

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Aurea Virginia Andrade da Silva

Estudo imunopatológico do baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

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

RIO DE JANEIRO

2017

S586 Silva, Aurea Virginia Andrade da

Estudo da imunopatogênia do baço de cães naturalmente infectados com
Leishmania infantum / Aurea Virginia Andrade da Silva. – Rio de Janeiro, 2017.

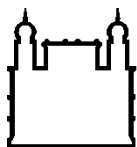
xvi, 87 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular, 2017.

Bibliografia: f. 66-84 1.

Leishmaniose visceral. 2. *Leishmania infantum*. 3. Cão naturalmente infectado. 4. Baço. 5.
Desorganização da polpa branca. I. Título.

CDD 616.9364



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Aurea Virginia Andrade da Silva

Estudo imunopatológico do baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*

Orientadores: Prof. Dr^o. Renato Porrozzi de Almeida
Prof. Dr^a. Fernanda Nazaré Morgado

Aprovada em: 06/03/2017

EXAMINADORES:

Prof. Dr^a Daniella Arêas Mendes da Cruz - Presidente
Prof. Dr^a Fátima Conceição-Silva
Prof. Dr. Lucia Pinto da Silva
Prof. Dr. Rodrigo Menezes
Prof. Dr. Josué da Costa Lima Junior

Rio de Janeiro, 06 de Março de 2017

Dedico este trabalho a Deus e a minha família, que juntos formaram minha base para chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

A palavra agradecer tem como significado o ato de mostrar ou manifestar gratidão. Durante a caminhada como aluna de mestrado tive o imenso prazer de conhecer e trabalhar com diversas pessoas. Nada se constrói sozinho, uma andorinha só não faz verão.

Ao meu orientador Renato Porrozzi de Almeida, por seu ensino, dicas e conversas. Por ter me aceito como sua aluna, por sua paciência em me orientar e ver em mim potencial. Por fornecer infraestrutura e recursos para o desenvolvimento desta dissertação. Há coisas na vida que jamais poderemos esquecer.

À minha orientadora Fernanda Nazaré Morgado. Tem gente que acredita que eu tenho ciúmes da minha orientadora. É verdade. Tenho sim. Quando encontramos pessoas que querem o nosso bem, que nos trate com carinho e muita paciência como podemos não ter ciúmes? Muito obrigada Fernanda, por ter me dado essa grande oportunidade de executar esse incrível trabalho, que tem me ensinado tantas coisas e me dado tantas alegrias. Obrigada pela sua amizade e companheirismo. Obrigada por demonstrar paciência, calma e acima de tudo fé na ciência. Você é incrível.

À Elisa Cupolillo, que além de dar aquelas dicas valiosíssimas após cada apresentação, tem sido, ao lado do Renato, um pilar para nosso laboratório. Para mim é uma honra trabalhar ao seu lado, ao lado do Renato e Fernanda. Grande equipe!

Em falar em grande equipe, gostaria de deixar meu grande agradecimento à pesquisadora Patrícia Cuervo, que tem dado grande suporte para nosso grupo. Muito obrigada Patty. Muito obrigada também à pesquisadora Mariana, que tem sido um exemplo para mim. Sua trajetória tem me inspirado!

Aos meus companheiros Erika Costa, Tainã Luís, Tamara Lima e Elaine Santos vocês são ótimos. Aprendo diariamente ao lado de vocês todos.

Ao laboratório de pesquisas em dermatozoonoses em animais domésticos-INI. Artur, Adilson, Fabiano, Rodrigo e Luísa. Muito obrigada!!

A equipe técnica do Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose. Rosane, Ricardo, Eduardo, Henrique, Hellen, Caroline, Camila, Barbara e Dona Selma. Uma andorinha só não faz verão. Ainda bem que somos muitas!

A CAPES, Faperj, APQ1, PAEF/Fiocruz pelo auxílio financeiro.

A coordenação da pós-graduação em biologia celular e molecular em especial à Julimar que com muita dedicação e paciência tem tirado todas as minhas dúvidas.

Aos meus amigos Mayla, Ivson e Arianna. Olhem onde estamos chegando!!

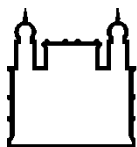
A minha grande família. Meu suporte. Meu tudo. Meus irmãos Alex, Alessandra e Victor Matheus. Que a cada dia me dão forças para chegar ainda mais longe, esse título é nosso!

A minha querida mãe Jercilene. Meus olhos se enchem de lágrimas pela imensa gratidão que sinto por você. Exemplo de mulher para mim, guerreira, me ensinou a batalhar pelas minhas metas, me mostrou a esperar sempre o melhor desta vida. Mãe, obrigada por não abandonar a gente, por nos acolher na sua cama quentinha. Amo-te incondicionalmente!

Enfim, Obrigada a Todos!

O Senhor é a minha força, Ele faz os meus pés
como os da corça. O senhor, o Soberano, Ele me
faz andar em lugares altos.

