and 3 (severe)²⁰. The final classification was calculated as the sum of the points obtained; the animal could have a low clinical score (0 to 2 points), medium clinical score (3 to 6) or high clinical score (7 to 18).

Histopathological analysis. Tissue fragments from the spleen were fixed in 10% formalin-buffered solution (Merck, Darmstadt, Germany) and embedded in paraffin (Synth, Diadema, Brazil). Histological sections (5 µm thick) were affixed to microscopic slides and stained with haematoxylin and eosin (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK) for further analysis under an optical microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). Organization of the splenic lymphoid tissue of the white pulp, marginal zone and red pulp was analysed as previously described³. The white pulp was scored as follows: 1- organized with periarteriolar sheath, germinal centres, and distinct mantle and marginal zone. 2- Slightly disorganized, with some hyperplastic or hypoplastic change leading to the loss of definition of some regions of the white pulp. 3- Moderately disorganized, with evident white pulp, but the regions are barely individualized or indistinct. 4- Intensely disorganized, with a follicular structure little distinguishable from the red pulp and the T cell area. Quantification of the number of lymphoid follicles per mm² of tissue was also performed. The evaluation considered the presence or absence of follicles as well as the number of lymphoid follicles per field.

extraction of DnA from splenic tissue. Total DNA was isolated from approximately 10 mg of spleen using the QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Santa Clarita, USA), which included an early digestion with proteinase K (20 mg/mL) for 1 hour at 56 °C. The DNA was eluted in TE buffer and quantified with a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Determination of the parasite load by qPCR. The parasite load in the spleen was estimated by real-time PCR as previously described⁶. HPRT primers (Supplementary Table 1) were used to normalize the canine DNA concentrations in each sample. To quantify the number of DNA copies pertaining to the parasites, the primers for *ssrRNA* (Supplementary Table S1) were used⁴⁵ to amplify the gene encoding the ribosomal minor subunit RNA (*ssrRNA*, multi-copy gene). qPCR assays were performed with a Step One instrument (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc., Foster City, USA) using Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc., Foster City, USA). Two microliters of the purified total DNA (100 ng) was added to a final PCR volume of 20 µl containing Power SYBR Green 1X and 300 nM of each primer for HPRT PCR assays or 500 nM of each primer for *ssrRNA* PCR assays. qPCR was performed with an activation step at 95 °C for 10 minutes, followed by 40 cycles of denaturation and annealing/extension (95 °C for 15 seconds, 60 °C for 1 minute and 68 °C for 30 seconds). A standard curve was created for each target. All reactions were performed in duplicate for each target, and both targets were run on the same plate for the same sample. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from uninfected dogs and bulk cultures of *L. infantum* promastigotes (MCAN/BR/2007/CG-1) were quantified using a cell counter (Z1 COULTER COUNTER, Beckman Coulter, Fullerton, USA). Total DNA was extracted from 1.0×10^6 PBMCs and 1.0×10^7 promastigotes. Standard curves for the HPRT and *ssrRNA* genes were prepared using 10-fold serial dilutions. The animals were grouped into high or low parasite load groups as previously described⁶.

RNA extraction and quantification of the gene expression of exhaustion markers (PD-1, PD-L1, PD-L2 and LAG-3) by qRT-PCR. Total RNA was extracted from spleen tissue fragments using Trizol reagent (Invitrogen, Grand Island, NY), followed by final purification with an RNeasy kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. RNA was quantified with a Nanodrop TM 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA), and 2 µg of RNA was treated with RNase-free DNase (Ambion, Grand Island, NY). cDNA synthesis was performed with a High Capacity cDNA Synthesis kit (Applied Biosystems), and a control for genomic DNA contamination was included. qPCR was performed using a Power SYBR Green Master Mix system (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc.) on a ViiA 7 instrument (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc.). Reactions occurred in a final volume of 10 µl. Primer sequences and concentrations are shown in Supplementary Table S2. The thermal cycle consisted of an activation step at 95 °C for 10 minutes, followed by 45 cycles of denaturation at 95 °C for 15 seconds and annealing/extension at 60 °C for 1 minute. A dissociation curve (from 60 °C to 95 °C) was created for non-specific amplification evaluation. For the PD-1 and LAG-3 sets, a reading step was added at 80 °C and 78 °C, respectively, shortly after the annealing/extension step. Normalized expression of the genes of interest was previously determined⁴⁶, where HPRT and GAPDH⁶ were used as references. Efficiencies were determined experimentally with serial dilutions of dog cDNAs⁴⁷. All reactions were performed in duplicate, and negative controls were included in all trials.

