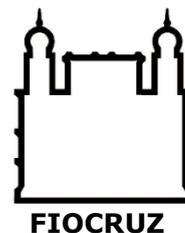




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DETECÇÃO DE CÉLULAS PRODUTORAS DE ANTICORPOS
ESPECÍFICOS PARA *Leishmania infantum* EM TECIDO ESPLÊNICO**

JONATHAN LUÍS MAGALHÃES FONTES

Salvador - BA

2019

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

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DETECÇÃO DE CÉLULAS PRODUTORAS DE ANTICORPOS
ESPECÍFICOS PARA *Leishmania infantum* EM TECIDO ESPLÊNICO**

JONATHAN LUÍS MAGALHÃES FONTES

Orientador: Prof. Dr. Washington Luis Conrado dos-Santos

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

Salvador – BA

2019

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

F683d Fontes, Jonathan Luís Magalhães.
Detecção de células produtoras de anticorpos específicos para *Leishmania infantum* em tecido esplênico. / Jonathan Luís Magalhães Fontes. - 2019.
60 f. : il. ; 30 cm.

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

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

1. Plasmócitos. 2. Leishmaniose Visceral. 3. Imunohistoquímica. I. Título.

CDU 616.993.161

**“DETECÇÃO DE CÉLULAS PRODUTORAS DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA
Leishmania infantum EM TECIDO ESPLÊNICO”.**

Jonathan Luís Magalhães Fontes

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 09 de dezembro de 2019.

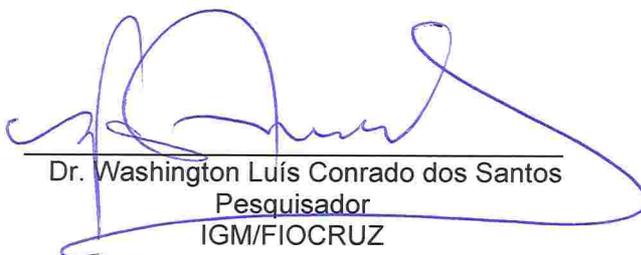
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Iguaracyra Barreto de Oliveira Araújo
Professora
UFBA



Dr. Daniel Abensur Athanazio
Professor
UFBA



Dr. Washington Luís Conrado dos Santos
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

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

CNPq - 400905/2013.2

FAPESB - PET053/2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai, que sempre me incentivou a buscar o conhecimento, mas que hoje não estará presente para comemorar essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Irlete e Jailton (*in memoriam*), e meus irmãos Ivan e Euler, pelo apoio, incentivo e por estarem sempre comigo;

Ao meu orientador, Dr. Washington, por todas as sugestões, correções, incentivo a fazer sempre o melhor e todos os ensinamentos;

Aos meus amigos e colegas da pós, em especial Dr^a. Carolzinha, Bianca, Reginaldo, Juliana, Ivanéia e Micely, por compartilharem os dramas, as alegrias e fazer com que o tempo na Fiocruz fosse mais prazeroso;

Aos meus amigos do Grupo WLCS e do LAPEM, pela parceria e auxílio, sem vocês esse trabalho não existiria;

A Urandi, por todos os conselhos, apoio e compreensão;

Aos meus familiares, meu primo-irmão Leovan, D. Ana, minhas tias e primos;

À Biblioteca do IGM e seus funcionários, em especial Ana Fiscina, pelo suporte e correções;

Ao Instituto Gonçalo Moniz e ao Centro de Controle de Zoonoses-Camaçari-Ba, pelo apoio e infraestrutura;

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

Aos meus amigos Verena, Lorena e Iuri, por sempre estarem presentes nessa jornada;

Ao "Papo de Cumades", por, mesmo a quilômetros de distância, se fazerem presentes, ouvindo chorar as pitangas e incentivando a seguir em frente;

Aos animais que fizeram esta pesquisa possível;

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

Muito obrigado!

FONTES, Jonathan Luís Magalhães. Detecção de células produtoras de anticorpos específicos para *Leishmania infantum* em tecido esplênico. 2019. 60 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A leishmaniose visceral zoonótica (LV) é uma enfermidade causada pela *Leishmania infantum*, acomete seres humanos e também animais. O baço está envolvido na imunopatogênese da LV e apresenta alterações nos microambientes da polpa branca que estão associadas ao aumento da susceptibilidade à coinfeções e a morte. A plasmocitose é uma das alterações observadas no baço na LV, porém a fração dessas células produtora de anticorpos específicos para moléculas de *Leishmania* e a distribuição dessas células nos compartimentos esplênicos ainda não é conhecida. **OBJETIVO:** O objetivo deste trabalho foi padronizar a técnica para detecção de células produtoras de anticorpos contra antígenos de *L. infantum* e determinar a proporção e distribuição dessas células no baço de cães com LV. **MATERIAL E MÉTODOS:** Antígenos solúveis biotinilados de membrana de promastigotas de *L. infantum* foram utilizados como sondas em uma reação de imunohistoquímica modificada para detectar a presença de células secretoras de anticorpos anti-*L. infantum*. Utilizamos baços de 8 cães oriundos de área endêmica para LV e como controle, 3 cães normais do canil do Instituto Gonçalo Moniz. As amostras foram criopreservadas, seccionadas e coletadas em lâminas para imunohistoquímica. A quantidade de células marcadas e não marcadas foi quantificada, e calculada a proporção na polpa vermelha (PV) e Bainha linfóide periarteriolar (PALS) do baço. **RESULTADOS:** Cães com LV possuem hiperglobulinemia e mais plasmócitos na PV que cães sem LV. Dos cães com LV, 75% (6/8) apresentavam menos de 42% de células secretoras de anticorpos anti-*L. infantum* na PV. Ainda, a proporção de plasmócitos marcados é maior na PALS (59,3%) do que na PV (29,8%) e quanto maior a proporção na PALS, menor é a proporção de células positivas na PV. **CONCLUSÕES:** A maioria dos plasmócitos observados na PV durante a LV não é específico para *L. infantum*. E os animais que tem perfil clínico mais grave tendem a apresentar menor frequência de plasmócitos específicos na PV.

Palavras-chave: Plasmócitos; Leishmaniose Visceral; Imunohistoquímica.

FONTES, Jonathan Luís Magalhães. Detection of anti-*L.infantum* specific antibody producing cells in splenic tissue. 2019. 60s. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Visceral leishmaniasis (VL) is a disease caused by parasites of the genus *Leishmania*, affecting humans and other mammals worldwide. Spleen is involved in VL immunopathogenesis and presents alterations in white pulp microenvironments that are associated with increased susceptibility to coinfections and patient death. Plasmacytosis in splenic red pulp (RP) is one of the main alterations observed, but the specificity of secreted antibodies and distribution of these cells had not yet been evaluated. **AIM:** The aim of this study was to standardize the technique for detection of anti-*L. infantum* antibody producing cells and to determine the proportion of these cells in the spleen of dogs with VL. **MATERIAL AND METHODS:** *L. infantum* soluble biotinylated antigens were used as probes in a modified immunohistochemistry reaction to detect the presence of anti-*L. infantum* antibody secreting cells. Were used spleens from eight dogs from the endemic area for VL and as a control, three dogs from Instituto Gonçalo Moniz kennel. The samples were cryopreserved and sectioned on slides for immunohistochemistry. The amount of labeled and unlabeled cells was quantified, and the ratio in spleen RP and Periarteriolar lymphatic sheath (PALS) was calculated. **RESULTS:** Dogs with VL present hyperglobulinemia and more plasma cells in RP than dogs without VL. Among dogs with VL, 75% (6/8) had less than 42% of anti-*L. infantum* antibody-secreting cells in RP. The proportion of labeled plasma cells is higher in PALS (59.3%) than in RP (29.8%) and as higher the proportion in PALS, smaller is the proportion of positive cells in RP. **CONCLUSIONS:** Most plasma cells observed in RP during VL are not specific for *L. infantum*. Also, animals that have severe clinical profile tend to have a lower frequency of specific plasma cells in PV.

Keywords: Plasma cell; Visceral Leishmaniasis; Immunohistochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Esquema ilustrativo da diferenciação dos linfócitos B.....	19
Figura 2 - Desenho esquemático do delineamento experimental	27
Figura 3. Desenho esquemático da coleta dos fragmentos no baço dos cães.	28
Figura 4. L. infatum em fase estacionária de cultivo in vitro biotiniladas .	35
Figura 5. L.infatum em fase estacionária de cultivo in vitro sem biotinilar	36
Figura 6- Macrófagos de linhagem J774.....	37
Figura 7- Titulação do antígeno biotinilado utilizando reação de Dot Blot.	38
Figura 8- Relação das proteínas séricas albumina/globulina	40
Figura 9- Fotomicrografias de baço de cães com LV.	41
Figura 10- Plasmocitose na polpa vermelha do baço.	42
Figura 11 - Fotomicrografias de baços marcados por IHQ	43
Figura 12- Fotomicrografias de baços dos cães controle.	44
Figura 13- Fotomicrografia de baço de cão com LV.	45
Figura 14- Relação entre proporção de plasmócitos marcados na PALS e na PV de cães com LV.	47
Figura 15- Relação entre porcentagem de plasmócitos específicos e score clínicos dos animais com LV.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas gerais dos cães.	39
Tabela 2 - Quantificação de plasmócitos totais e marcados por imunohistoquímica modificada..	46

LISTA DE ABREVIATURAS

APRIL	<i>A proliferation-inducing ligand</i>
BAFF	<i>B-cell activating factor</i>
BCR	Receptor de célula B
bSLA	Antígeno solúvel de <i>L.infantum</i> biotinilado
CCL	<i>C-C Motif Chemokine Ligand</i>
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
CDR	Região determinante de complementaridade
CXCL	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand</i>
CXCR	<i>C-X-C Motif Chemokine Receptor</i>
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPP®	<i>Dual Path Plataform</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELISPOT	<i>Enzyme-linked immunospot</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
H&E	Hematoxilina e Eosina
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LV	Leishmaniose visceral
PALS	Periarteriolar lymphatic sheath
PB	Polpa branca
PBS	Phosphate Buffered Saline
PV	Polpa vermelha
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RPM	Rotações por minuto
ZM	Zona marginal

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
1.1	LEISHMANIOSE VISCERAL.....	13
1.2	ESTRUTURA E FUNÇÃO DO BAÇO	15
1.3	O BAÇO NA LEISHMANIOSE VISCERAL	16
1.4	IMPORTÂNCIA E FUNÇÃO DOS PLASMÓCITOS	18
1.5	PLASMÓCITOS NAS DOENÇAS CRÔNICAS E INFECCIOSAS	21
1.6	PLASMÓCITOS E RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA LV	21
2.	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	24
2.1	JUSTIFICATIVA	24
2.2	HIPÓTESE	25
3.	OBJETIVOS	26
3.1	OBJETIVO GERAL	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4.	METODOLOGIA E ESTRATÉGIAS DE AÇÃO	27
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	27
4.2	AMOSTRA EXPERIMENTAL	27
4.2.1	Animais	27
4.2.2	Exame clínico e eutanásia	27
4.2.3	Baço	28
4.3	PRODUÇÃO DE ANTÍGENO SOLÚVEL DE <i>L. INFANTUM</i> BIOTINILADO	29
4.4	CONTROLE DA BIOTINILAÇÃO	30
4.5	LIGAÇÃO DOS bSLA À IG DE CÃES.....	31
4.6	IMUNOHISTOQUÍMICA MODIFICADA	31
4.7	QUANTIFICAÇÃO DE PLASMÓCITOS TOTAIS E MARCADOS.....	32
4.8	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	33
4.9	EXPRESSÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5.	RESULTADOS	35
5.1	BIOTINILAÇÃO DE <i>L. infantum</i> E PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS	35
5.2	APRESENTAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS	38

5.3	PLASMOCITOSE NA POLPA VERMELHA E ESPECIFICIDADE DE ANTICORPO.....	40
6.	DISCUSSÃO	48
7.	CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose parasitária, com grande impacto na saúde pública, presente em diversos países do mundo inclusive no Brasil (WHO, 2010). Os cães podem ser acometidos por essa enfermidade e constituem uma importante fonte de infecção para os seres humanos. Essa doença pode cursar de forma grave com a presença de sinais clínicos como emagrecimento progressivo, onicogribose, alopecia, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (READY et al., 2014).

O baço é um importante órgão linfóide secundário e está envolvido na maioria dos casos graves de LV. Dentre as principais alterações histológicas observadas nesse órgão durante o curso da LV, destacam-se: atrofia de folículos linfóides, redução de células dendríticas foliculares e plasmocitose na polpa vermelha (HERMIDA et al., 2018).

Os plasmócitos são o estágio final da diferenciação de células B ativadas, e são eles os principais responsáveis pela produção e secreção de anticorpos (MINGES WOLS, 2006). Em condições normais, poucas dessas células de vida longa são encontradas na polpa vermelha do baço, sendo observadas principalmente em medula óssea, e regiões linfóides do intestino. Porém, já foi observado que nos casos de LV existe uma quantidade exacerbada dessas células na polpa vermelha esplênica (SILVA-O'HARE et al., 2016), e apesar disso, uma grande quantidade de anticorpos séricos respondem inespecificamente a antígenos diversos (SILVA-BARRIOS et al., 2016). Por isso é importante respondermos ao questionamento: Quantas dessas células estão realmente produzindo anticorpos anti-*L.infantum*?

Desta forma, neste trabalho, objetivamos detectar através de uma técnica modificada de imunohistoquímica quantos dos plasmócitos presentes na polpa vermelha do baço são realmente produtores de anticorpos anti-*L.infantum* e como essas células estão distribuídas nesse órgão.

1.1 LEISHMANIOSE VISCERAL

A Leishmaniose visceral (LV) é uma enfermidade parasitária, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete seres humanos e outros mamíferos (WHO, 2010). A doença está presente em quase todos os continentes, e nas Américas o Brasil é responsável por aproximadamente 90% dos casos. A espécie circulante no Brasil é a *Leishmania infantum*, e no ano de 2017 foram diagnosticados mais de 4 mil casos, com uma taxa de letalidade de 8,8% (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Os cães são susceptíveis à infecção e funcionam como o principal reservatório do ciclo urbano da doença (MORENO e ALVAR, 2002; READY, 2014), apesar de recentemente, um estudo realizado por Rissueño e colaboradores (2018) terem demonstrado existir relação próxima de outros mamíferos no ciclo de transmissão urbana na Espanha. No Brasil, a transmissão da LV ocorre de cão para cão, e do cão para o homem, por intermédio do vetor artrópode *Lutzomia longipalpis* (DANTAS-TORRES, 2007).

Durante o repasto sanguíneo das fêmeas do vetor flebotomíneo, macrófagos contendo formas amastigotas do parasito são ingeridos. No intestino do vetor, essas formas amastigotas se desenvolvem em formas promastigotas, em um ciclo chamado digenético. Essas promastigotas são regurgitadas na pele de um novo hospedeiro através da probóscide do flebotomíneo completando o ciclo (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; WHO, 2010).