Bíblia Sagrada



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

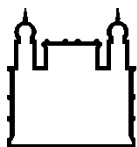
Estudo imunopatológico do baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*

RESUMO

DISSERTAÇÃO MESTRADO

Aurea Virginia Andrade da Silva

O baço é um dos principais órgãos afetados na leishmaniose visceral canina (LVC). A desorganização da polpa branca esplênica (PBE) tem sido associada à imunossupressão e à progressão da doença. Este estudo tem como objetivo avaliar mudanças estruturais e celulares na matriz extracelular esplênica de cães com LVC correlacionando as com a carga parasitária e os sinais clínicos. 41 animais foram agrupados de acordo com a organização da PBE como: 1- Organizado a pouco desorganizado (OR-PD, n= 11); 2- Desorganização moderada a intensa (MD-ID, n= 30). Foram coletados fragmentos esplênicos para a quantificação de carga parasitária através de qPCR para análise histopatológica e imunohistoquímica. Foram avaliadas as células CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺, IFN- γ ⁺, IL-10⁺, MMP-9, ADAM-10, assim como a expressão de laminina, colágeno e fibronectina. A desorganização da PBE foi acompanhada pela redução da quantidade de folículos linfóides/mm² (p<0,0001). Os animais MD-ID mostraram sinais clínicos mais intensos (p = 0,021), alta deposição de laminina (p= 0,045) e colágeno (p= 0,036), aumento da expressão de MMP-9 (p= 0,035) e redução das células T CD4⁺ (p = 0,027). Os dados sugerem que a desorganização esplênica na LVC consiste em uma alteração histopatológica frequente e causada por aumento na deposição de laminina e colágeno. Além disso, os animais foram distribuídos em grupos de acordo com a associação entre a carga parasitária e a organização da polpa branca esplênica. Nesta análise, foi possível observar que a desorganização pode ocorrer nos momentos iniciais desta infecção, uma vez que animais com baixa carga parasitária apresentaram polpa branca desorganizada, já apresentavam diminuição do número de folículos linfóides (p=0,0002) e aumento da deposição de laminina (p=0,005). Animais com polpa branca desorganizada e alta carga parasitária apresentaram aumento na expressão de colágeno (0,041) e MMP-9 (0,035). Estas alterações nos componentes da matriz extracelular e na expressão das metalopeptidases podem levar à redução das células T CD4⁺ e, conseqüentemente, à imunossupressão e progressão da doença. É possível que a desorganização da MEC afete a migração de linfócitos T CD4⁺ para sua região de compartimentalização específica na PBE quando a mesma ainda é organizada o que poderia estar associado à falha no controle da carga parasitária, quadro de esplenomegalia e progressão da doença.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Immunopathological study of the spleen of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO MESTRADO

Aurea Virginia Andrade da Silva

The spleen is one of the major organs affected in canine visceral leishmaniasis (CVL). Disorganization of the splenic white pulp (SWP) has been associated with immunosuppression and disease progression. This study aims to evaluate structural and cellular changes in the splenic extracellular matrix of dogs with CVL correlating them with parasite load and clinical signs. 41 animals were grouped according to the SWP organization as: 1- Organized to slightly disorganized (OR-SD, n= 11); 2- Moderate to intense disorganization (MD-ID, n= 30). Splenic fragments were collected for the quantification of parasitic load through qPCR, histopathological analysis and immunohistochemistry. CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺, IFN- γ ⁺, IL-10⁺, MMP-9 and ADAM-10 cells were evaluated as well as expression of laminin, collagen and fibronectin. SWP disorganization was accompanied by a reduction in the number of lymphoid follicles/mm² (p> 0.0001). MD-ID animals showed high levels of clinical signs (p= 0.021), high laminin (p= 0.045) and collagen deposition (p= 0.036), increased MMP-9 expression (p = 0.035) T CD4⁺(p= 0.027). The data suggest that splenic disorganization in CVL involves a greater deposition of laminin and collagen. In addition, the animals were distributed in groups according to the parasite burden and the organization of the Splenic pulp white, where it was possible to observe that the disorganization can be a recent process to the infection, since animals with low parasite burden had disorganized pulp white (p=0.0002) and laminin deposition increasing (p= 0.005). Animals with disorganized white pulp and high parasite burden showed an increase in the expression of collagen (p=0.041) and MMP-9 (p=0.035). These changes in the extracellular matrix compounds and in the expression of the metallopeptidases can lead to the reduction of CD4⁺ T cells and, consequently, the immunosuppression and progression of the disease. It is possible that the ECM disorganization affects the migration of CD4⁺ T lymphocytes to its specific compartmentalization region in the PBE when it is still organized which could be associated with failure to control parasitic load, splenomegaly and disease progression.