immunohistochemistry. Tissue fragments from the spleen were frozen in TissueTek OCT resin (Sakura, Alphen aan den Rijn, The Netherlands). Spleen sections with a thickness of 5 µm were fixed with acetone P.A. (Merck) on silanized slides (Dako, Carpinteria, CA, USA). Then, the sections were hydrated in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 minutes, followed by inhibition of endogenous peroxidase with a solution containing 3% hydrogen peroxide (Dako) for 1 minute at room temperature. The sections were washed twice in PBS for 5 minutes each time. For the inhibition of non-specific binding, the sections were incubated in a solution containing 0.4% BSA for 20 minutes at room temperature. The excess blocking solution was discarded, and primary

antibodies for CD4⁺ (YKIX302.9), CD8⁺ (YCATE55.9), CD21⁺ (CA2.1D6) (Bio-Rad AbD Serotec, Hercules, USA), the cytokines IFN- γ (CC302) and IL-10 (CC318) (Bio-Rad AbD Serotec), the proliferation marker Ki-67 (SoIA15) (eBioscience, San Diego, USA), and the exhaustion markers PD-1 (NAT105), LAG-3 (11E3), CTLA-4 (BNI3) and TIM-3 (polyclonal) (Abcam, Cambridge, UK) were added for 18 hours at 4 °C. Control of the reaction was accomplished by suppressing the primary antibody in at least one of the tissue sections. The slides were subsequently washed with PBS twice for 5 minutes each and then incubated with the appropriate biotinylated secondary antibody (Dako) for 25 minutes, followed by another 2 washes with PBS. The sections were incubated with streptavidin-peroxidase (Genetex) for 25 minutes. After another 2 washes with PBS, the antigen-antibody reaction was detected with an AEC kit (Invitrogen, Carlsbad, USA). After visualization of the optical microscopy marking, the reaction was stopped with type II water, and the sections were counterstained with Meyer's haematoxylin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), followed by assembly in Faramount medium (Dako). Five slides per animal were evaluated under an optical microscope, and the levels of the lymphocyte markers CD4⁺, CD8⁺, and CD21⁺; cytokines; the proliferation marker Ki-67; and exhaustion markers were quantified in the splenic red pulp in alternating fields under 40x magnification. The results were expressed as the percentage of positive cells and cells/mm². Qualitative analyses were performed in both the red and white pulp.

Immunofluorescence. The splenic tissue was cryosectioned at a thickness of 5 μ m, and the sections were placed on silanized slides (Dako, Carpinteria, CA, USA) and fixed with acetone P.A. (Merck) for 10 minutes. For the inhibition of non-specific binding, the sections were incubated in a solution containing 0.4% BSA for 20 minutes at room temperature. The excess blocking solution was discarded, and the primary antibodies for the detection of CD21 (Bio-Rad AbD Serotec), CTLA-4 and TIM-3 (Abcam) were added for 18 hours at 4 °C. The reaction was revealed by a secondary anti-mouse IgG antibody conjugated to phycoerythrin (PE-red) and an anti-rabbit IgG antibody conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC). The incubation with the secondary antibodies was performed in a dark room for 30 minutes at room temperature. The slides were assembled using Fluoromount-g medium containing DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole) (Thermo Fisher Scientific), and the reaction was observed under a fluorescence microscope. The images were processed and overlaid with ImageJ software (NIH, USA).