Uma vez na pele do hospedeiro, os parasitos são fagocitados por macrófagos da derme, desenvolvem-se na forma amastigota e multiplicam-se no interior dessas células (PALTRINIERI et al., 2010), e de acordo com Pinelli e colaboradores (1994) ocorre a distribuição especialmente para o fígado, baço, linfonodos e medula óssea do hospedeiro. Nesses órgãos, considerados nicho de sobrevivência, os parasitos multiplicam-se no interior de macrófagos formando vacúolos

parasitóforos, e podem romper as células liberando amastigotas para infectar novas células.

A doença possui um amplo espectro clínico, podendo cursar de formas assintomática ou sintomática, apresentando emagrecimento progressivo, linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia, onicogrifose, dermatites, anemia, hipergamaglobulinemia e em alguns casos evoluir para a morte (READY et al., 2014). Quando não tratada, a LV pode vir a ser fatal em humanos e em cães, segundo Borja-Cabrera e colaboradores (2008), e os principais fatores associados a essa letalidade são sangramentos e co-infecções (COSTA et al. 2010).

Existem diversos métodos diagnósticos para a LV. Métodos diretos como citologia, achados histopatológicos e clínicos, PCR, cultura do parasito a partir de amostra biológica, xenodiagnóstico, e os métodos indiretos, que contemplam testes sorológicos (ELISA e Imunofluorescência), e teste da resposta imune celular (PALTRINIERI et al., 2010; TRAVI et al., 2018). No Brasil, o diagnóstico de cães positivos é feito com a combinação do DPP[®] como teste de triagem e o ELISA como teste confirmatório (LAURENTI et al., 2014).

O diagnóstico correto e precoce dos cães em áreas endêmicas é essencial para estabelecer planos de controle da doença. Apesar de existir tratamento, geralmente a eutanásia dos animais positivos é a medida de controle adotada no Brasil, uma vez que até mesmo quando assintomáticos, os cães permanecem capazes de transmitir o parasito para os flebotomíneos (BRASIL, 2014; LAURENTI et al., 2013; DANTAS-TORRES et al., 2019).

Entretanto, essa estratégia se mostra controversa e pouco eficaz, uma vez que os proprietários de animais eutanasiados podem inserir novos animais susceptíveis à infecção nessas áreas endêmicas, e também pelo evidente aumento do número de casos nos últimos anos (MORENO e ALVAR, 2002; COSTA et al., 2013; DANTAS-TORRES et al., 2019).

1.2 ESTRUTURA E FUNÇÃO DO BAÇO

O baço é um órgão linfoide secundário, parenquimatoso, que possui função imunológica e também de filtração sanguínea removendo hemácias senescentes da circulação. Esse órgão é suprido pela artéria esplênica, a qual se ramifica em diversas arteríolas centrais. Em observação histológica do tecido é possível dividi-lo em duas áreas conhecidas como polpa branca (PB) e polpa vermelha (PV), e a disposição destas áreas está diretamente relacionada com o bom funcionamento do órgão (SCOTHORNE, 1985; FRY e MCGAVIN, 2012).

A PV é constituída principalmente por fibroblastos, mielócitos, células reticulares, macrófagos, fibras colágenas e elásticas, as quais permitem a contração do órgão, além de alguns linfócitos e plasmócitos em menor número (VAN KRIEKEN, 1997). A disposição das fibras, juntamente com células endoteliais, dificulta a passagem de hemácias senescentes, facilitando a interação com macrófagos locais que irão fagocitar e destruir essas células. Com esse processo, ocorre a reciclagem do ferro presente nos eritrócitos, além de favorecer a identificação e destruição de patógenos presentes na corrente sanguínea, como algumas bactérias (MEBIUS e KRAAL, 2005).

Por possuir essa característica, o baço é um órgão linfoide capaz de realizar a vigilância imunológica para antígenos e patógenos circulantes na corrente sanguínea, função desempenhada pela PB. Essa região é composta predominantemente por células linfoides e organizada em: área em volta da arteríola central conhecida como Bainha Linfoide Periarteriolar (*Periarteriolar Lymphatic Sheats* - PALS), composta majoritariamente por linfócitos T; folículo linfoide, composto principalmente por linfócitos B, esse pode ser subdividido em zona do manto e centro germinativo; zona marginal, uma área de transição entre o folículo e a PV (CESTA, 2006).

Na zona marginal, por ser uma área de grande trânsito sanguíneo, existe a presença de macrófagos, os quais realizam a monitoração e

combate a patógenos intracelulares e sanguíneos, além de linfócitos B e alguns plasmócitos (MEBIUS, NOLTE e KRAAL, 2004).

A estrutura da PB é que permite que os linfócitos T interajam com os linfócitos B e dessa forma induza a expansão clonal de linfócitos B. Por sua vez, os linfócitos B ativados interagem com as células dendríticas apresentadoras de antígeno no centro germinativo e diferenciam-se em plasmoblastos, células precursoras dos plasmócitos. Essas células migram para a polpa vermelha onde podem diferenciar-se em plasmócitos e secretar anticorpos para a corrente sanguínea (MEBIUS e KRAAL, 2005; SZCZEPANEK et al., 2012).

A migração e manutenção dos linfócitos para as zonas correspondentes são dependentes da expressão de quimiocinas específicas para cada tipo celular. Linfócitos B possuem receptores CXCR5 na superfície celular e são atraídos pela quimiocina CXCL13 produzida por células do estroma folicular. Já linfócitos T, necessitam da expressão de quimiocinas, como CCL19 e CCL21, por células do estroma da PALS, o que permite a atração e manutenção dos linfócitos nessa região (MEBIUS e KRAAL, 2005).

1.3 O BAÇO NA LEISHMANIOSE VISCERAL

Ao sofrer alguma injúria, o baço pode responder de diversas maneiras, como hiperplasia das células na PV, congestão ou contração excessiva para liberar eritrócitos, até mesmo hiperplasia da polpa branca com aumento da estimulação antigênica com posterior atrofia (FRY e MCGAVIN, 2012).

Durante o curso da LV, o baço, assim como fígado, medula óssea e outros órgãos linfoides podem apresentar-se intensamente parasitados. Entretanto, o baço é o órgão envolvido em todas as formas de LV, apresentando alterações histológicas significativas que impactam na função desempenhada por ele (HERMIDA et al., 2018).

Em um estudo realizado por Veress e colaboradores (1977), foi observado que pacientes humano com LV apresentavam uma grande redução nas áreas da polpa branca, e essa redução era também acompanhada pela diminuição de linfócitos e o aparecimento de necrose e fibrose tecidual, e sugeriram que no curso da LV, as alterações no órgão constituem-se de uma inicial hiperplasia, seguida de atrofia de compartimentos e degeneração celular.

Essas alterações foram observadas posteriormente por Smelt e colaboradores (1997), que mostraram a destruição de células dendríticas foliculares e desestruturação de folículos linfoides em camundongos infectados com *L. donovani*. Os autores sugeriram que alterações da polpa branca esplênica associada à leishmaniose poderiam resultar na ativação inadequada de linfócitos B nos folículos, com liberação dessas células na circulação e produção excessiva de plasmócitos. De fato, a plasmocitose esplênica é um achado frequente na LV e geralmente associado à desorganização do tecido linfoide (SILVA-O'HARE et al., 2016).

Santana e colaboradores (2008), em um estudo com cães naturalmente infectados, encontraram que 56% dos cães infectados e potencialmente susceptíveis à infecção possuíam algum grau de desestruturação na polpa branca esplênica. Nesse estudo, observaram que o baço variava de organizado, com sub-regiões da PB bem definidas à desorganizado, em que já não havia distinção clara entre as regiões da PB e PV. Recentemente essas alterações foram revisadas por Hermida e colaboradores (2018) classificando-as então em três tipos: Baço organizado, ou tipo I; baço moderadamente desorganizado ou tipo II; baço desorganizado ou tipo III. O baço desorganizado foi relacionado ao maior parasitismo esplênico e sintomatologia clínica mais grave em cães naturalmente infectados (LIMA et al., 2014; CAVALCANTI et al., 2015).

Essa desestruturação na conformação esplênica é provocada por alterações na expressão de quimiocinas, observado por Silva e colaboradores (2012) que cães que apresentavam grau de desestruturação esplênica, comparados a cães que possuíam o baço

organizado, possuíam menor expressão da quimiocina CXCL13, com isso, há uma incapacidade de manutenção dos linfócitos B no folículo linfoide.

Além das alterações ocorridas nos folículos linfoides esplênicos, a zona marginal também sofre alterações na sua conformação. Ato e colaboradores (2004) demonstraram experimentalmente em camundongos que durante o curso da leishmaniose visceral ocorre uma redução na expressão de quimiocinas como a CCL19 e CCL21, quimiocinas importantes para formação da ZM.

A função imunológica dos órgãos linfoides secundários, como é o caso do baço, é mantida pela manutenção da estrutura bem organizada do órgão (BORGES-DA-SILVA et al., 2015). Por isso, quando ocorre a desestruturação dos ambientes esplênicos, como na leishmaniose visceral, a função imunológica do órgão fica comprometida, possivelmente levando ao aumento de susceptibilidade à doença e ao aparecimento de infecções oportunistas (HERMIDA et al., 2018).

Além das alterações imunológicas e estruturais, o baço durante o curso da LV pode apresentar uma condição conhecida como hiperesplenismo, com sequestro de hemácias, plaquetas e leucócitos. Essa retenção leva ao aparecimento de anemias, hemorragias e co-infecções, umas das principais causas de morte na LV (VARMA e NASEEM, 2010; COSTA et al., 2010).

1.4 IMPORTÂNCIA E FUNÇÃO DOS PLASMÓCITOS

Os plasmócitos são células correspondentes a um dos estágios finais da diferenciação de células B ativadas e os principais responsáveis pela produção e secreção de anticorpos (MINGES WOLS, 2006). Essas células podem ser divididas em dois subtipos: plasmócitos de vida longa, responsáveis pela produção e manutenção de níveis séricos de anticorpos, e plasmócitos de vida curta, responsáveis principalmente pela produção inicial e local de anticorpos (SZYSZKO et al., 2011).

No processo de ativação das células B T-dependentes, uma vez que os linfócitos B reconheçam antígenos através do BCR, esses podem ser ativados com auxílio de linfócitos T auxiliares e proliferar dando origem a múltiplas células B com diferentes BCR's. Após hipermutação somática, que modificam as regiões determinantes de complementaridade (Complementarity determining region – CDR's) das imunoglobulinas para melhor adequarem-se ao antígeno, ocorre seleção pela capacidade de ligar-se aos antígenos apresentados pelas células dendríticas foliculares. Ocorrendo ligação de alta especificidade e afinidade, ocorre a diferenciação de células B em plasmoblastos, do contrário, essas células entram em apoptose (HIEPE et al., 2011), esse processo está ilustrado na figura 1.

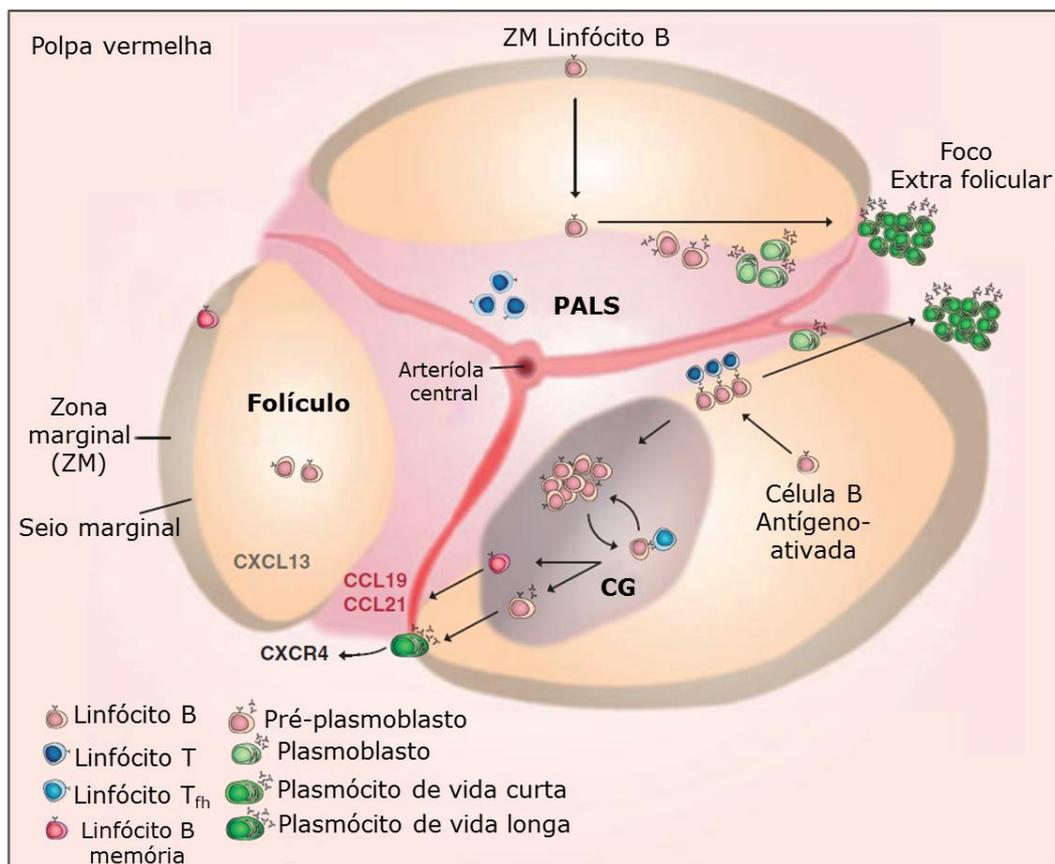


Figura 1- Esquema ilustrativo da diferenciação dos linfócitos B. Os linfócitos B da zona marginal (ZM) podem ser ativados por antígenos circulantes na corrente sanguínea, adentrar ao folículo em direção a Bainha linfóide Peri arteriolar (PALS), proliferar e diferenciar em plasmócitos de vida curta em focos extrafoliculares. Além disso, os linfócitos B ativados podem interagir com linfócitos T na PALS, adentrarem ao Centro Germinativo (CG), interagir com linfócitos T auxiliar (T_{fh}) ou células dendríticas e diferenciar em Linfócitos B de memória, ou plasmoblastos. (Adaptado de ORACKI et al., 2010)

Após a seleção, os plasmoblastos aumentam gradativamente a expressão de CXCR4, receptor para a quimiocina CXCL12, e migram em direção à PV, passando pela PALS. Uma vez na PV, podem maturar dando origem a plasmócitos em focos extrafoliculares ou podem migrar para medula óssea e se diferenciarem em plasmócitos de vida longa (HARGREAVES et al., 2001; TARLINTON et al., 2008). Os plasmócitos são mantidos em nichos de sobrevivência, como na medula óssea, por meio da sinalização de citocinas como CXCL12, APRIL, BAFF e IL6, secretadas por células estromais e eosinófilos. Na ausência dos dessas citocinas, denominadas fatores de sobrevivência, os plasmócitos entram em apoptose (NUTT et al., 2015).

Em condições de higiene, apenas alguns plasmócitos permanecem na polpa vermelha do baço ou na região extrafolicular de outros órgãos linfoides secundários. Os plasmoblastos podem também se diferenciar em plasmócitos de vida curta e acumular temporariamente em locais de inflamação, ou no caso de doenças autoimunes (SZYSZKO et al., 2011; CHU e BEREK, 2013; KHODADADI et al., 2019).