Sumário

ABSTRACT	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
1. INTRODUÇÃO 1	
1.1. Leishmanioses	1
1.1.1 Espécies circulantes no velho e novo mundo	2
1.1.2 Vetor no novo mundo	3
1.1.3 Ciclo Biológico	5
1.1.4 Reservatório urbano	7
1.1.5 A co-infecção e Disseminação Parasitária	7
1.1.6 Imunopatologia na leishmaniose visceral	9
1.2 Baço 13	
1.2.1 Anatomia esplênica	14
1.2.2 Compartimentalização estrutural esplênica	15
1.2.2.1 Polpa vermelha esplênica	17
1.2.2.2 Zona Marginal esplênica	17
1.2.2.3 Polpa branca esplênica	18
1.2.3 Matriz extracelular esplênica	19
1.2.3.1 Matriz intersticial	20
1.2.3.1.1 Fibronectina	20
1.2.3.2 Membrana basal	21
1.2.3.2.1 Colágeno	23
1.2.3.2.2 Laminina	24
1.2.4 Função esplênica-Órgão mediador da resposta imune adaptativa	25
1.2.5 O baço na Leishmaniose visceral canina	28
1.2.5.1 Desorganização da matriz extracelular e a falha no controle da carga parasitária	28
2.0 OBJETIVOS 31	
2.1 Objetivo Geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3.0 METODOLOGIA 32	
3.1 Desenho experimental 32	
3.2 Aspectos éticos	33

3.3	Animais e avaliação clínica.....	33
3.4	Extração de DNA em tecido esplênico.....	34
3.5	Determinação da carga parasitária por qPCR.....	34
3.6	Histopatologia.....	36
3.7	Imunohistoquímica.....	36
3.8	Análise estatística.....	37
4.0	RESULTADOS	38
4.1	Onicogribose e dermatite foram os principais sinais clínicos presentes em cães naturalmente infectados.....	38
4.2	Animais com desorganização da polpa branca esplênica (PBE) apresentaram redução no número de folículos linfóides.....	38
4.3	A desorganização da PBE foi acompanhada de aumento do escore clínico	41
4.4	Aumento na deposição dos componentes da matriz extracelular (laminina e colágeno) está associado à desorganização da polpa branca esplênica.....	42
4.5	A expressão de metalopeptidase-9 é aumentada em animais com polpa branca esplênica desorganizada.....	46
4.6	Linfócitos CD4 ⁺ foram reduzidos no baço desorganizado.....	46
4.7	Associação da análise histopatológica com carga parasitária para estimar uma evolução relativa da infecção.....	51
5.0	DISCUSSÃO	56
6.0	CONCLUSÕES E HIPÓTESES	64
7.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
8.0	ANEXOS	84
8.1	Tabela descritiva dos dados estatísticos aplicados no estudo para organização da polpa branca esplênica.....	84
8.2	Tabela descritiva dos dados estatísticos aplicados no estudo para grupos combinados entre a carga parasitária e organização da polpa branca esplênica.....	85
8.3	Tabela resumindo os dados aplicados na estatística.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Distribuição por mapa geográfico das regiões com elevada incidência da Leishmaniose Visceral. Regiões marcadas de vermelho são Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia e Nepal.	1
Figura 1.2- Ciclo de vida do parasita <i>Leishmania sp</i>	6
Figura 1.3 Figura ilustrativa representando as estruturas esplênicas.....	15
Figura 1.4 Compartimentalização do tecido esplênico.....	16
Figura 1.5 Esquema representativo da glicoproteína fibronectina.....	21
Figura 1.6 Esquema representativo do arcabouço estrutural formados pelas interações entre laminina, colágeno e demais proteínas que constituem a membrana basal.....	22
Figura 1.7 Esquema ilustrativo dos monômeros de colágeno tipo IV e a sua participação na formação do arcabouço estrutural da membrana basal. Note a interação entre os dois domínios de cada fibra de colágeno e a união entre essas duas fibras para a formação do arcabouço.....	23
Figura 1.8 Representação esquemática da molécula de laminina e seus domínios.....	25
Figura 3.1 Desenho experimental.....	32
Figura 4.1 A frequência de sinais clínicos em cães naturalmente infectados com <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	40
Figura 4.2 Graus de desorganização da polpa branca esplênica em cães naturalmente infectados com <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	41
Figura 4.3 Animais com desorganização da PBE apresentam redução/atrofia do folículo linfóide.....	42
Figura 4.4 A desorganização da polpa branca é associada ao progresso da doença.....	43
Figura 4.5 Prancha comparativa entre a deposição dos componentes estruturais da MEC esplênica de cães com PBE organizada a desorganizada.....	45
Figura 4.6- Cães naturalmente infectados apresentam moderada a intensa desorganização da polpa branca esplênica (PBE) e aumento na deposição de laminina e colágeno.....	46