tunel. Silanized slides containing spleen sections were fixed in 10% paraformaldehyde in PBS for 15 minutes at room temperature. They were then washed twice in PBS for 5 minutes each. Cell permeabilization was performed with proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, final concentration of 20 μ g/mL) in 10 mM Tris/HCl pH 8.0 reconstituted (10 mg/mL) and diluted 1:500 in PBS. A volume of 100 μ l of proteinase K (20 μ g/mL) was added to cover the section of tissue for 10 minutes at room temperature. The slides were washed in PBS, and the TUNEL reagent (DeadEnd Fluorometric TUNEL assay, Promega Co., USA) was added to the sections according to the manufacturer's instructions. This reagent allows the detection of DNA fragmentation by labelling the terminal portions of nucleic acids. For the negative control, only the equilibration buffer was added. Incubation in a humid chamber was performed at 40 °C for 90 minutes. The slides were subsequently washed with PBS for 5 minutes under constant stirring, and after drying, they were mounted in Fluoromount-G with DAPI (Thermo Fisher Scientific, USA). The slides were analysed under a Zeiss fluorescence microscope, and the labelled apoptotic cells were quantified to their full extent in alternating fields under 40x magnification. The total number of DAPI-labelled cells was also quantified.

flow cytometry. Splenocytes were isolated from splenic fragments 1 cm in diameter by mechanical disruption, followed by Histopaque gradient (Sigma). Splenocytes were subsequently frozen in 90% FCS and 10% DMSO (Sigma) until use. Frozen splenocytes were thawed at 37 °C and washed in PBS/10% foetal bovine serum and quantified using a Neubauer chamber. Only samples with 60% cell recovery and 85% viability were evaluated. Each well was plated with 1×10^6 cells and then incubated for 15 minutes in blocking solution containing 5 mL of human serum per well. Thereafter, the anti-CD4 (YKIX302.9), anti-CD8 (YCATE55.9) (Bio-Rad AbD Serotec, USA), anti-CTLA-4 (BNI3) and anti-TIM-3 (polyclonal) (Abcam, United Kingdom) primary antibodies were incubated for 30 minutes and subsequently washed with PBS and plate centrifuged. The secondary antibodies anti-rabbit FITC (eBioscience, San Diego, USA), anti-mouse Dylight 633 (ImmunoReagents, Raleigh, USA) and anti-mouse Dylight 488 (KPL, Gaithersburg, USA) and isotypes APC and FITC (eBioscience, USA) were added, followed by lavage and fixation. Data were acquired with a BD Canto II flow cytometer using BD software FACSDiva (BD Bioscience, USA). Automatic compensation was performed at the beginning of each experiment, and data were analysed using the FlowJo v10 program (TreeStar Software, USA).

Statistical analysis. This study used a non-probabilistic sample, and for analysis purposes, the animals were divided into 3 groups according to their clinical signs: 1- low clinical score; 2- medium clinical score; and 3- high clinical score. For the analysis, the animals were also divided according to the organization of the splenic lymphoid tissue and the parasite load: 1- organized/low load; 2- disorganized/low load; and 3- disorganized/high load. The non-parametric Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests for independent samples and the Spearman rank correlation test were performed using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). For gene expression analyses, ANOVA and Tukey tests were used. Values of P < 0.05 were considered significant. Data are represented by the median and interquartile range.

References

1. Borja, L. S. *et al.* Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. *Vet. Parasitol.* **229**, 110–117 (2016).
2. Maia, C. & Campino, L. Cytokine and Phenotypic Cell Profiles of *Leishmania infantum* Infection in the Dog. *J. Trop. Med.* **2012**, 541571 (2012).
3. Santana, C. C. *et al.* Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. *Parasite Immunol.* **30**, 515–524 (2008).