A produção de anticorpos pode ser mantida por longos anos graças a esse mecanismo de sobrevivência dos plasmócitos de vida longa, conferindo proteção ao indivíduo em caso de segundo contato com o antígeno (MINGES WOLS, 2006). E é também devido à manutenção da secreção de anticorpos que essas células são importantes na patogenia de doenças autoimunes como Lúpus e doença celíaca (SZYSZKO et al., 2011; DI NIRO et al., 2012; HIEPE e RADBRUCH, 2016).

Em cortes histológicos corados em hematoxilina e eosina é possível diferenciar plasmócitos de linfócitos. Os plasmócitos apresentam-se como células com maior relação citoplasma/núcleo, citoplasma acidófilo e corado em tons de roxo, com núcleo condensado e excêntrico, além disso, apresentam uma região clara próxima ao núcleo correspondente ao Complexo de Golgi, que é proeminente devido à produção e secreção de anticorpos (MINGES WOLS, 2006).

1.5 PLASMÓCITOS NAS DOENÇAS CRÔNICAS E INFECCIOSAS

Em algumas doenças crônicas, infecciosas ou autoimunes, a inflamação e persistência antigênica criam condições que favorecem a sobrevivência dos plasmócitos nesses sítios inflamatórios (MALLISON et al., 1991; MIZUTANI et al., 2009; SLOCOMBE et al., 2013). Em doenças autoimunes, como Lupus eritematoso, esclerose múltipla ou artrite reumatoide, os plasmócitos participam da patogênese ao secretar grandes quantidades de auto-anticorpos.

Já foi observado que camundongos com encefalomielite autoimune experimental apresentavam o aumento da expressão de CXCL12 nas áreas inflamadas do sistema nervoso central e vasos sanguíneos adjacentes, além do aumento da expressão de fatores de sobrevivência para os plasmócitos, como VCAM-1, APRIL, BAFF, pelas células locais (POLLOK et al., 2017). Uma vez nos tecidos, essas células permanecem por longos períodos contribuindo para a manutenção da inflamação.

Além disso, em algumas doenças crônicas inflamatórias, um mecanismo conhecido como "*Epitope spreading*", contribui significativamente na progressão da doença. Nesse processo, a destruição tecidual provocada pela resposta imunológica leva à liberação de auto-antígenos e ativação de células B, culminando com a diferenciação dessas células em plasmócitos auto-reativos (VANDERLUGT e MILLER, 1996; MATSUMOTO, PARK e KOHYAMA, 2007; CORNABY et al., 2015).

Em doenças infecciosas, como em infecções por *Salmonella*, os plasmócitos não somente secretam imunoglobulinas (IgG, IgA ou IgM), mas também algumas citocinas como IL-10 e IL-35. Essas citocinas possuem papel imunossupressor e atuam favorecendo a persistência da infecção (FILLATREAU, 2015).

1.6 PLASMÓCITOS E RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA LV

A LV é uma doença de caráter crônico que cursa com alterações imunológicas, em que, em alguns casos o paciente não consegue estabelecer resposta imunológica adequada, e pode vir a óbito principalmente por sangramentos e co-infecções bacterianas (COSTA et al. 2010).

Em um estudo realizado por Silva-O'Hare e colaboradores (2016), cães com LV e que apresentavam baço desorganizado, conforme a classificação de Santana e colaboradores (2008), eram também os que apresentavam intensa plasmocitose na PV esplênica, além de níveis de IgG elevados, em comparação aos cães de baço organizado. A persistência dos plasmócitos no baço pode ser explicada pelas alterações estruturais observadas, assim como aumento de quimiocinas como BAFF e APRIL, importantes na sobrevivência e migração de plasmoblastos (GOTO et al., 2014; OMACHI et al., 2017).

Apesar da grande quantidade dessas células no baço, ao avaliar a especificidade dos anticorpos séricos encontrados no soro desses animais, observou-se que havia uma tendência de aumento na quantidade de anticorpos inespecíficos nos animais com baço desorganizado, sugerindo ativação inespecífica das células B (SILVA O'HARE et al., 2016). Essa produção inespecífica de anticorpos pode ser explicada por uma condição conhecida como ativação policlonal de linfócitos B, e já foi descrita em outras infecções causadas por vírus, bactérias, e protozoários como alguns tripanossomatídeos (MONTES et al., 2002; DEAK et al., 2010).

Na ativação policlonal, moléculas dos patógenos funcionam como mitógenos para célula B, induzindo a proliferação e expansão policlonal independente da especificidade do BCR. Assim, múltiplos clones de células B se diferenciam e dão origem a células secretoras de anticorpos com as mais diversas especificidades, inclusive com a produção de auto-anticorpos (REINA-SAN-MARTÍN, COSSON e MINOPRIO, 2000).

Na LV, a expansão policlonal de linfócitos B está relacionada com aumento da susceptibilidade, e com a hipergamaglobulinemia (SILVA-BARRIOS e STÄGER, 2019). A hipergamaglobulinemia é responsável pela

formação de complexos imunes, que podem se depositar nos túbulos renais, e em capilares, provocando alterações renais (GIUNCHETTI et al., 2019).

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

2.1 JUSTIFICATIVA

A detecção de plasmócitos possibilita aprimorar o entendimento de aspectos imunológicos de doenças infecciosas, diagnosticar doenças autoimunes e até mesmo verificar efetividade de protocolos de vacinas. Para isso, existem diversas técnicas para a identificação de plasmócitos e para qual antígeno esses produzem anticorpos, como a técnica de ELISPOT e citometria de fluxo (ODHENDAHL et al., 2005). Entretanto, essas técnicas não permitem que sejam avaliadas a distribuição no tecido e a especificidade de anticorpos produzidos, ao mesmo tempo.

Mizutani e colaboradores (2014), utilizando uma técnica similar a imunohistoquímica (MIZUTANI et al., 2009), conseguiram detectar plasmócitos produtores de anticorpos específicos na doença periodontal em tecido congelado de biópsia. Essa técnica, não só permitiu que fosse feita a detecção da especificidade dos plasmócitos, mas também verificar a localização no tecido histológico, possibilitando fazer inferências da participação dessas células no processo inflamatório. Porém, até o momento, essa técnica não foi utilizada em estudos com doenças parasitárias.

Sabemos que durante a LV, observa-se uma elevação na globulina sérica dos animais e seres humanos, e que essa elevação está relacionada ao perfil clínico mais grave. Além disso, observa-se um acúmulo de plasmócitos na PV do baço relacionada com a desorganização dos microambientes de PB. Como os plasmócitos são as células responsáveis pela secreção de anticorpos, é possível que a plasmocitose observada contribua para o agravamento da LV.

Tendo em vista a importância dos plasmócitos na evolução da LV e o fato de até o momento a especificidade dessas células não ter sido verificada, assim como a frequência dessas células que efetivamente produzem anticorpos para antígenos de *L. infantum* no tecido esplênico,

acreditamos que utilizando a técnica descrita por Mizutani e colaboradores (2009), será possível identificar os plasmócitos produtores de anticorpos anti-*L. infantum*. Assim, poderemos acessar informações como qual a real proporção de plasmócitos presentes no baço que produzem anticorpos anti-*L. infantum* durante a LV e se esses plasmócitos que se acumulam na PV contribuem para o perfil de doença mais grave.

2.2 HIPÓTESE

A nossa hipótese é que uma a maioria dos plasmócitos presentes no baço de cães com LV não é específica para antígenos de *Leishmania* e que utilizando a técnica modificada de imunohistoquímica será possível identificar a células produtoras de anticorpos anti-*L. infantum* e determinar a proporção destas no baço de cães com LV.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar técnica de identificação de plasmócitos produtores de anticorpos específicos para *L.infantum* e estimar a proporção desses plasmócitos no baço de cães com LV.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Produzir antígeno biotinilado de *L.infantum*, para marcação em imunohistoquímica;
2. Determinar a densidade de plasmócitos na polpa vermelha do baço de cães com LV;
3. Padronizar uma técnica de imuno-histoquímica modificada para detecção de plasmócitos específicos;
4. Identificar plasmócitos produtores de anticorpos específicos para *L.infantum* em tecido esplênico;
5. Estimar a densidade de plasmócitos que produzem anticorpos específicos para *L. infantum* nos diferentes compartimentos esplênicos.

4. METODOLOGIA E ESTRATÉGIAS DE AÇÃO

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

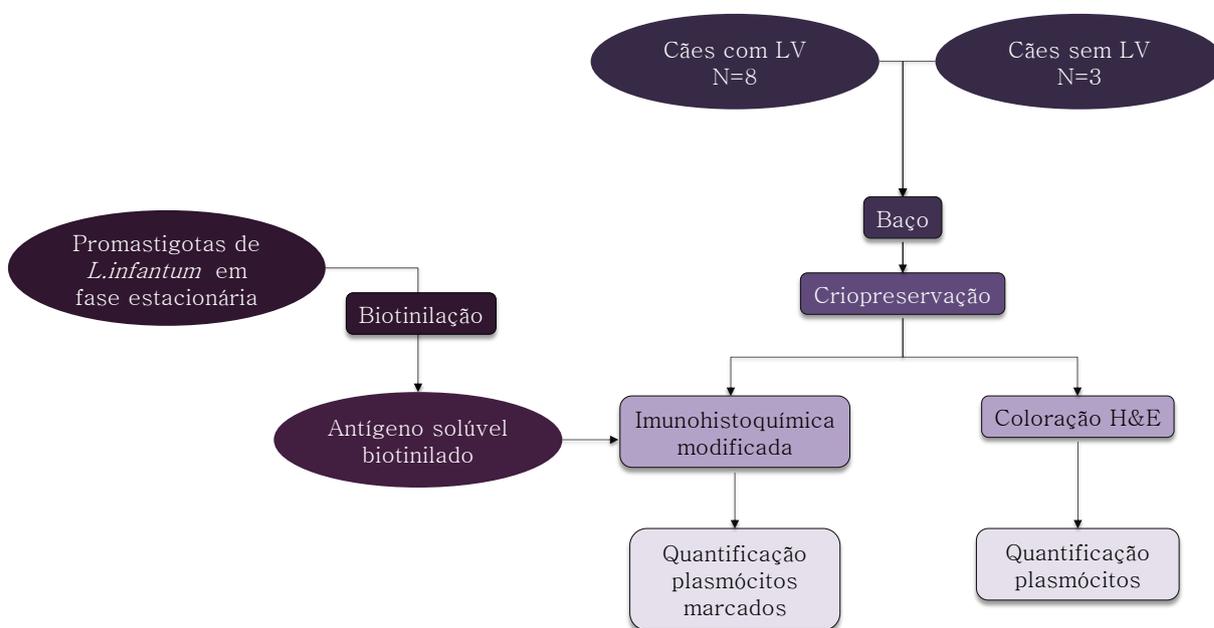


Figura 2 - Desenho esquemático do delineamento experimental

4.2 AMOSTRA EXPERIMENTAL

4.2.1 Animais

Foram obtidos oito cães oriundos de área endêmica da cidade de Camaçari-Ba e com leishmaniose visceral canina. Esses animais foram voluntariamente entregues ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de Camaçari-BA, com resultados positivos de ELISA e DPP®, realizados pelo Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-BA). Como animais controle, três cães oriundos do canil de experimentação da Fiocruz-Ba foram utilizados.

4.2.2 Exame clínico e eutanásia

Os animais foram submetidos ao exame clínico e classificados de acordo com a ficha de avaliação clínica descrita por Solcà e colaboradores (2016). Oportunamente, foi coletado o sangue para obtenção de soro, feita anestesia geral utilizando 0,05mL de cloridrato de xilazina + 0,15mL

de cetamina por kg e a eutanásia com dose letal de solução supersaturada de cloreto de potássio injetado por via intracardíaca.

4.2.3 Baço

Após a eutanásia, foram coletados três fragmentos de baço conforme o esquema mostrado na Figura 3:

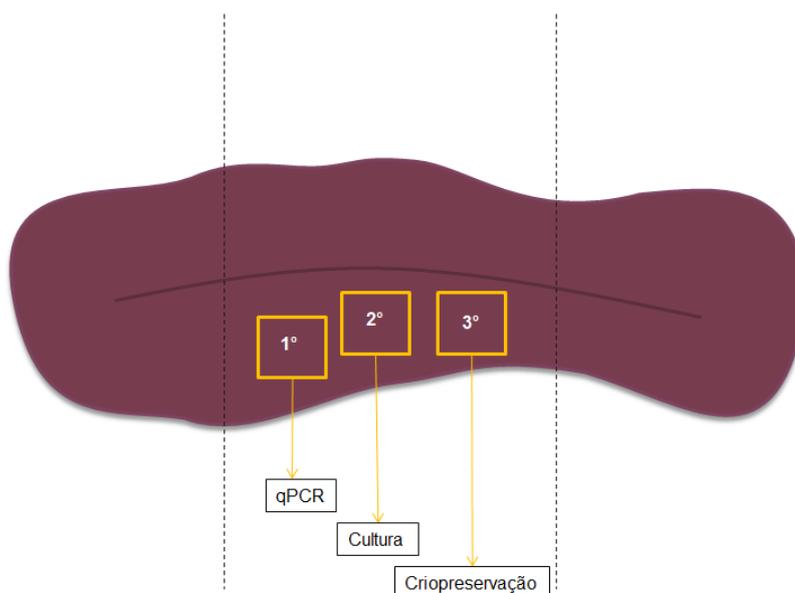


Figura 3. Desenho esquemático da coleta dos fragmentos no baço dos cães.

- O primeiro fragmento foi retirado do terço médio do órgão, com aproximadamente 10 X 10 X 2 mm e acondicionado em tubos eppendorff contendo 1mL de RNA Later. Após 24 horas na geladeira, o RNA Later foi removido e o tecido congelado em nitrogênio líquido até utilização para qPCR.
- O segundo fragmento foi retirado do terço médio, com aproximadamente 1 X 1 X 1 cm, e acondicionado em tubo contendo solução salina. Esse fragmento foi utilizado para isolamento de *Leishmania* em cultura.
- O terceiro fragmento foi retirado do terço médio do órgão, contendo cápsula, com aproximadamente 10 X 10 X 3 mm e acondicionado em paraformaldeído 4% por 4 horas a 4°C. Após esse período, o fragmento foi acondicionado em tubo contendo sacarose 10%, por 4 horas a 4°C. Passado esse tempo, o fragmento foi transferido para

um tubo contendo 15% de sacarose e armazenado na geladeira overnight. Então, o fragmento foi transferido para tubo contendo sacarose 25%, e armazenado por 4 horas a 4°C. Em seguida, foi acondicionado em Tissue Tek[®], congelado em vapor de nitrogênio líquido, e armazenado à -80°C até utilização para coloração em H&E e imuno-histoquímica.