Figura 4.7- Análise da expressão de MMP-9 e ADAM-10 por imunohistoquímica....	48
Figura 4.8 Imunohistoquímica das subpopulações celulares e citocinas (IFN- γ e IL-10) no tecido esplênico de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	49
Figura 4.9- Animais com PBE desorganizada apresentam redução no número de linfócitos T CD4 ⁺ , porém não há mudança no processo de proliferação celular.....	50
Figura 4.10 Correlações entre os componentes da matriz extracelular (MEC), subpopulações de células e carga parasitária.....	51
Figura 4.11 O processo de desorganização da PBE é associado ao aumento na deposição dos componentes da MEC e tem início quando os animais apresentam baixa carga parasitária.....	53
Figura 4.12 Animais com PBE desorganizada e alta carga parasitária apresentam maior expressão de MMP-9 quando comparada aos demais grupos.....	54
Figura 4.13 O processo de proliferação celular não é afetado em cães naturalmente infectados, no entanto, animais com PBE desorganizada e baixa carga parasitária apresentam redução na subpopulação de linfócitos T CD4 ⁺	55

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 - Espécies vetoriais, espécies patogênicas e formas clínicas da Leishmaniose no velho e novo mundo.....	3
Tabela 1.2 Tabela descritiva demonstrando as regiões brasileiras onde o Vetor <i>Lutzomyia longipalpis</i> é localizado.....	5
Tabela 1.3 - Comparação entre os diferentes perfis imunológicos entre camundongos, hamsters, cães e humanos.....	13
Tabela 3.1 - Pontuação por escore dos sinais clínicos observados em cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i> (QUINNELL, 2001 modificado).....	34
Tabela 3.2 - Primers alvos e respectivas sequencias utilizados na quantificação da carga parasitária.....	35
Tabela 4.1 Estimativa relativa de evolução da imunopatogênese no baço de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i>	56
Anexo 8.1 Tabela descritiva dos dados estatísticos aplicados no estudo para organização da polpa branca esplênica.....	85
Anexo 8.2 Tabela descritiva dos dados estatísticos aplicados no estudo para grupos combinados entre a carga parasitária e organização da polpa branca esplênica.....	86
Anexo 8.3 - Tabela resumando os dados brutos aplicados na estatística.....	87

ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAM- Desintegrina e metaloprotease

B7- Coestimulador ligante de CD28 expressos em células apresentadoras de antígenos

BRC- Receptor de Linfócitos B

BSA- Albumina do soro bovino

CCL- Ligante de quimiocinas motivo C-C

CCR- Receptor de quimiocinas

CD28- Receptor expresso em linfócitos T para B7

CTLA-4- Antígeno 4 do linfócito T citotóxico

CXCL- Ligante de quimiocinas motivo C-X-C

DNA- Ácido desoxirribonucleico

EDTA- Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

HIGH- High Parasite Load (Alta carga parasitária)

HIGH/DS = carga parasitária elevada e polpa branca esplênica desorganizada moderada a intensa.

HIV- Vírus da imunodeficiência humana

HPRT- Hipoxantina fosforibosiltransferase

ID- Polpa branca intenso desorganizada

IFN- γ - Interferon gama

Ig-Imunoglobulina

IL- Interleucina

KI-67- Proteína nuclear expressa nas fases ativas do ciclo celular

LC- Leishmaniose cutânea

LM-Leishmaniose mucosa

LOW- Low parasite load (Baixa carga parasitária)

LOW/DS= carga parasitária baixa e polpa branca esplênica desorganizada moderada a intensa.

LOW/OR = carga parasitária baixa e polpa branca esplênica organizada a pouco desorganizada.

LV- Leishmaniose visceral

LVC- Leishmaniose visceral canina

MARCO- Sigla padrão de reconhecimento via receptor de macrófagos expressando estruturas de colágeno

MCH I/II- Complexo principal de histocompatibilidade de classes I e II

MD- Polpa branca médio/moderada desorganização

MMP- Metaloproteinases

mRNA- RNA mensageiro

OR- Polpa branca organizada

PALS- região de bainha periarteriolar (periarteriolar sheath)

PAMPs- Padrões moleculares associados a patógenos (Pathogen-associated molecular pattern)

PBE- Polpa branca esplênica

PBMC- Células mononucleares de sangue periférico (peripheral blood mononuclear cells)

PCR- Reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction)

PD- Polpa branca pouco desorganizada

PD-1- Morte programada 1 (programed death-1)

qPCR- **Reação em cadeia da polimerase em tempo real**

Rho- Proteína de ligação pertencente a família GTPases

RNA- Ácido ribonucleico

S1P- Esfingosina 1-fosfato

SIGN-R1- Proteína transmembranar Lectina do tipo C

ssrRNA- componente da pequena subunidade 30S dos ribossomos procarióticos.