4. Silva, J. S. *et al.* Low CXCL13 expression, splenic lymphoid tissue atrophy and germinal center disruption in severe canine visceral leishmaniasis. *PLoS One* **7**, e29103 (2012).
5. Lima, I. S. *et al.* Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp. *PLoS One* **9**, e87742 (2014).
6. Cavalcanti, A. S. *et al.* Parasite load induces progressive spleen architecture breakage and impairs cytokine mRNA expression in Leishmania infantum-naturally infected dogs. *PLoS One* **10**, e0123009 (2015).
7. 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 Negl. Trop. Dis.* **12**, e0006445 (2018).
8. Reis, A. B. *et al.* Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **128**, 87–95 (2009).
9. Rodríguez-Cortés, A. *et al.* Compartmentalized Immune Response in Leishmaniasis: Changing Patterns throughout the Disease. *PLoS One* **11**, e0155224 (2016).
10. Silva, L. C. *et al.* Canine visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease. *Int. J. Exp. Pathol.* **94**, 133–143 (2013).
11. Nascimento, M. S. L. *et al.* Naturally Leishmania infantum-infected dogs display an overall impairment of chemokine and chemokine receptor expression during visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **153**, 202–208 (2013).
12. Wherry, E. J. T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* **12**, 492–499 (2011).
13. Barber, D. L. *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682–687 (2006).
14. Eichbaum, Q. PD-1 signaling in HIV and chronic viral infection—potential for therapeutic intervention? *Curr. Med. Chem.* **18**, 3971–3980 (2011).
15. Joshi, T., Rodríguez, S., Perovic, V., Cockburn, I. A. & Stäger, S. B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8(+) T cells and confers protection against Leishmania donovani infections. *PLoS Pathog.* **5**, e1000431 (2009).
16. Gautam, S. *et al.* CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* **209**, 290–299 (2014).
17. Murphy, M. L., Cotterell, S. E., Gorak, P. M., Engwerda, C. R. & Kaye, P. M. Blockade of CTLA-4 enhances host resistance to the intracellular pathogen, Leishmania donovani. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **161**, 4153–4160 (1998).
18. Boggiatto, P. M. *et al.* Immunologic indicators of clinical progression during canine Leishmania infantum infection. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* **17**, 267–273 (2010).
19. Costa, D. L. *et al.* Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. *Pathog. Glob. Health* **107**, 78–87 (2013).
20. Quinnell, R. J. *et al.* Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* **183**, 1421–1424 (2001).
21. Solano-Gallego, L., Montserrat-Sangrà, S., Ordeix, L. & Martínez-Orellana, P. Leishmania infantum-specific production of IFN- γ and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniasis. *Parasit. Vectors* **9**, 317 (2016).
22. Esch, K. J., Juelsingard, R., Martinez, P. A., Jones, D. E. & Petersen, C. A. Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **191**, 5542–5550 (2013).
23. Doe, H. T. *et al.* Expression of PD-1/LAG-3 and cytokine production by CD4(+) T cells during infection with Plasmodium parasites. *Microbiol. Immunol.* **60**, 121–131 (2016).
24. Chiku, V. M. *et al.* PD-1 function in apoptosis of T lymphocytes in canine visceral leishmaniasis. *Immunobiology* **221**, 879–888 (2016).
25. Coy, J., Caldwell, A., Chow, L., Guth, A. & Dow, S. PD-1 expression by canine T cells and functional effects of PD-1 blockade. *Vet. Comp. Oncol.* **15**, 1487–1502 (2017).
26. Maekawa, N. *et al.* Immunohistochemical Analysis of PD-L1 Expression in Canine Malignant Cancers and PD-1 Expression on Lymphocytes in Canine Oral Melanoma. *PLoS One* **11**, e0157176 (2016).
27. Dong, H., Zhu, G., Tamada, K. & Chen, L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.* **5**, 1365–1369 (1999).
28. Freeman, G. J. *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* **192**, 1027–1034 (2000).
29. Tseng, S. Y. *et al.* B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J. Exp. Med.* **193**, 839–846 (2001).
30. Carter, L. *et al.* PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur. J. Immunol.* **32**, 634–643 (2002).
31. Roy, S. *et al.* The role of PD-1 in regulation of macrophage apoptosis and its subversion by Leishmania donovani. *Clin. Transl. Immunol.* **6**, e137 (2017).
32. Scheipers, P. & Reiser, H. Fas-independent death of activated CD4(+) T lymphocytes induced by CTLA-4 crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 10083–10088 (1998).
33. Contardi, E. *et al.* CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction. *Int. J. Cancer* **117**, 538–550 (2005).
34. Moreira, P. R. R. *et al.* Influence of apoptosis on the cutaneous and peripheral lymph node inflammatory response in dogs with visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* **192**, 149–157 (2013).
35. de Lima, V. M. F. *et al.* Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral blood of (L.) chagasi naturally infected dogs. *Vet. Parasitol.* **184**, 147–153 (2012).
36. Miranda, S., Martorell, S., Costa, M., Ferrer, L. & Ramis, A. Characterization of circulating lymphocyte subpopulations in canine leishmaniasis throughout treatment with antimonials and allopurinol. *Vet. Parasitol.* **144**, 251–260 (2007).
37. Paltrinieri, S., Gradoni, L., Roura, X., Zatelli, A. & Zini, E. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Vet. Clin. Pathol.* **45**, 552–578 (2016).
38. Hermida, M. D. E.-R., de Melo, C. V. B., Lima, I. D. S., Oliveira, G. G. D. S. & Dos-Santos, W. L. C. Histological Disorganization of Spleen Compartments and Severe Visceral Leishmaniasis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 394 (2018).
39. Rodríguez-Manzanet, R. *et al.* T and B cell hyperactivity and autoimmunity associated with niche-specific defects in apoptotic body clearance in TIM-4-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 8706–8711 (2010).
40. 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* **11**, e0156733 (2016).
41. Tangye, S. G. Staying alive: regulation of plasma cell survival. *Trends Immunol.* **32**, 595–602 (2011).
42. Hiepe, F. *et al.* Long-lived autoreactive plasma cells drive persistent autoimmune inflammation. *Nat. Rev. Rheumatol.* **7**, 170–178 (2011).
43. O'Connell, T. X., Horita, T. J. & Kasravi, B. Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. *Am. Fam. Physician* **71**, 105–112 (2005).
44. Schaut, R. G. *et al.* Regulatory IgDhi B Cells Suppress T Cell Function via IL-10 and PD-L1 during Progressive Visceral Leishmaniasis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **196**, 4100–4109 (2016).
45. Prina, E., Roux, E., Mattei, D. & Milon, G. Leishmania DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes Infect.* **9**, 1307–1315 (2007).
46. Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F. & Vandesompele, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* **8**, R19 (2007).
47. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).