4.3 PRODUÇÃO DE ANTÍGENO SOLÚVEL DE *L. INFANTUM* BIOTINILADO

Cepas de *L. infantum* foram cultivadas *in vitro* em meio Schneider contendo 20% de soro fetal bovino, por aproximadamente 4 a 5 dias, quando alcançaram a fase estacionária de cultivo. A cultura foi transferida para tubo de polipropileno de 50 mL e submetida à centrifugação (3000 rpm, 4°C por 10 minutos), descartado o sobrenadante e o pellet ressuspense em HBSS. Esse procedimento foi repetido por mais 3 vezes, sendo que após a última lavagem, foi realizada a contagem de *Leishmania* em câmara de Neubauer.

Ajustada a concentração para $1,6 \times 10^8$ *Leishmania*/mL em PBS, separamos a suspensão em dois tubos com aproximadamente 5mL cada, um para submeter os parasitos à biotinição e o outro para manter os parasitos que serviram para controle experimental. Esses tubos foram novamente centrifugados conforme descrito acima e descartado o sobrenadante.

No tubo para biotinição, o pellet foi ressuspense em uma solução contendo 30mg de Biotina + 450µL de DMSO em 15mL de PBS. Então foi incubado por 1 hora em estufa de CO₂ à 37°C. Após a incubação, o material foi centrifugado a 2400 rpm, 4°C, por 10 minutos para obtenção do pellet. Esse foi lavado três vezes com PBS + 5% de BSA, nas mesmas condições anteriores e então foi realizada uma nova contagem dos parasitos.

Para a obtenção do antígeno solúvel de *L. infantum* biotiniado (bSLA), foi adicionado tampão de lise (NP40 +Tris/HCl + EDTA) no volume

semelhante ao volume do pellet, homogeneizado, colocado em agitador por 10 minutos. Após esse período, o conteúdo foi centrifugado por 3 minutos, 2000 RPM à 4°C. Todo o conteúdo foi transferido para um tubo eppendorf de 1,5mL e novamente centrifugado à 13000 RPM, 4°C por cinco minutos. O sobrenadante foi aliquoteado, identificado como "1º lisado do antígeno biotinilado". O pellet foi novamente ressuspensão em volume semelhante com tampão de lise e centrifugado novamente. O sobrenadante foi aliquoteado e identificado como "2º lisado do antígeno biotinilado". Todas as alíquotas foram armazenadas à -20°C até utilização.

Procedimento semelhante foi realizado para produção de antígenos biotinilados de macrófagos de linhagem murina J774. Esses antígenos foram utilizados como controle negativo da reação de imunohistoquímica.

4.4 CONTROLE DA BIOTINILAÇÃO

Para o controle da biotinilação, foi realizada citocentrifugação dos parasitos e das células J774 em lâminas para imunofluorescência utilizando Cytospin™ (Thermo Scientific, EUA). Para cada tubo (biotinilado ou controle) foram adicionados 100µL da suspensão por poço, centrifugado a 500 x g por 5 minutos e repetido o processo totalizando dois *spots* para cada lâmina. Essas lâminas foram fixadas em acetona gelada e armazenadas à -20°C até utilização.

As lâminas foram descongeladas no momento do uso, e hidratadas em PBS 1x. A estreptavidina conjugada ao FITC foi diluída em PBS 1x na concentração final de 5µg/mL, então se adicionou 50µL em cada *spot* e incubou-se por 1 hora em câmara úmida na temperatura ambiente. Após a incubação, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS 1x, montadas com VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium com DAPI e analisadas em microscópio invertido de fluorescência.

4.5 LIGAÇÃO DOS bSLA À IG DE CÃES

Utilizou-se a técnica de Dot Blot para verificar a ligação do antígeno biotinilado à imunoglobulina de cães naturalmente infectados por *L.infantum* e determinar a diluição do antígeno a ser utilizada nas reações de imunohistoquímica. Para isso, imunoglobulinas de soro de cães de área endêmica com alta e baixa titulação sérica para *L.infantum* foram impregnadas em membrana de nitrocelulose utilizando bomba a vácuo.

Foram feitas diferentes diluições das imunoglobulinas em PBS 1x, com concentrações de 40µg, 20µg e 10µg por mL. Após a etapa de impregnação, verificou-se a formação dos *spots* na membrana de nitrocelulose pela coloração com Vermelho de Ponceau. Prosseguiu-se com as lavagens com PBS + Tween20 0,05% e bloqueio dos sítios de ligações inespecíficos com solução de PBS + 5% de leite desnatado por 2 horas na temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas com bSLA em diferentes concentrações (1:50 e 1:100), diluídos em PBS + 5% leite desnatado + Tween20 0,05%, pelo período de 1 hora em temperatura ambiente.

Terminada a incubação com o bSLA e as lavagens com PBS + 5% de leite desnatado, foi feita a incubação com a Streptavidina-HRP diluída a 2µg/mL em PBS + 5% de leite desnatado por 1 hora à TA. Então, a membrana foi lavada com PBS e revelada com solução de Tris-HCl 0,05M + 0,06% de DAB + 0,002% de H₂O₂ até visualização dos spots. A reação foi parada com lavagens em água destilada.

4.6 IMUNOHISTOQUÍMICA MODIFICADA

Com o objetivo de identificar células produtoras de anticorpos anti-*L.infantum* em tecido esplênico de cães, foi realizada uma técnica de imunohistoquímica modificada de acordo com a revisão feita por Mizutani e colaboradores (2016), adicionadas as padronizações necessárias.

Inicialmente, fragmento de baço congelado em Tissue Tek[®] foi cortado em fragmentos de 3-4µm de espessura e as secções colocadas em lâminas de vidro silanizadas e armazenadas a -20°C até a utilização.

As lâminas foram descongeladas a temperatura ambiente e então foram hidratadas em água corrente por 5 minutos. Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena imergindo as lâminas em solução contendo 0.3% de peróxido de hidrogênio + metanol por 30 minutos. As lâminas foram lavadas em PBS 1x e imersas em solução TBS 0,05 M, pH 7,6 com 5 µg/mL de proteinase K por 15 minutos na temperatura ambiente. Foi feita a lavagem com PBS 1X, pH 7,2, e então adicionado 50µL do bSLA, em cada secção, na diluição 1:100 e incubado por 1 hora em temperatura ambiente.

Depois de incubadas, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS1X, e incubadas com Streptavidina-HRP 2µg/mL por mais 1 hora a temperatura ambiente. Repetido o procedimento de lavagens, foi realizada a coloração com solução contendo 0,05M Tris-HCl, pH 7,6, 0,02% DAB e 0,006% de peróxido de hidrogênio. Revelada a coloração, as lâminas foram lavadas em água corrente, os núcleos contra corados com hematoxilina, desidratadas em gradiente de etanol, penetradas em xilol e montadas com Bálsamo do Canadá.

4.7 QUANTIFICAÇÃO DE PLASMÓCITOS TOTAIS E MARCADOS

As lâminas de imunohistoquímica e coradas em H&E foram fotografadas em aumento máximo de 400X pelo equipamento (Virtual Slide Microscopy VS120, Olympus, Japan). As imagens obtidas foram visualizadas através do software Image-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics).

A contagem de plasmócitos totais foi realizada em 5 campos aleatórios da polpa vermelha, considerando as células com morfologia característica de plasmócitos: citoplasma levemente acidófilo, núcleo deslocado para a periferia da célula e área clara próximo ao núcleo correspondente ao complexo de Golgi. Foi calculada a média de células

quantificadas, e o valor encontrado foi dividido pela área total da foto em mm^2 , sendo o valor representado em células/ mm^2 para cada animal.

Procedimento semelhante foi realizado para quantificação de plasmócitos marcados na imunohistoquímica, sendo consideradas positivas as células com morfologia característica de plasmócitos e coradas em marrom-castanho, correspondente a coloração do DAB. O valor dessas células também foi expresso em células/ mm^2 .

4.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os procedimentos envolvendo animais vivos, realizados neste trabalho, não violam as rotinas propostas no manual de vigilância e controle de leishmaniose visceral (BRASIL, 2014). Foram conduzidos de acordo com a Lei No. 11.794, relativa à experimentação com animal (BRASIL, 2008) e com as diretrizes da Fundação Oswaldo Cruz para pesquisa com animais (<http://sistemas.cpqam.fiocruz.br/ceua/hiceuaw000.aspx>). Este trabalho fez parte do projeto "Desenvolvimento de testes baseados na resposta imune celular para a identificação de cães infectados com *Leishmania* para a definição de resistência e susceptibilidade de gravidade na leishmaniose visceral", aprovado pelo comitê de ética para o uso de animais em pesquisa (CPqGM-FIOCRUZ, CEUA, licença N.017/2017).

4.9 EXPRESSÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em valores numéricos absolutos e relativos, em tabelas e gráficos, quando adequado, utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software). O valor da significância estatística das diferenças observadas entre os grupos foi determinado através de testes paramétricos de comparação de médias (ANOVA), para número de células por área definida, por exemplo. Para variáveis categóricas, semiquantativas ou de distribuição não gaussiana, foi

utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Diferenças entre proporções foram analisadas utilizando-se o teste do Qui-quadrado, ou o teste exato de Fisher, quando recomendado. O valor crítico para significância dos resultados foi estabelecido para $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 BIOTINILAÇÃO DE *L. infantum* E PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS

Após a etapa de biotinilação e a reação de imunofluorescência, verificou-se que havia a marcação positiva apenas nas promastigotas de *L. infantum* que passaram pelo processo de biotinilação (figuras 4 e 5). É possível observar a morfologia característica do parasito, com ligação da biotina em toda superfície externa, inclusive no flagelo (Figura 4A).

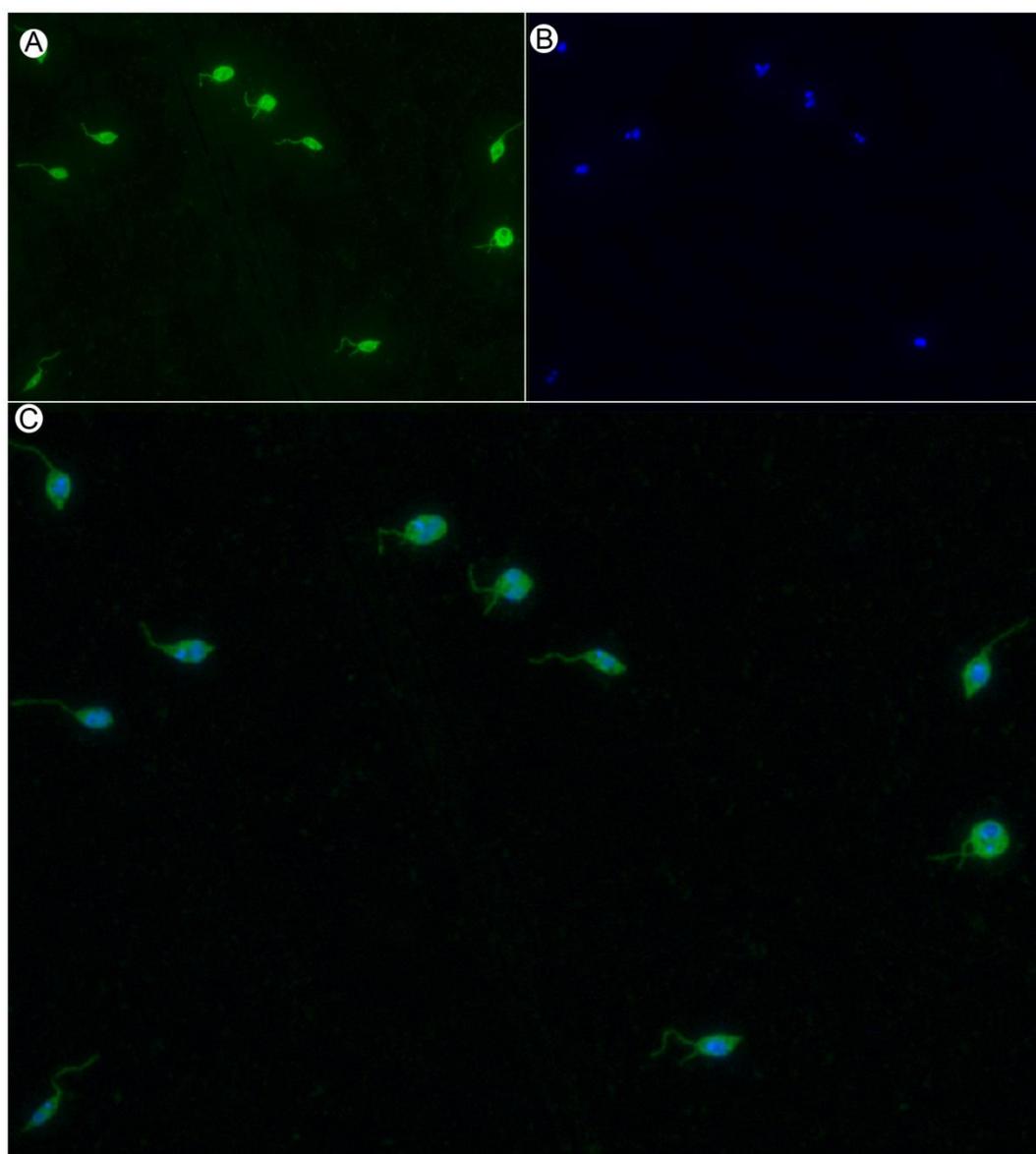


Figura 4. *L. infantum* em fase estacionária de cultivo *in vitro* biotiniladas observadas em aumento de 400x em microscopia de fluorescência. A- FITC; B- Núcleos corados com DAPI; C- Sobreposição das imagens A e B.

Na reação de imunofluorescência para as *L.infantum* não biotiniladas (figura 5) é possível observar apenas autofluorescência, porém sem morfologia definida como observado nas *L.infantum* biotiniladas.