SWP – Splenic White Pulp

TGF- β - Fator de transformação do crescimento

Th1/2- Linfócito T auxiliar (Linfócito T *helper*)

TLR- Receptor do tipo Toll like Presentes em linfócitos T (Toll-like receptor)

CXCR- Receptor de quimiocinas

DAMP- Padrões moleculares associados a danos

MMP-9- Metaloproteinase 9

TIMPs- Inibidores teciduais de metaloproteinases

SWP- Splenic White Pulp (Sigla em inglês para polpa branca esplênica)

PBE- Polpa branca esplênica

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmanioses

As leishmanioses são causadas por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*. São consideradas doenças infecciosas parasitárias com amplo espectro clínico, variando desde a forma clínica cutânea até a forma visceral, sendo considerada uma das doenças tropicais mais negligenciadas no mundo (ALVAR *et al.*, 2012). As principais formas clínicas das leishmanioses podem ser 1-Leishmaniose Cutânea (LC), 2-Leishmaniose mucosa (LM) e 3-Leishmaniose visceral (LV) (CHAPPUIS *et al.*, 2007; ALVAR *et al.*, 2012; BORGHI *et al.*, 2016). Estima-se que 98 países e territórios são endêmicos para as leishmanioses, tendo 0,2-0,4 milhões de novos casos para a LV e 0,7-1,3 milhões de novos casos para LC (BORGHI *et al.*, 2016). Dentre as formas clínicas, a LV destaca-se das demais por ser a forma mais grave, por ter caráter crônico e envolvimento sistêmico apresentando elevada letalidade em indivíduos não tratados e em crianças desnutridas (BRASIL *et al.*, 2003). Além disso, quando comparados os números de incidência da LV, o Brasil tem apresentado maior frequência do número de casos incidentes, seguidos por Paraguai e Colômbia, com aproximadamente 6.300, 200 e 110 casos novos por ano, respectivamente. Além do Brasil, outros países como Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão são áreas endêmicas para LV (Etiópia 1200 casos estimados por ano; Sudão 30.300 casos estimados por ano; Bangladesh 24.900 casos estimados por ano) (ALVAR *et al.*, 2012; CHAPPUIS *et al.*, 2007). Figura 1.1.



Figura 1.1- Distribuição geográfica das áreas endêmicas para LV. Regiões marcadas de vermelho são áreas endêmicas localizadas em países como Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia e Nepal. doi:10.1038/nrmicro1748

Apesar da ampla incidência dos casos de LV e LC no Brasil, essas doenças seguem negligenciadas e subnotificadas. São consideradas como importante problema de saúde pública devido a dificuldades no controle, diagnóstico e acesso a regiões de matas, além da rápida urbanização e adaptação ao ambiente domiciliar do principal vetor de disseminação da *Leishmania*, o díptero *Lutzomyia longipalpis* e a presença do reservatório doméstico neste ambiente (URSINE *et al.*, 2016).

1.1.1 Espécies circulantes no velho e novo mundo

A leishmaniose é uma doença amplamente distribuída por todos os países pertencentes ao clima tropical e subtropical e estima-se que 350 milhões de pessoas corram o risco de contrair a doença (ALVAR *et al.*, 2012). O parasita *Leishmania* spp. é o agente etiológico da leishmaniose, doença que apresenta amplo espectro clínico, desde a forma autorresolutiva observada na LC até a forma mais grave da infecção, a LV.

As manifestações clínicas variam de acordo com a espécie do parasita e populações infectantes, podendo apresentar pleomorfismo clínico bem como diferentes respostas frente ao tratamento composto por antimoniais, que são drogas aplicadas no tratamento das leishmanioses (FERREIRA *et al.*, 2012; Boité, 2014). O parasita do gênero *Leishmania* pertence ao subreino Protozoa, a ordem Kinetoplastida e a família Tripanosomatidae, apresentando três subgêneros *Leishmania*, *Viannia* e *Sauroleishmania*. Os dois primeiros subgêneros são os que apresentam maior distribuição pelos trópicos (WHO, 2010).

Segundo Boité (2014), 21 espécies de *Leishmania* das 31 já descritas são infectantes para humanos. Além disso, tais espécies foram agrupadas em 2 subgêneros, o subgênero *Viannia* restrita a região neotropical no novo mundo que compreende o México, Península da Baixa Califórnia, Sul da Flórida, Ilhas do Caribe e América do Sul, e o subgênero *Leishmania* presente nas regiões do velho mundo como a Paleoártica que compreende a Europa, Norte da África, grande parte da Arábia e Ásia (KERR, 2000). No entanto, o subgênero *Leishmania* pode ocorrer tanto no velho mundo (regiões Paleoártica, Africana e Asiática), como no novo mundo (regiões neotropicais e sul neoártico).

Dentro do subgênero *Leishmania* pode-se destacar os complexos *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) tropica* e *Leishmania (Leishmania) mexicana*. As manifestações clínicas difusas são associadas a espécie *Leishmania (Leishmania) mexicana*, ao passo que, as demais espécies do subgênero

Leishmania, como *Leishmania (Leishmania) infantum* estão associadas à forma clínica visceral (CUPOLILLO *et al.*, 2014). Já o subgênero *Viannia* tem como principais representantes os complexos *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* sendo responsáveis por causar as manifestações clínicas cutânea, cutâneo-difusa, mucocutânea (CUPOLILLO *et al.*, 2014). Apesar destas definições entre as espécies e as formas clínicas serem bem definidas, muitas destas espécies associadas às formas cutâneas, como por exemplo, a *Leishmania (Viannia) braziliensis* tem sido encontrada em vísceras. Neste contexto, Morgado e colaboradores (2016) descreveram a visceralização da espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* em baço de cães naturalmente infectados além de co-infectados com *Hepatozoon canis*, demonstrando que a co-infecção favorece o perfil de imunocomprometimento do sistema imunológico corroborando para o agravamento da infecção.