Acknowledgements

We are grateful for the administrative staff at Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose (LPL-IOC/FIOCRUZ) and Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO- INI/FIOCRUZ). This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (P.C. Universal grant Nos 448951/2014-2 and 421223/2018-9), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Rio de Janeiro - FAPERJ (E-26/010.001018/2016), and PAEF-Fiocruz; IOC-FIOCRUZ, Programa Cientista do Nosso Estado (Faperj -E-26/203.069/2016). R.P., E.C., R.C.M. and F.B.F. received productivity fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author contributions

R.P. and F.N.M. conceived and designed the research; T.L.d.S., A.V.A.d.S., L.O.R.P., A.A.V.M.J., R.C.M., M.C.B. and F.N.M. performed the experiments; T.L.d.S., R.P. and F.N.M. prepared the figures and wrote the manuscript; T.L.d.S., L.O.R.P., D.A.M.C. and F.N.M. analysed the data.; T.L.d.S., R.P. and F.N.M. edited the manuscript; and T.L.d.S., A.V.A.d.S., L.O.R.P., F.B.F., A.A.V.M.J., R.C.M., D.A.M.C., M.C.B., E.C., R.P. and F.N.M. revised and approved the final manuscript.

Additional information

Supplementary information accompanies this paper at

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-49344-1>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or

format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