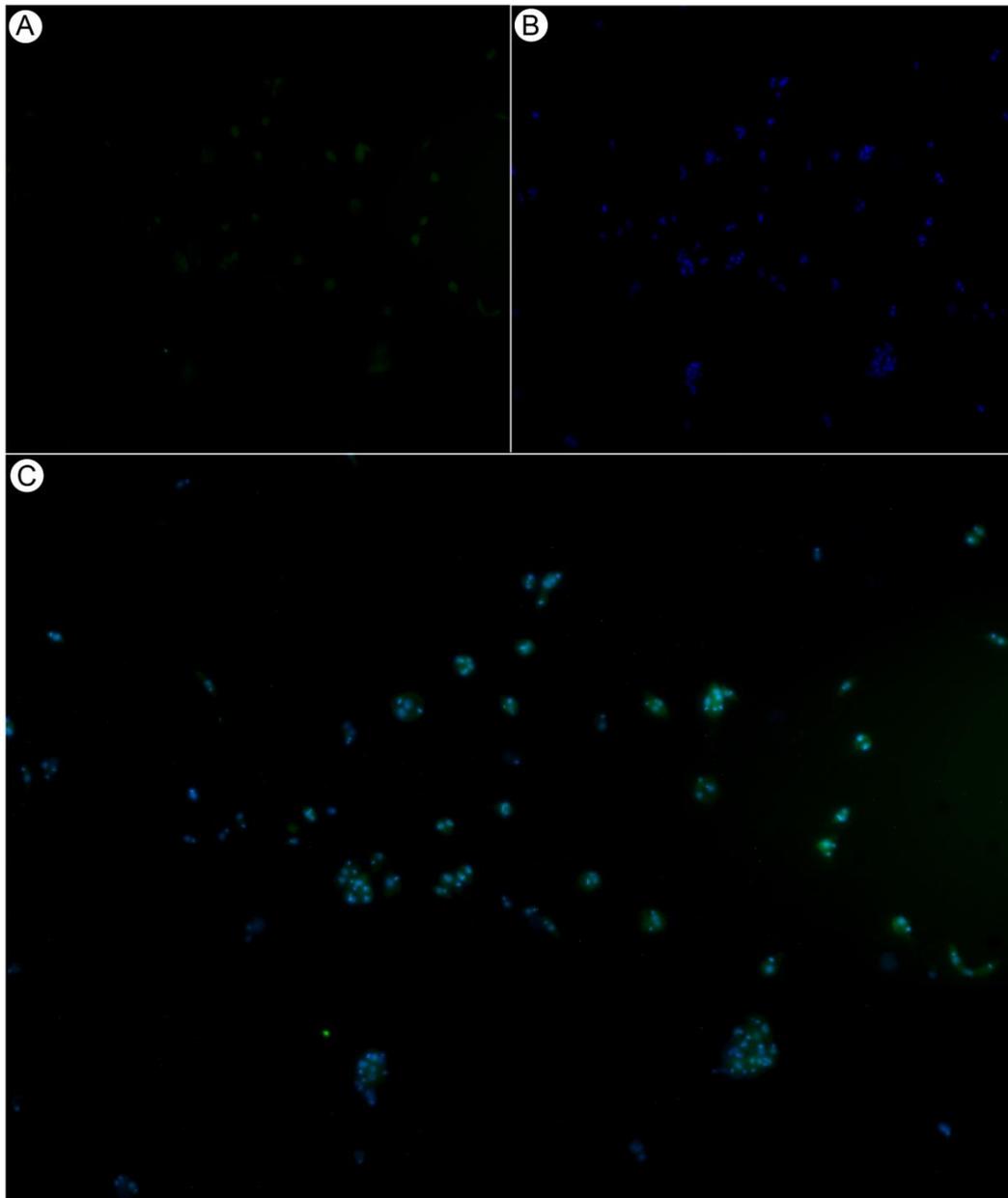


Figura 5. *L.infantum* em fase estacionária de cultivo in vitro sem biotinilar observadas por microscópio de fluorescência. Aumento de 400x. A- FITC; B- Núcleos corados com DAPI; C- Sobreposição das imagens A e B.

Padrão semelhante foi observado na marcação das células J774, em que apenas as células biotiniladas apresentaram fluorescência (figura 6).

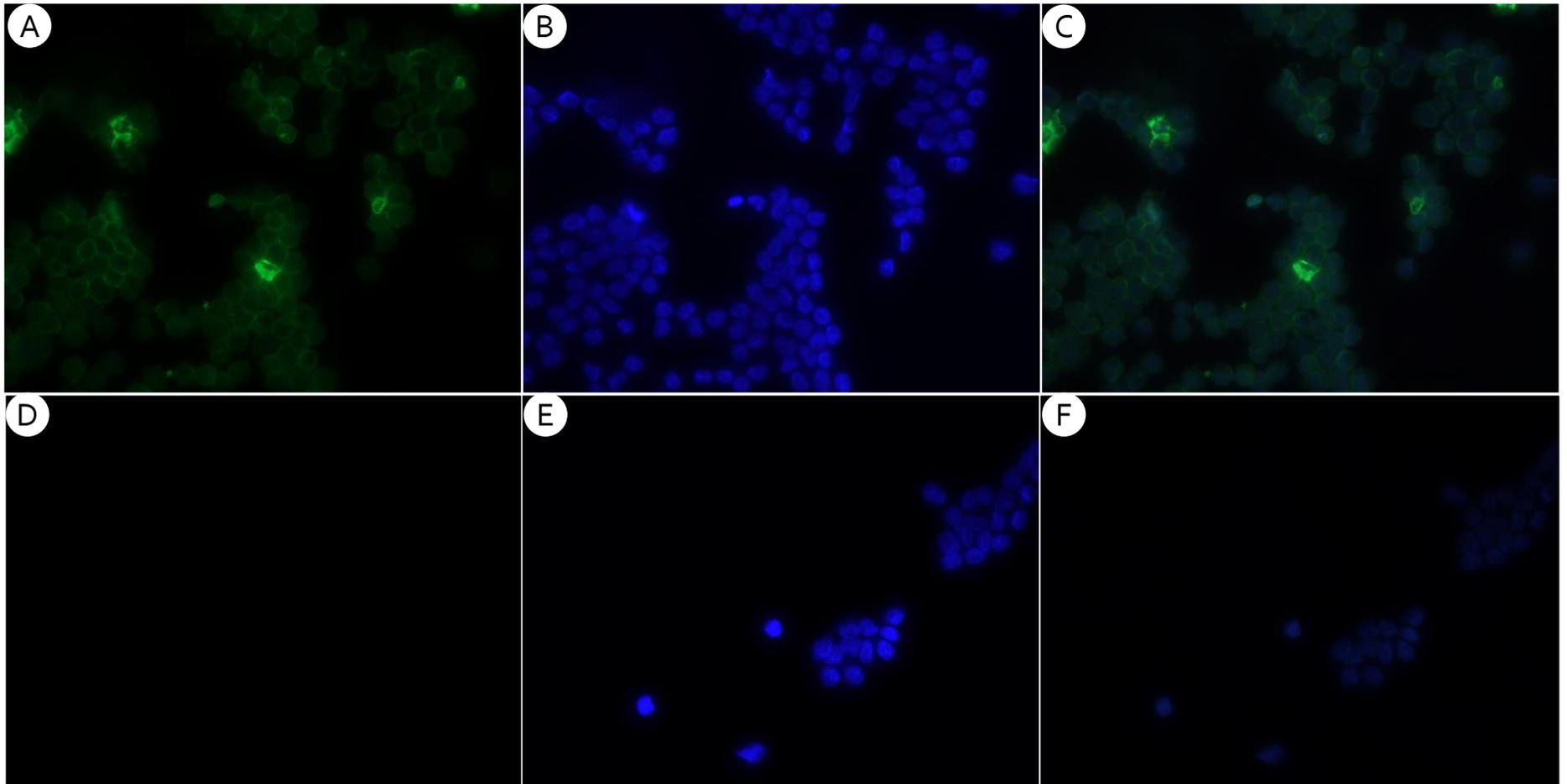


Figura 6- Macrófagos de linhagem J774. As imagens A, B e C correspondem as células biotiniladas coradas com FITC (A), DAPI (B) e sobreposição das imagens (C). As imagens D, E e F correspondem as células sem estar conjugadas a biotina coradas com FITC (D), DAPI (E) e sobreposição das imagens (F). Observar que apenas as células biotiniladas foram positivas na imunofluorescência com streptavidina-FITC. Aumento de 400x.

Uma vez produzido o bSLA, a confirmação da ligação do antígeno biotinilado com imunoglobulinas de cães naturalmente infectados foi feita com a reação de Dot Blot.

Observamos que houve coloração apenas nos spots em que havia imunoglobulinas de cão positivo para LV e com alto título de anticorpos no soro (figura 7). Além disso, foi possível definir a melhor diluição do bSLA para utilização nas reações de imunohistoquímica modificada em 1:100, uma vez que havia formação de cor mesmo em diluições menores de imunoglobulinas.

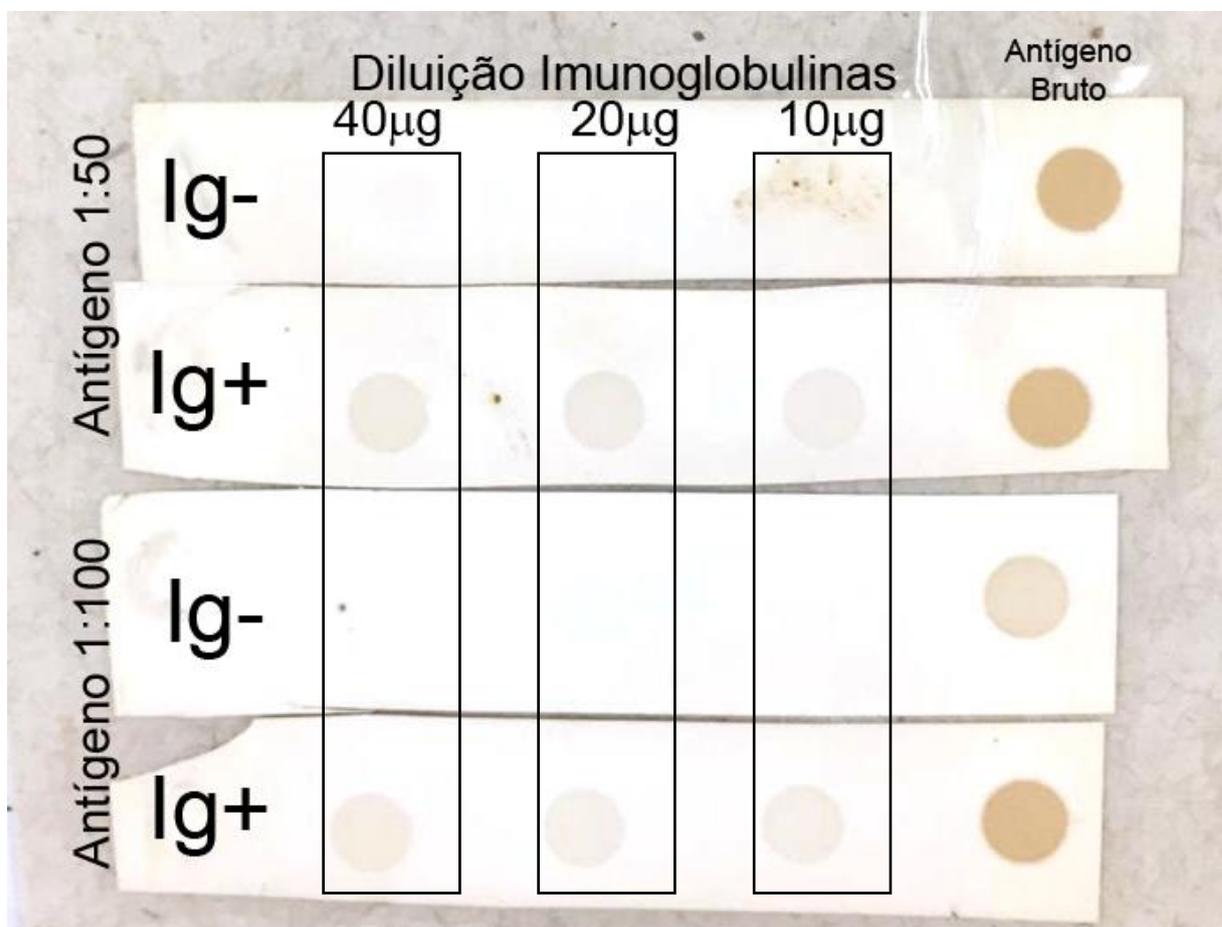


Figura 7- Titulação do antígeno biotinilado utilizando reação de Dot Blot. Imunoglobulinas de cães com alto título (Ig+) e baixo título (Ig-) de anticorpos para *L.infantum* foram impregnadas em membrana de nitrocelulose. Antígenos biotinilados de *L.infantum* foram diluídos em 1:50 e 1:100. Como controle positivo foi impregnado antígeno bruto biotinilado de *L.infantum*.

5.2 APRESENTAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS

Todos os animais oriundos do Centro de Controle de Zoonoses, Camaçari-Ba foram positivos no ELISA e na cultura do macerado

esplênico. Além disso, ao exame clínico, os animais apresentaram em sua maioria sinais clínicos que variaram de brandos a intensos, prevalecendo conjuntivite, crostas na orelha, emagrecimento, mucosas hipocoradas e onicogribose (Tabela 1). Além desses, outros sinais como linfadenopatia, dermatite, alopecia, esplenomegalia e hiperqueratose também foram observados em menor frequência. Todos os animais foram classificados como sintomáticos, de acordo com os parâmetros clínicos descritos por Solcà e colaboradores (2016).

Tabela 1- Características clínicas gerais dos cães.

Parâmetros		Com LV N(%)	Sem LV N(%)	
N (%)		8 (100)	3 (100)	
Sexo	Macho	7 (88)	0 (0)	
	Fêmea	1 (12)	3 (100)	
Idade	Filhote	1 (12,5)	0 (0)	
	Jovem	2 (25)	0 (0)	
	Adulto	4 (50)	3 (100)	
	Idoso	1 (12,5)	0 (0)	
Escore clínico	Subclínico ≤3	0 (0)	3 (100)	
	Moderado ≥4 <7	2 (25)	0 (0)	
	Grave ≥7	6 (75)	0 (0)	
Sinais clínicos	Conjuntivite	7 (88)	0 (0)	
	Crosta orelha	6 (75)	0 (0)	
	Emagrecimento	5 (63)	0 (0)	
	Mucosas hipocoradas	5 (63)	0 (0)	
	Onicogribose	5 (63)	0 (0)	
	Esplenomegalia	4 (50)	0 (0)	
	Dermatite periocular	4 (50)	0 (0)	
	Alopecia	4 (50)	0 (0)	
	Dermatite furfuracea	4 (50)	0 (0)	
	Linfadenomegalia	3 (38)	0 (0)	
	Despigmentação	3 (38)	0 (0)	
	Úlcera na orelha	2 (25)	0 (0)	
	Hiperqueratose	2 (25)	0 (0)	
	Parasitismo	qPCR	6 (75)	0 (0)
		ELISA	8 (100)	-
Cultura do aspirado esplênico		8 (100)	-	

Ao avaliarmos as proteínas séricas, observamos que os animais com LV apresentavam menor valor na relação albumina/globulina, quando comparados com os animais controle ($p=0,0358$) (figura 8), caracterizando uma hiperglobulinemia nesses animais.

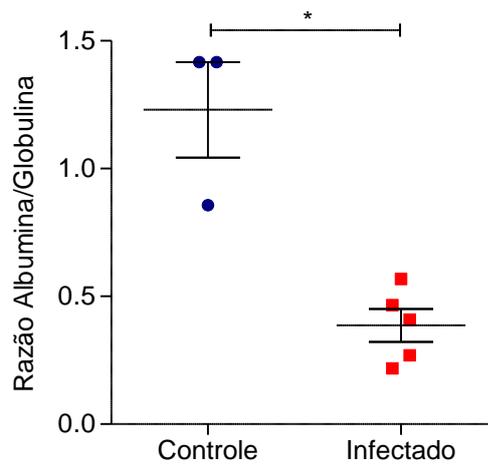


Figura 8- Relação das proteínas séricas albumina/globulina. Cães infectados com *L.infantum* apresentam menor razão albumina/globulina quando comparados com cães controle. Cada ponto no gráfico corresponde a um animal. ($p=0,0358$, teste t paramétrico).

5.3 PLASMOCITOSE NA POLPA VERMELHA E ESPECIFICIDADE DE ANTICORPO

A análise histológica das lâminas de baços coradas em HE foi realizada, e foram encontradas alterações como periesplenite (2/8), deposição de matriz extracelular em cordões esplênicos (1/8), atrofia de folículos linfoides e centro germinativo (2/8), além da presença de neutrófilos (4/8) e granuloma (1/8) na polpa vermelha. Esses achados estão representados na figura 9.