1.1.2 Vetor no novo mundo

A leishmaniose apresenta uma ampla gama de formas clínicas que variam desde a Leishmaniose cutânea até a forma visceral da doença (CAVALCANTI *et al.*, 2015). Tal variância da forma clínica está associada com a espécie vetora além da espécie infectante (SHARMA & SINGH *et al.*, 2008). É descrito na tabela 1.1 os vetores do novo mundo e velho mundo, respectivamente, espécies do parasita infectante e a forma clínica observada.

Tabela 1.1- Espécies vetoriais, espécies patogênicas e formas clínicas da Leishmaniose no velho e novo mundo.

Espécies vetoriais, agentes etiológicos e principais manifestações clínicas da Leishmaniose.		
Espécie vetorial	Agente etiológico	Manifestação clínica
<i>Lutzomyia whitmani</i>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	Leishmaniose cutânea e mucocutânea
<i>Lutzomyia evansi</i>	<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	Leishmaniose Visceral
<i>Lutzomyia panamensis</i>	<i>Leishmania (Viannia) panamensis</i>	Leishmaniose cutânea e mucocutânea
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> , <i>mexicana</i> e outras espécies.	Leishmaniose cutânea e mucocutânea e Leishmaniose Visceral
<i>Phlebotomus argentipes</i>	<i>Leishmania (Leishmania) donovani</i>	Leishmaniose Visceral
<i>Phlebotomus perniciosus</i>	<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	Leishmaniose Visceral

Adaptado de SHARMA & SINGH *et al.*, 2008

A leishmaniose tem sofrido mudanças no processo de distribuição territorial, não estando somente associada aos aspectos socioeconômicos, mas também ao processo de urbanização (VILELA *et al.*, 2014). Tem sido observada a adaptação do vetor em ambientes urbanos, em regiões periféricas de grandes centros, em ambientes domiciliares, galinheiros, chiqueiros, canis, paióis e demais ambientes peridomiciliares (BRASIL, 2003).

Em relação ao comportamento do vetor, o mesmo apresenta comprimento de 1-3 mm, possui coloração acastanhada e apresenta fase adulta adaptada a diferentes ambientes. No entanto, na fase larval o mesmo tem sido encontrado em ambientes úmidos ricos em substâncias orgânicas, uma vez que tanto machos quanto fêmeas necessitam de componentes orgânicos como fonte energética. O repasto sanguíneo é realizado somente por fêmeas para a completar seu ciclo gonotrófico e postura dos seus ovos (BRASIL, 2003; SPIEGEL *et al.*, 2016). Assim, os fatores que podem favorecer a transmissão do agente etiológico das Leishmanioses são a distribuição do inseto pelos diferentes ambientes terrestres, a sua abundância em uma determinada área, os hábitos alimentares, fonte do agente infectante para o díptero bem como o seu perfil antropofílico que constituem a capacidade vetorial do inseto (BRASIL, 2003; LAISON & RANGEL, 2005; VILELA *et al.*, 2014).

Tabela 1.2 Tabela descritiva demonstrando os estados brasileiros onde houve ocorrência do Vetor *Lutzomyia longipalpis*.

Estados brasileiros onde tem sido descrito a presença do vetor *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*.

(VILELA *et al.*, 2014)

**Alagoas
Bahia
Ceará
Distrito Federal
Goiás
Maranhão
Mato Grosso do Sul
Minas Gerais
Pará
Paraíba
Rio de Janeiro
Rio Grande do Norte
Rio Grande do Sul
Rondônia
Roraima
São Paulo
Tocantins**