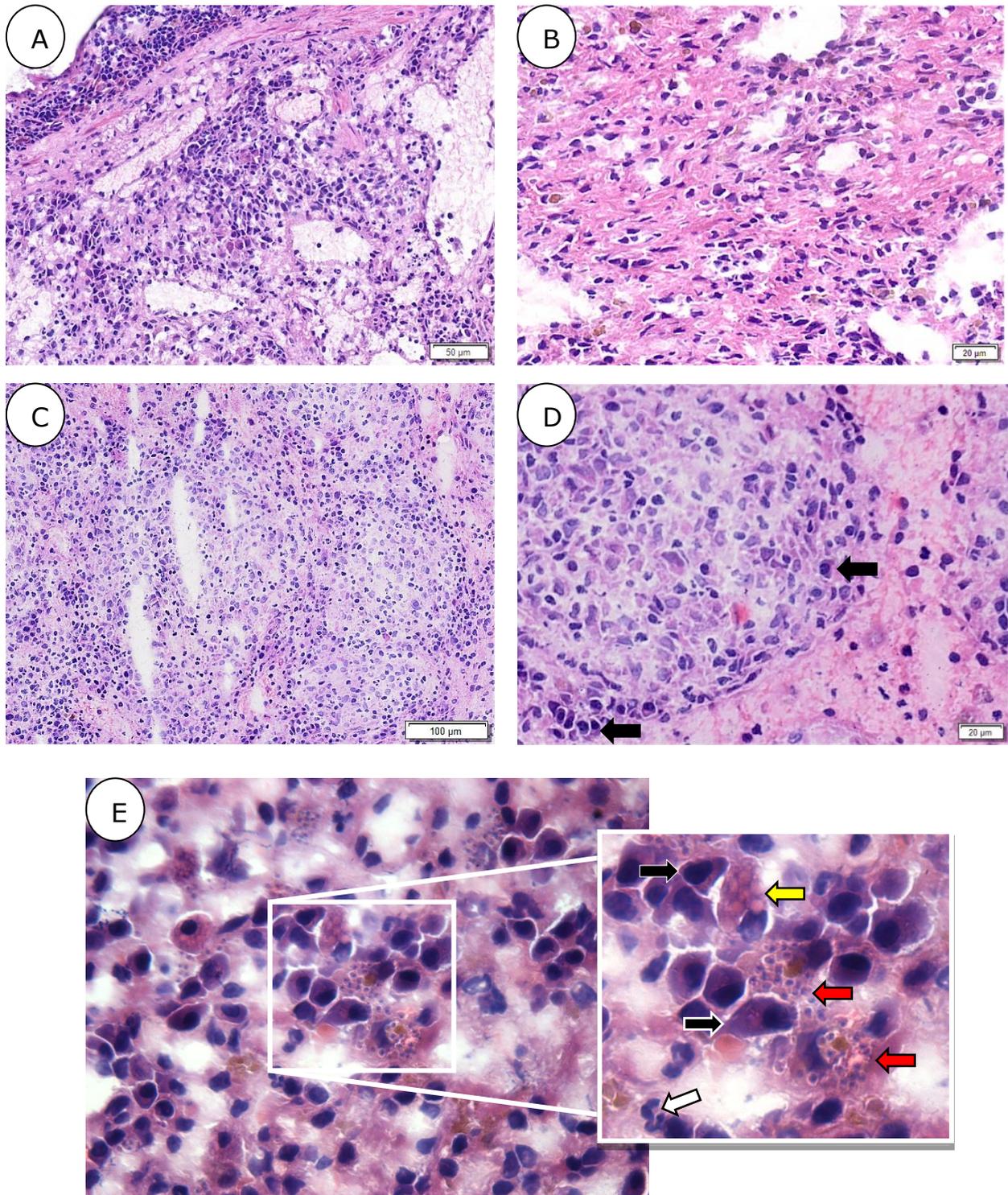


Figura 9- Fotomicrografias de baço de cães com LV. A- Infiltrado inflamatório em cápsula. B- Deposição de matriz extracelular em cordões esplênicos. C- Múltiplos granulomas na PV. D- Granuloma em maior aumento, setas pretas indicam a presença de plasmócitos ao redor desse granuloma. E- Macrófagos parasitados na PV (Setas vermelhas), células de Mott (Seta amarela), neutrófilo (Seta branca) e plasmócitos (Setas pretas) na PV, aumento de 1000x. Lâminas coradas em HE.

Além disso, verificamos que havia acúmulo de plasmócitos na PV do órgão e esse número de plasmócitos foi maior que o observado em baço de cães controle ($p < 0,01$) (figura 10).

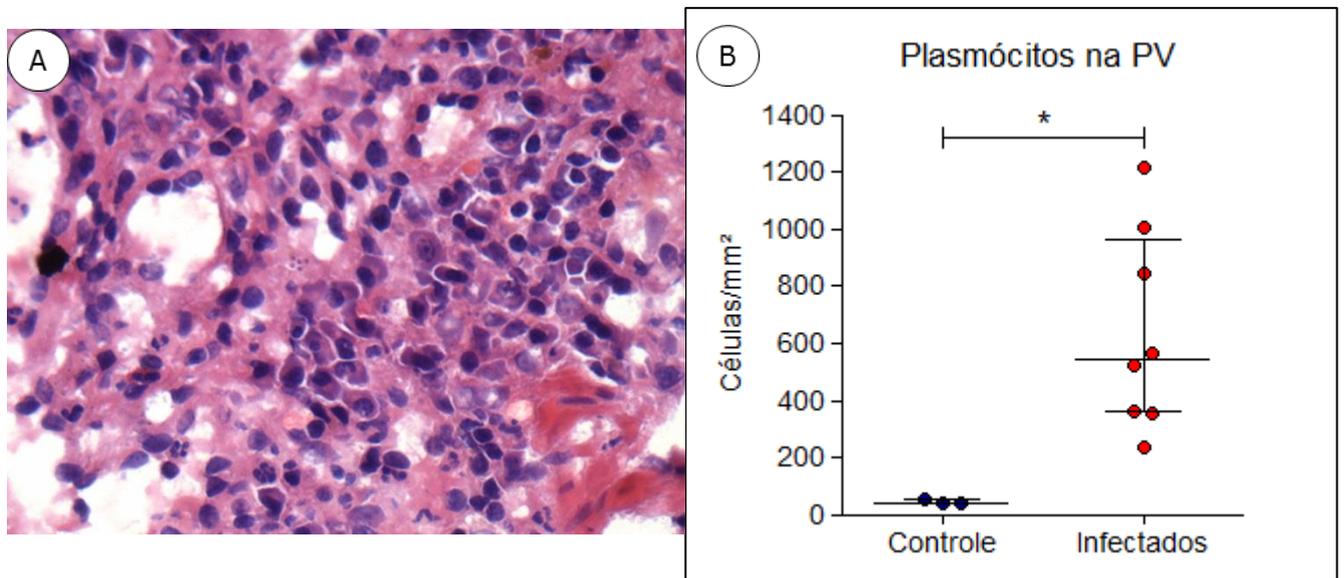


Figura 10- Plasmocitose na polpa vermelha do baço. A- Fotomicrografia de plasmócitos acumulados na polpa vermelha do baço de cães com LV, 400x, HE. B- A quantidade de plasmócitos na polpa vermelha foi quantificada em 5 campos aleatórios e calculada a média de células por mm². Cada ponto no gráfico corresponde à média de plasmócitos por animal. Observa-se que há aumento no número de plasmócitos nos animais infectados. ($p = 0,0121$, Mann-Whitney).

A reatividade desses plasmócitos foi verificada através da reação de imunohistoquímica modificada utilizando bSLA e antígenos de J774 como sondas. Nós observamos que havia a ligação bSLA's com anticorpos em alguns plasmócitos na polpa vermelha do baço de cães naturalmente infectados (figura 11), e que essa ligação não ocorreu quando incubamos o bSLA com baços de cães sem infecção por *L. infantum* (figura 12). Não houve, nos baços desses animais, marcação de células com antígenos de J774 biotinilados.

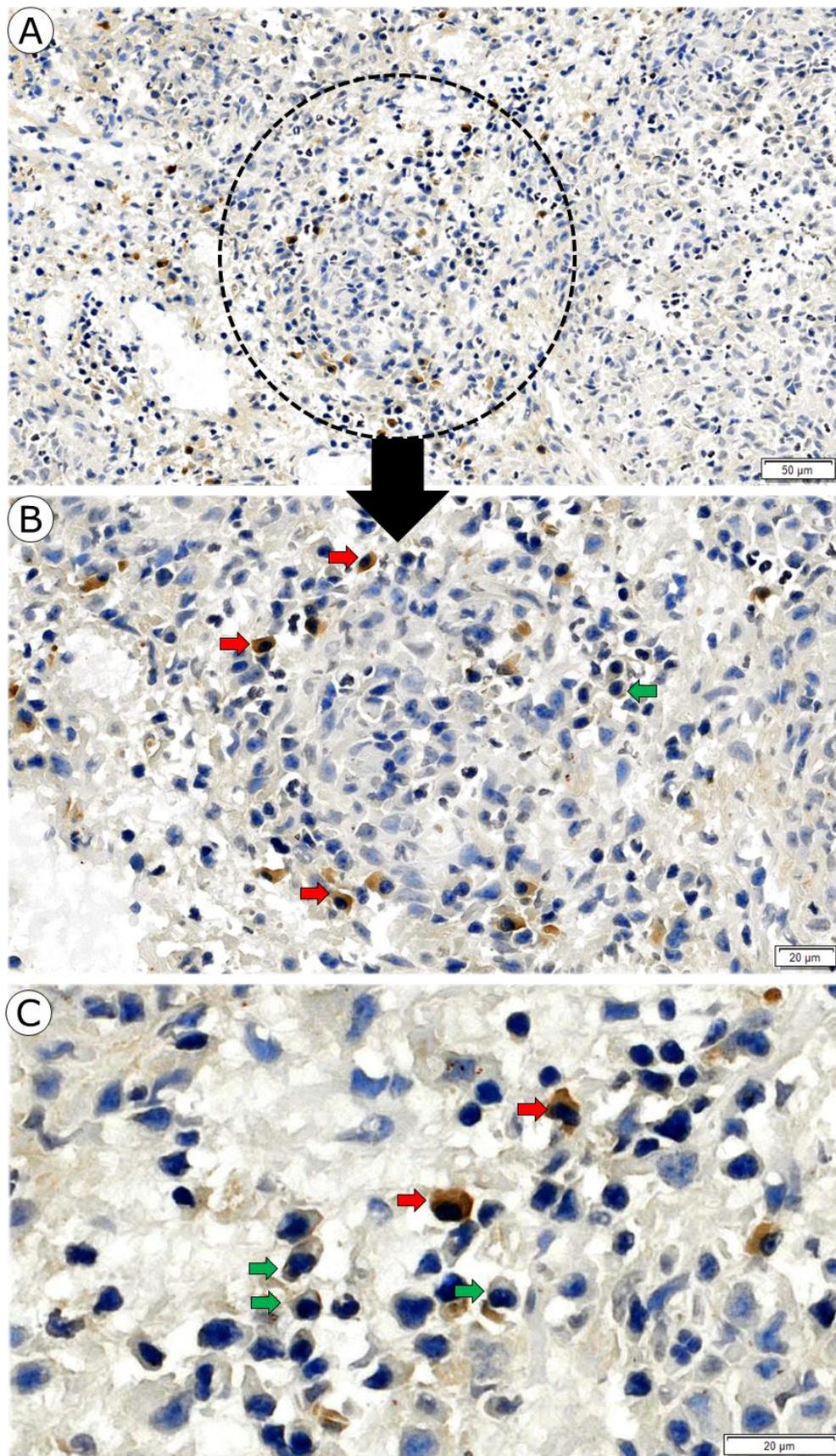


Figura 11 - Fotomicrografias de baços marcados por IHQ para identificação de células produtoras de anticorpos anti-SLA. A- Células marcadas distribuídas na PV do baço em aumento de 100x. B- Células marcadas (setas vermelhas) e não marcadas (setas verdes) ao redor de granulomas na PV do baço em aumento de 200x. C- Fotomicrografia em maior aumento da PV (400x) mostrando células marcadas (setas 43 vermelhas) e não marcadas (setas verdes)

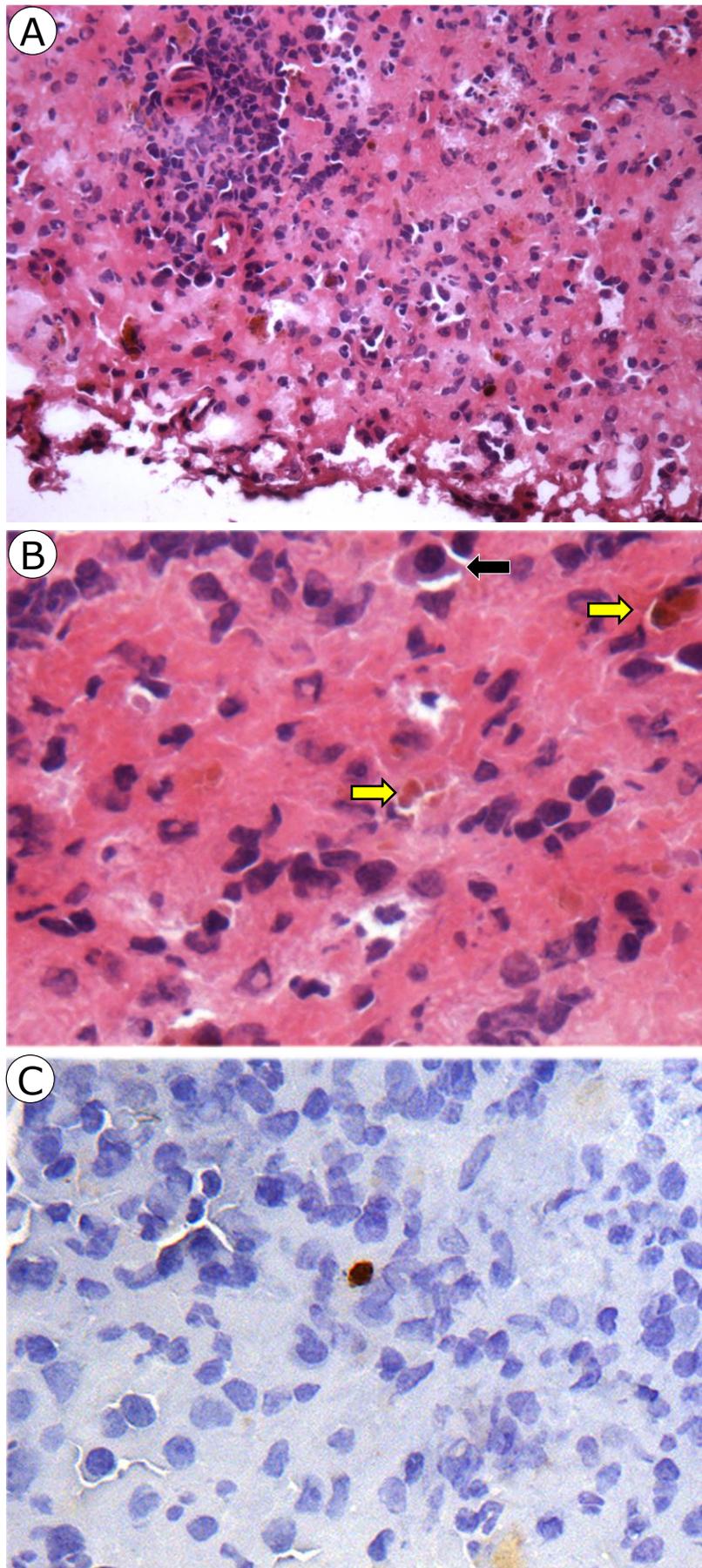


Figura 12- Fotomicrografias de baços dos cães controle. A – Área representativa de polpa branca, H&E, 200x. B- Polpa vermelha em aumento de 400x, corada em H&E, 44 observar a presença de plasmócitos (seta preta) e pigmentos castanhos (seta amarela). C- Imunohistoquímica modificada, observar que não houve marcação, aumento de 400x.