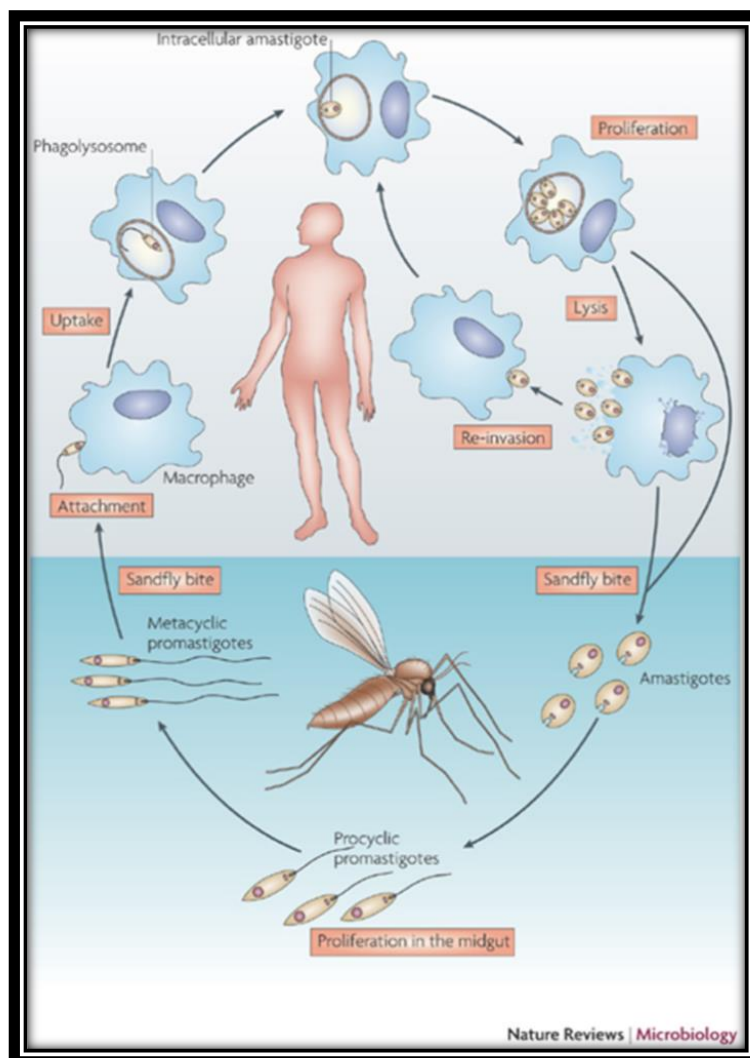
Fonte: VILELA *et al.*, 2014. Leishmaniose do Continente Americano. Capítulo 10, página 183-192.

1.1.3 Ciclo Biológico na LV

O ciclo biológico para o parasita *Leishmania* sp. é iniciado através das fêmeas do inseto flebotomíneo onde se destacam os gêneros *Phlebotomus*, frequente no velho mundo e *Lutzomyia*, frequente no novo mundo (SHARMA & SINGH *et al.*, 2008). Apesar de 600 espécies do vetor serem conhecidas, aproximadamente 60 espécies são vetores para as Leishmanioses (SHARMA & SINGH *et al.*, 2008).

Dentre as 60 espécies que transmitem o parasita, a espécie vetora *Lutzomyia longipalpis* destaca-se como importante transmissor das formas promastigotas metacíclicas da *Leishmania (L.) infantum* no novo mundo. Tais formas evolutivas, no hospedeiro mamífero, são interiorizadas por macrófagos e células dendríticas onde se diferenciam em amastigotas. Tal diferenciação é estimulada pela acidez presente no fagolisossomo. As formas amastigotas replicam no interior das células fagocíticas, rompendo as membranas destas células e reiniciando o processo de invasão celular. Fêmeas do díptero *Lutzomyia longipalpis* necessitam realizar repasto sanguíneo para o desenvolvimento ovariano, pois proteínas

presentes no sangue provenientes de mamíferos estimulam a postura dos seus ovos (READY, 1979). Assim, ao realizar o processo de repasto sanguíneo em animais infectados, como por exemplo, o cão, tais dípteros ingerem as formas amastigotas presentes na derme do mamífero infectado. Na luz do tubo digestivo no flebotomíneo, se diferenciam em promastigotas procíclicas, após a degradação da matriz peritrófica, e aderem ao epitélio do intestino do vetor. Após alguns dias, se transformam em promastigotas metacíclicas, formas infectantes para o hospedeiro intermediário (LAINSON, RAYN & SHAW, 1987; CHAPPUIS *et al.*, 2007). Na figura 1.2 é possível observar, de forma resumida, o ciclo do parasita *Leishmania*.



Hospedeiro vertebrado

Hospedeiro invertebrado

Figura 1.2 Ciclo de vida do parasita *Leishmania* sp. As formas promastigotas de *Leishmania* sp. são transmitidas ao hospedeiro por fêmeas do inseto vetor durante o repasto sanguíneo. Uma vez transmitidos, os parasitas são internalizados por células dendríticas e macrófagos na derme transformando-se nas formas amastigotas. As amastigotas se multiplicam, destroem a célula hospedeira e infectam outras células fagocíticas disseminando-se através dos sistemas linfático e vascular, eventualmente infiltrando a medula óssea, fígado e baço. Texto adaptado. Chappuis *et al.*, 2007. doi:10.1038/nrmicro1748

1.1.4 Reservatório urbano

O cão tem sido implicado como principal reservatório urbano do parasita e fonte de infecção para o vetor *Lutzomyia longipalpis*, uma vez que estes mamíferos apresentam intensa carga parasitária na pele e sangue (BORJA *et al.*, 2016). Além disso, nestes mamíferos a doença é fatal devido à escassez de medicamentos eficazes para uso em animais, sendo adotado o procedimento de eutanásia de animais infectados, uma vez que para humanos, a presença de cães infectados oferece risco para a aquisição da LV (ASLAN *et al.*, 2016). Apesar de na forma assintomática os cães apresentarem um padrão de resposta celular do tipo I, isto é, baixa carga parasitária, ausência de sinais clínicos e formação de granuloma, presença de células T, macrófagos e células dendríticas e elevada expressão de INF- γ , tais cães também são eutanasiados uma vez que é frequente a conversão da forma assintomática para sintomática com alta carga parasitária (SAPORITO *et al.*, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2010).