Além da presença de células marcadas na PV, observamos que em alguns casos havia a presença dessas células na PB, especificamente nas regiões de PALS (figura 13). Não verificamos a presença em outras regiões da PB, como CG, manto ou ZM.

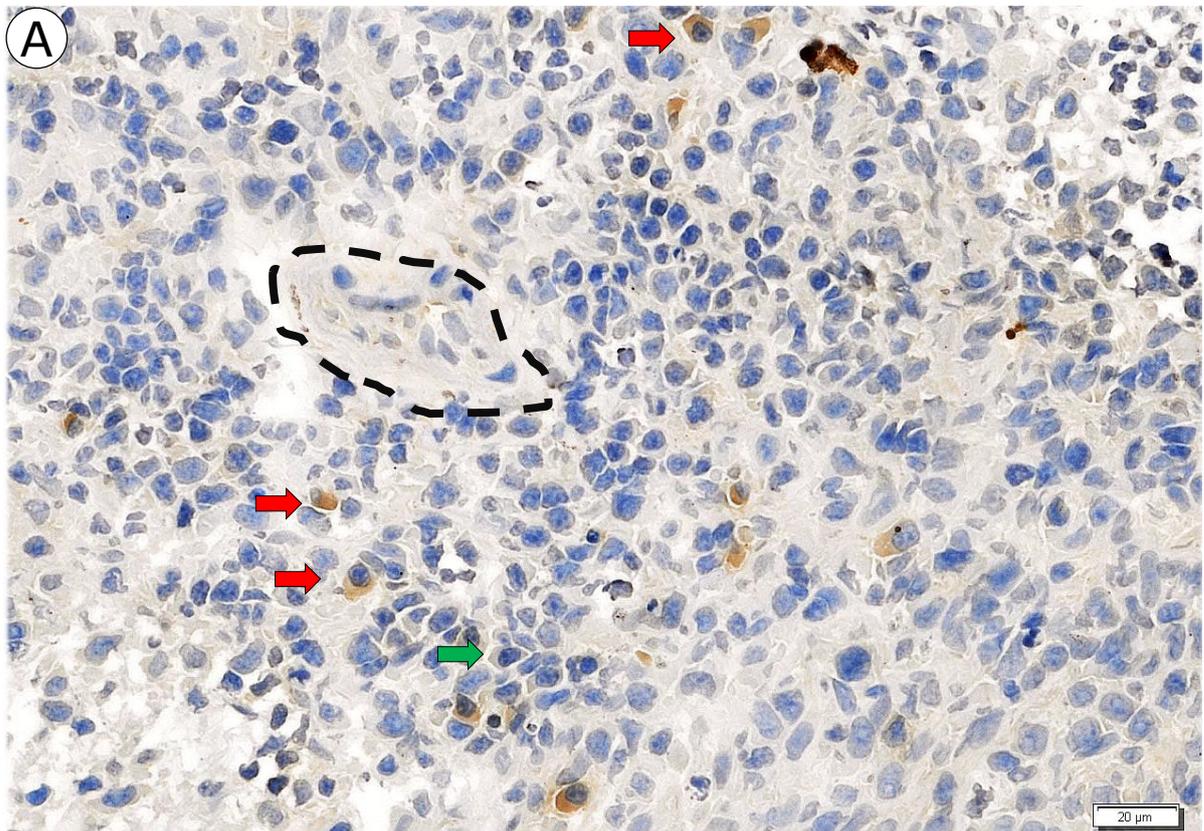


Figura 13- Fotomicrografia de baço de cão com LV. Observar células marcadas com DAB (setas vermelhas) distribuídas ao redor de arteríola central (linha tracejada) em área correspondente a PALS. Observar que existem também plasmócitos não marcados (seta verde).

As células positivas na imunohistoquímica foram quantificadas escolhendo-se 5 campos em que havia maior representação de células marcadas, e calculada a média da quantidade dessas células por campo para cada animal. A proporção de células marcadas foi calculada em relação à quantidade de plasmócitos totais quantificados nas lâminas de HE.

Observamos que a mediana da proporção de células marcadas na PV foi de 21,5% [14,2-41,5] e que dos 8 animais com leishmaniose visceral 6 apresentavam em menos de 42% de plasmócitos reativos para antígenos de *L.infantum*. Avaliamos também a presença dessas células

marcadas na PALS, e procedimento semelhante foi realizado. Os resultados dessas quantificações foram sumarizados na tabela 2.

Tabela 2- Quantificação de plasmócitos totais e marcados por imunohistoquímica modificada.

Baço	Plasmócito PV	Plasmócito marcado PV	PV (%)	Plasmócito PALS	Plasmócito marcado PALS	PALS (%)	Escore clínico
OR	363	54	15	815	663	81,4	12
OR	524	75	14	375	81	21,6	10
OR	568	118	21	330	252	76,4	17
OR	1214	269	22	782	608	77,8	9
OR	358	151	42	164	40	24,4	6
DO	1006	398	40	424	302	71,3	4
DO	842	65	8	524	419	80	11
DO	239	183	76	323	139	41,3	13
Média	639,3	164,1	29,8 ^a	467,1	313	59,3 ^a	10,2

Nota: A quantidade de células expressas na tabela corresponde à quantidade de células/mm². A proporção de plasmócitos específicos foi calculada em relação à quantidade total de plasmócitos quantificados na polpa vermelha. A classificação do baço foi feita de acordo com a organização da polpa branca em organizado (OR) ou desorganizado (DO). O escore clínico corresponde à soma dos valores atribuídos para a apresentação e intensidade dos sinais clínicos ao exame clínico. ^a Diferença estatística entre as médias, Mann-Whitney, p=0,02.

Observamos que a proporção de células marcadas nos cães com LV é maior na PALS (59,3%) do que na PV (29,8%) do baço (p=0,02). Além disso, ao plotarmos a proporção de células marcadas na PALS x PV, observamos que existe uma curva polinomial que muda de direção à medida que aumentam as células marcadas na PALS (R²=0,9102) (Figura 14).

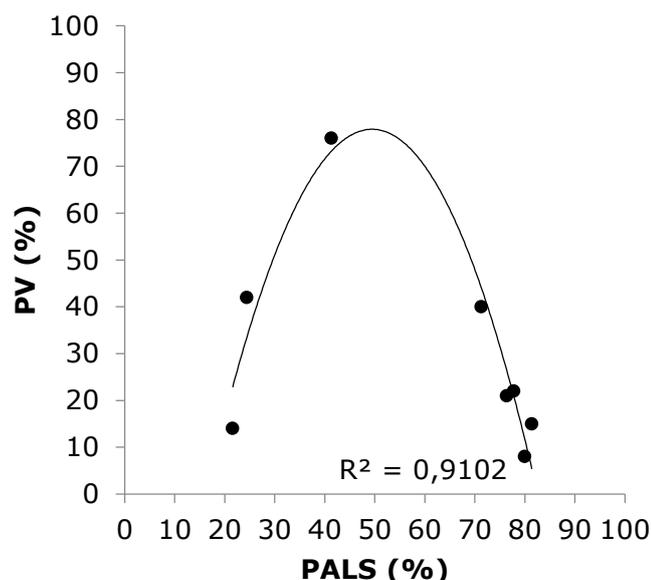


Figura 14- Relação entre proporção de plasmócitos marcados na PALS e na PV de cães com LV. É possível observar que os animais com maior porcentagem de células positivas na PALS tendem a serem os animais com menor proporção de células positivas na PV. Cada ponto no gráfico corresponde a um animal. (Polinômio quadrático; $R^2 = 0,9102$).

Ao relacionarmos a proporção de plasmócitos reativos na PV ao score clínico desses animais, observamos que existe uma tendência de aqueles que apresentam menor número de plasmócitos específicos serem os que possuem score clínico mais grave (>7), porém ainda sem diferença estatística (figura 15).

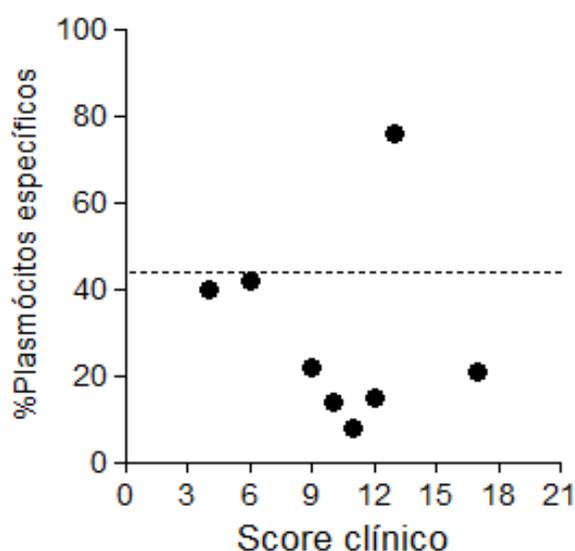


Figura 15- Relação entre porcentagem de plasmócitos específicos e score clínicos dos animais com LV. A linha tracejada corresponde ao 75º percentil da amostra. Cada ponto no gráfico corresponde a um cão infectado.

6. DISCUSSÃO

Com esse trabalho, nós objetivamos padronizar a técnica para identificar plasmócitos produtores de anticorpos anti-antígenos de superfície de *L.infantum* em tecido esplênico. Nós realizamos a biotinição de promastigotas de *L.infantum*, produzimos antígenos solúveis a partir desses parasitos e então utilizamos esses antígenos em uma técnica de imunohistoquímica modificada. Foi identificada presença de plasmócitos na PV, em regiões da PALS e ao redor de granulomas. Porém, apenas uma porcentagem dessas células produtoras de anticorpos com afinidade por bSLA's e não houve diferença quanto à distribuição em relação a organização do baço ou escore clínico.

Apesar de observada a marcação positiva, verificamos baixa proporção de células na PV. Sabe-se que a *L. infantum* apresenta um ciclo digenético, com alterações morfológicas marcantes, e tem a forma amastigota como forma evolutiva no hospedeiro (COELHO et al., 2012). Mesmo que já tenha sido demonstrado que uma grande parte das proteínas expressas permanece comum aos estágios evolutivos, conservando a imunogenicidade, o que se observa é que a combinação de proteínas de superfície de amastigotas com as proteínas de promastigotas aumentam a acurácia de diagnóstico (MARTINS et al., 2016). Por isso, a utilização de proteínas de superfície de formas promastigotas de *L. infantum* é um fator limitante que precisa ser considerado.

Nesse estudo observamos que os cães com LV apresentam uma intensa plasmocitose na PV, e que apesar disso, menos de 42% dessas células produzem anticorpos específicos para antígenos de superfície de promastigotas de *L.infantum*. Além disso, ao avaliarmos a distribuição das células marcadas no baço, verificamos que essas eram mais frequentes na PALS e que na medida em que a proporção de plasmócitos marcados aumentam na PALS esses reduzem na PV.

Também foi observado que cães com LV apresentam hiperglobulinemia caracterizada pela redução da relação albumina/globulina e que a proporção de plasmócitos produtores de anticorpos para antígenos de superfície de promastigotas de *L.infantum* tendia a se menor nos cães com escore clínico mais grave.

Considerando o processo de ativação e diferenciação das células B, é esperado encontrar uma parcela de plasmócitos na PALS, sugerindo que essas células passaram por seleção e maturação por afinidade no folículo linfoide (ORACKI et al., 2010). Em condições normais, os plasmoblastos que passaram por essa maturação migram em direção à polpa vermelha e então seguem para a medula óssea para diferenciar-se em plasmócitos de vida longa. Silva-O'Hare e colaboradores (2016) identificaram grande quantidade de células IgG positivas na PV de cães com baço desorganizado. Porém, o que observamos é que quanto maior a proporção de células marcadas na PALS, menor a quantidade na PV. Esses dados corroboram para que exista uma ativação policlonal de linfócitos B, sugerindo que há diferenciação anômala dessas células na PV.

A presença de plasmócitos ao redor de granulomas pode ser explicada pela capacidade das células do granuloma secretarem grandes quantidades de APRIL, uma quimiocina importante na sobrevivência dos plasmócitos (MUELLER et al., 2014). Além disso, já foi observado, em um estudo em cães com LV, que o baço possui aumento da expressão de citocinas como CXCL12, BAFF e APRIL (SILVA-O'HARE et al., 2016), essas quimiocinas são importantes para a migração e sobrevivência dos plasmócitos, tornando o baço o local ideal para permanência dos dessas células no curso da LV.

A plasmocitose na PV e hiperglobulinemia são alterações comuns na LV. Ainda que altos níveis de anticorpos sejam observados, o que se verifica é que muitos dos anticorpos séricos não são específicos para *L. infantum*, inclusive com a presença elevada de auto anticorpos (SILVA-O'HARE et al., 2016; CHAABOUNI et al., 2018; SILVA-BARRIOS e STÄGER, 2019). Como em nosso estudo demonstramos que menos da

metade dos plasmócitos na PV do baço de cães infectados são específicos para antígenos de superfície de promastigotas de *L. infantum*, é possível que a maioria desses plasmócitos produza anticorpos não específicos para *L. infantum*. Na verdade, estudos demonstram uma baixa quantidade de imunoglobulinas séricas para antígenos de *L. infantum* em comparação ao total de imunoglobulinas (RODRIGUES et al., 2014; SILVA-O'HARE et al., 2016).

O aumento na quantidade de células produtoras de anticorpos implica na presença da hiperglobulinemia, alteração observada em nosso estudo. Ademais, houve tendência a menor número de plasmócitos específicos associado à doença clínica mais grave. A hiperglobulinemia está relacionada ao aumento da susceptibilidade para LV, sendo inclusive um marcador utilizado para avaliação da eficácia do tratamento. De fato, a presença de grande quantidade de imunoglobulinas circulantes favorece a formação de imunocomplexos que podem causar dano tecidual e cursar com apresentação clínica mais grave (CARREIRA, MONTEIRO e AZEVEDO, 2017; GIUNCHETTI et al., 2019). Além do dano direto, a hiperglobulinemia pode modular o sistema imunológico para um perfil mais regulatório, uma vez que amastigotas opsonizadas quando fagocitadas podem induzir a produção de IL-10, uma citocina regulatória que favorece a persistência do parasito (RODRIGUES et al., 2016).

Um dos possíveis mecanismos que poderia justificar a grande quantidade de plasmócitos e a pouca quantidade dessas células responsivas à *L. infantum* é a ativação policlonal de linfócitos B conforme descrita nas infecções por *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania sp.* (MONTES et al., 2002; DEAK et al., 2010; SILVA-BARRIOS, CHARPENTIER e STÄGER, 2018). Durante esse processo, a alta quantidade de antígenos de *L. infantum* funcionaria como mitógeno de células B, induzindo a rápida proliferação e diferenciação dessas células independente da especificidade do BCR, levando ao aumento do número de plasmócitos no baço desses animais.

Um dos pilares da reação de imunohistoquímica se baseia na capacidade de ligação das moléculas de biotina com a avidina. A biotina é uma molécula que pode se ligar a porção amino-terminal de outras proteínas, permitindo que essas (proteínas purificadas ou mesmo em superfícies de células vivas) sejam rotuladas (ELIA, 2008). Por isso, foi possível fazer a biotinação das proteínas de superfície de *L. infantum*, o que permitiu com que essas fossem utilizadas como “sondas” na reação de imunohistoquímica e então identificar a ligação dos bSLA’s aos anticorpos presentes no tecido.

Como se trata de um estudo exploratório, o número amostral reduzido dificultou que a amostra fosse estratificada quanto ao tipo de baço. Para mais, os cães em áreas endêmicas possuem diferentes níveis de organização do baço e apresentação clínica da LV. Isso porque esses animais, em sua maioria, são semi-domiciliados que estão expostos a diversos outros patógenos, possuem nutrição inadequada e diferentes condições de cuidado. Fazendo com que, diferente de estudos experimentais, a evolução da LV seja diferente em cada animal.

A utilização dessa técnica de imunohistoquímica modificada permitiu com que fosse determinada a proporção de células produtoras de anticorpos para antígenos de *L. infantum* e como essas células estão distribuídas no baço de cães com LV. Assim, identificar localmente os plasmócitos e para qual antígeno essas células são reativas nos permite compreender melhor o papel dessas células na progressão da LV.

Dessa forma, utilizar esse procedimento pode ser uma ferramenta importante na avaliação do prognóstico dos pacientes, não somente em casos de LV, mas de outras doenças em que essas células participem da patogenia, e até mesmo, servir para avaliar a eficiência de novos peptídeos na produção de vacinas, por exemplo.

7. CONCLUSÕES

- 1) Cães com LV possuem mais plasmócitos na PV do que cães sem LV;
- 2) A imunohistoquímica modificada, utilizando bSLA's como sondas, detecta células produtoras de anticorpos reativos para antígenos de superfície de *L. infantum*;
- 3) Cães com LV apresentam menos de 50% de plasmócitos produtores de anticorpos para antígenos de superfície de *L. infantum* na polpa vermelha do baço;
- 4) Plasmócitos produtores de anticorpos para antígenos de superfície de *L. infantum* são mais frequentes na PALS que na PV.

Referências

- ATO, M. et al. Localization of marginal zone macrophages is regulated by C-C chemokine ligands 21/19. **Journal of Immunology**, Baltimore, Md, v. 173, p. 4815–4820, 2004.
- BORGES DA SILVA, H. et al. Splenic Macrophage Subsets and Their Function during Blood-Borne Infections. **Frontiers in Immunology**, v. 6, 22 set. 2015.
- BORJA-CABRERA, G. P. et al. Immunogenicity assay of the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Vaccine**, v. 26, n. 39, p. 4991–4997, 15 set. 2008.
- BRASIL. Lei No. 11.794, de 08 de Outubro de 2008. Estabelece procedimentos para o uso científico de animais.
- BRASIL. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF: Editora MS, 2014.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2017.
- CARREIRA L, M.; P, M.; PEDRO, A. Total Proteins, β - and γ -globulins as efficacy therapy response indicators in dogs infected with *Leishmania infantum* – a Review. **Journal of Veterinary Healthcare**, v. 1, n. 2, p. 1–11, 1 nov. 2017.
- CASTRO, A. et al. Lymphoproliferative response after stimulation with soluble leishmania antigen (SLA) as a predictor of visceral leishmaniasis (VL) relapse in HIV+ patients. **Acta Tropica**, v. 164, p. 345–351, dez. 2016.
- 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**, v. 10, n. 4, p. e0123009, 13 abr. 2015.
- CESTA, M. F. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. **Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 5, p. 455–465, ago. 2006.
- CHAABOUNI, A. et al. Comparative analysis of the *Leishmania infantum*-specific antibody repertoires and the autoantibody repertoires between asymptomatic and symptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 261, p. 9–17, set. 2018.
- CHU, V. T.; BEREK, C. The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. **Immunological Reviews**, v. 251, n. 1, p. 177–188, jan. 2013.

- COELHO, V. T. S. et al. Identification of Proteins in Promastigote and Amastigote-like Leishmania Using an Immunoproteomic Approach. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, p. e1430, 17 jan. 2012.
- CORNABY, C. et al. B cell epitope spreading: Mechanisms and contribution to autoimmune diseases. **Immunology Letters**, v. 163, n. 1, p. 56–68, jan. 2015.
- COSTA, C. H. N. et al. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 386–392, ago. 2010.
- COSTA, D. N. C. C. et al. Culling Dogs in Scenarios of Imperfect Control: Realistic Impact on the Prevalence of Canine Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, p. e2355, 8 ago. 2013.
- DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on Leishmania (Leishmania) infantum and Leishmania (Viannia) braziliensis. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3, p. 139–146, 10 nov. 2007.
- DANTAS-TORRES, F. et al. Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 97–101, fev. 2019.
- DEAK, E. et al. Murine visceral leishmaniasis: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 5, p. 1355–1368, 8 mar. 2010.
- DI NIRO, R. et al. High abundance of plasma cells secreting transglutaminase 2-specific IgA autoantibodies with limited somatic hypermutation in celiac disease intestinal lesions. **Nature Medicine**, v. 18, n. 3, p. 441–445, 26 fev. 2012.
- ELIA, G. Biotinylation reagents for the study of cell surface proteins. **PROTEOMICS**, v. 8, n. 19, p. 4012–4024, out. 2008.
- FILLATREAU, S. Regulatory plasma cells. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 23, p. 1–5, ago. 2015.
- FUKUTANI, K. F. et al. Serological survey of Leishmania infection in blood donors in Salvador, Northeastern Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 422, dez. 2014.
- GIUNCHETTI, R. C. et al. Canine visceral leishmaniasis biomarkers and their employment in vaccines. **Veterinary Parasitology**, v. 271, p. 87–97, jul. 2019.
- GOTO, Y. et al. Elevation of Serum B-Cell Activating Factor Levels During Visceral Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 5, p. 912–914, 5 nov. 2014.

- HARGREAVES, D. C. et al. A Coordinated Change in Chemokine Responsiveness Guides Plasma Cell Movements. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 1, p. 45–56, 2 jul. 2001.
- HERMIDA, M. D'EL-REI et al. Histological Disorganization of Spleen Compartments and Severe Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, 13 nov. 2018.
- HIEPE, F. et al. Long-lived autoreactive plasma cells drive persistent autoimmune inflammation. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 7, n. 3, p. 170–178, mar. 2011.
- HIEPE, F.; RADBRUCH, A. Plasma cells as an innovative target in autoimmune disease with renal manifestations. **Nature Reviews. Nephrology**, v. 12, n. 4, p. 232–240, abr. 2016.
- KHODADADI, L. et al. The Maintenance of Memory Plasma Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 721, 5 abr. 2019.
- LAURENTI, M. D. et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3–4, p. 296–300, set. 2013.
- LAURENTI, M. D. et al. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 3–4, p. 444–450, out. 2014.
- LIMA, I. S. et al. Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp. **PloS One**, v. 9, n. 2, p. e87742, 2014.
- MALLISON, S. M. et al. Accumulation of plasma cells in inflamed sites: effects of antigen, nonspecific microbial activators, and chronic inflammation. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 11, p. 4019–4025, nov. 1991.
- MARTINS, V. T. et al. Antigenicity, Immunogenicity and Protective Efficacy of Three Proteins Expressed in the Promastigote and Amastigote Stages of *Leishmania infantum* against Visceral Leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, 14 set. 2015.
- MATSUMOTO, Y.; PARK, I.-K.; KOHYAMA, K. B-Cell Epitope Spreading Is a Critical Step for the Switch from C-Protein-Induced Myocarditis to Dilated Cardiomyopathy. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 1, p. 43–51, jan. 2007.
- MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nature Reviews. Immunology**, v. 5, n. 8, p. 606–616, ago. 2005.
- MEBIUS, R. E.; NOLTE, M. A.; KRAAL, G. Development and function of the splenic marginal zone. **Critical Reviews in Immunology**, v. 24, n. 6, p. 449–464, 2004.

MINGES WOLS, H. A. Plasma Cells. In: JOHN WILEY & SONS, LTD (Ed.). . **Encyclopedia of Life Sciences**. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2006. p. a0004030.

MIZUTANI, Y. et al. Enzyme-labeled Antigen Method: Histochemical Detection of Antigen-specific Antibody-producing Cells in Tissue Sections of Rats Immunized With Horseradish Peroxidase, Ovalbumin, or Keyhole Limpet Hemocyanin. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 57, n. 2, p. 101–111, fev. 2009.

MIZUTANI, Y. et al. In situ visualization of plasma cells producing antibodies reactive to *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis: the application of the enzyme-labeled antigen method. **Molecular Oral Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 156–173, ago. 2014.

MIZUTANI, Y. et al. Enzyme-labeled Antigen Method: Development and Application of the Novel Approach for Identifying Plasma Cells Locally Producing Disease-specific Antibodies in Inflammatory Lesions. **Acta Histochemica et Cytochemica**, v. 49, n. 1, p. 7–19, 27 fev. 2016.

MNIOUIL, M. et al. Comparative evaluation of immunochromatographic dipstick test (ICT) rk39, soluble antigen ELISA and IFAT for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in Morocco. **Acta Tropica**, v. 182, p. 185–189, jun. 2018.

MONTES, C. L. et al. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial malate dehydrogenase triggers polyclonal B-cell activation. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 127, n. 1, p. 27–36, jan. 2002.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 9, p. 399–405, 1 set. 2002.

MUELLER, A. et al. Plasma cells within granulomatous inflammation display signs pointing to autoreactivity and destruction in granulomatosis with polyangiitis. **Arthritis research & therapy** p. 7, 2014.

NUTT, S. L. et al. The generation of antibody-secreting plasma cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 3, p. 160–171, mar. 2015.

ODENDAHL, M. et al. Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1614–1621, 15 fev. 2005.

OMACHI, S. et al. B-cell activating factor deficiency suppresses splenomegaly during *Leishmania donovani* infection. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 489, n. 4, p. 528–533, ago. 2017.

ORACKI, S. A. et al. Plasma cell development and survival: Plasma cell development and survival. **Immunological Reviews**, v. 237, n. 1, p. 140–159, 19 ago. 2010.

- PALTRINIERI, S. et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 11, p. 1184–1191, 1 jun. 2010.
- PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 1, p. 229–235, jan. 1994.
- POLLOK, K. et al. The chronically inflamed central nervous system provides niches for long-lived plasma cells. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 5, n. 1, p. 88, dez. 2017.
- READY, P. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, p. 147, maio 2014.
- REINA-SAN-MARTÍN, B.; COSSON, A.; MINOPRIO, P. Lymphocyte Polyclonal Activation: A Pitfall for Vaccine Design against Infectious Agents. **Parasitology Today**, v. 16, n. 2, p. 62–67, fev. 2000.
- RISUEÑO, J. et al. Epidemiological and genetic studies suggest a common *Leishmania infantum* transmission cycle in wildlife, dogs and humans associated to vector abundance in Southeast Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 259, p. 61–67, ago. 2018.
- RODRIGUES, V. et al. Abortive T Follicular Helper Development Is Associated with a Defective Humoral Response in *Leishmania infantum*-Infected Macaques. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 4, p. e1004096, 24 abr. 2014.
- RODRIGUES, V. et al. Abortive T Follicular Helper Development Is Associated with a Defective Humoral Response in *Leishmania infantum*-Infected Macaques. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 4, p. e1004096, 24 abr. 2014.
- SANTANA, C. C. et al. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. **Parasite Immunology**, v. 30, n. 10, p. 515–524, out. 2008.
- SCOTHORNE, R. J. Leading article. **Histopathology**, v. 9, n. 6, p. 663–669, jun. 1985.
- SILVA, J. S. et al. Low CXCL13 expression, splenic lymphoid tissue atrophy and germinal center disruption in severe canine visceral leishmaniasis. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e29103, 2012.
- SILVA-BARRIOS, S. et al. Innate Immune B Cell Activation by *Leishmania donovani* Exacerbates Disease and Mediates Hypergammaglobulinemia. **Cell Reports**, v. 15, n. 11, p. 2427–2437, jun. 2016.
- SILVA-BARRIOS, S.; CHARPENTIER, T.; STÄGER, S. The Deadly Dance of B Cells with Trypanosomatids. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 155–171, fev. 2018.

SILVA-BARRIOS, S.; STÄGER, S. Hypergammaglobulinemia sustains the development of regulatory responses during chronic *Leishmania donovani* infection in mice. **European Journal of Immunology**, p. eji.201847917, 23 maio 2019.

SILVA-O'HARE, J. et al. Disruption of Splenic Lymphoid Tissue and Plasmacytosis in Canine Visceral Leishmaniasis: Changes in Homing and Survival of Plasma Cells. **PloS One**, v. 11, n. 5, p. e0156733, 2016.

SLOCOMBE, T. et al. Plasma cell homeostasis: the effects of chronic antigen stimulation and inflammation. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 191, n. 6, p. 3128–3138, 15 set. 2013.

SMELT, S. C. et al. Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 158, n. 8, p. 3813–3821, 15 abr. 1997.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1, p. 1–18, 28 out. 2009.

SOLCÀ, M. S. et al. Circulating Biomarkers of Immune Activation, Oxidative Stress and Inflammation Characterize Severe Canine Visceral Leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 32619, dez. 2016.

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

SZYSZKO, E. A. et al. Distinct phenotypes of plasma cells in spleen and bone marrow of autoimmune NOD.B10.H2b mice. **Autoimmunity**, v. 44, n. 5, p. 415–426, ago. 2011.

TARLINTON, D. et al. Plasma cell differentiation and survival. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, n. 2, p. 162–169, abr. 2008.

TRAVI, B. L. et al. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. e0006082, 11 jan. 2018.

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

VANDERLUGT, C. J.; MILLER, S. D. Epitope spreading. **Current Opinion in Immunology**, v. 8, n. 6, p. 831–836, dez. 1996.

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

VERESS, B. et al. Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. **Immunology**, v. 33, n. 5, p. 607–610, nov. 1977.

WHO EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF THE LEISHMANIASES;
WORLD HEALTH ORGANIZATION (Orgs.). **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010**. Geneva: World Health Organization, 2010. (WHO technical report series, 949).