Na leishmaniose visceral canina, os sinais clínicos mais comuns são: onicogribose, emaciação, dermatite, linfadenopatia, alopecia e ceratoconjuntivite (LIMA *et al.*, 2014; CAVALCANTI *et al.*, 2015). Também há o acometimento de vísceras como rins, linfonodos, fígado, trato gastrointestinal, além do sistema nervoso central e medula óssea (SILVA *et al.*, 2013). O acometimento de múltiplos órgãos se dá através do tropismo observado em algumas espécies de *Leishmania* sp como, por exemplo, a espécie *Leishmania (L.) infantum* para vísceras, além de co-infecções, que facilitam a visceralização de espécies dermatrópicas devido a imunodepressão, assim caracterizando a leishmaniose visceral como infecção multissistêmica (OLIVEIRA *et al.*, 2013; MORGADO *et al.*, 2016).

1.1.5 A co-infecção e Disseminação Parasitária

A leishmaniose visceral é uma importante doença sistêmica grave caracterizada por evolução progressiva e acometimento de múltiplos órgãos incluindo baço, fígado, linfonodos, medula óssea, rins, pele, testículos, epidídimo, próstata e coração (DINIZ *et al.*, 2005; MARANGONI *et al.*, 2011; MANNA *et al.*, 2012; MENDES *et al.*, 2013). Dentro do espectro clínico das leishmanioses, os principais agentes etiológicos responsáveis pela forma visceral são *Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania (Leishmania) infantum* no velho mundo, que tem como principal vetor o díptero de Gênero *Phlebotomus*. Por outro lado, no novo mundo a espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* é o principal agente etiológico

da leishmaniose visceral e seu vetor é o díptero do gênero *Lutzomyia* (DESJEUX. 2004). A visceralização de espécies pode estar associada tanto ao padrão de virulência quanto às co-infecções existentes que comprometem o sistema imunológico. Este tipo de interação pode ser observado, por exemplo, em pacientes co-infectados com o vírus HIV. Neste contexto, há depleção de linfócitos TCD4⁺ resultando no quadro de imunossupressão e piora do quadro clínico da leishmaniose (ALVAR *et al.*, 1997; EZRA *et al.*, 2010). Em cães, a co-infecção com *Hepatozoon canis* associada à visceralização da espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* já foi descrita (Morgado *et al.*, 2016). Oliveira e colaboradores (2013) descreveram a visceralização de *Leishmania braziliensis* no fígado, baço e linfonodos em cães naturalmente infectados em regiões endêmicas do estado do Rio de Janeiro. A partir do resultado de PCR e ferramentas moleculares concluíram que a visceralização desta espécie variou de acordo com a população infectante e circulante na região endêmica, porém não fizeram menção a possibilidade de co-morbidades nos animais (LINDOSO *et al.*, 2016; MORGADO *et al.*, 2016; PARMENTIER *et al.*, 2016).

Além de co-infecções, a desnutrição proteica é um importante fator causador de déficit na resposta imune e está associado à susceptibilidade em diversas doenças, pois favorece o quadro de imunossupressão e falha no controle da carga parasitária (CUNNINGHAM-RUNDLES *et al.*, 2008; CUERVO-ESCOBAR *et al.*, 2014). Camundongos experimentalmente infectados e submetidos à dieta de restrição proteica exibiram diminuição das subpopulações celulares tímicas e esplênicas bem como a atrofia destes órgãos o que pôde ser relacionado à diminuição da expressão do mRNA de citocinas como TGF-β, IL-10 e IL-4, citocinas que são reguladoras do processo de proliferação que por sua vez apresentaram desregulação na expressão do mRNA em animais infectados e desnutridos (CUERVO-ESCOBAR *et al.*, 2014). Thissen & Underwood (1991) descrevem que em ratos com restrição proteica há deficiência na tradução do mRNA bem como na síntese/exportação de proteínas. Cuervo-Escobar e colaboradores (2014) descrevem que neste mesmo modelo experimental não foram detectáveis níveis de IL-12, IFN-γ e IL-10 indicando prejuízo na síntese/expressão destas importante citocinas no desenvolvimento da resposta imune mediada por célula que é eficaz contra o parasita intracelular (RODRIGUES *et al.*, 2016). Estes dados juntos podem sugerir que a restrição proteica favorece a susceptibilidade à infecção.

Estes dados em conjunto reforçam a influência de co-infecções e desnutrição no processo de falha no controle da carga parasitária e o agravamento da doença na leishmaniose. No contexto na leishmaniose visceral, estes fatores poderiam agravar a falha no controle da carga parasitária e contribuir para a elevada parasitemia e severidade da doença que são

observadas em cães naturalmente infectados em regiões endêmicas, intensificando o papel do cão como reservatório urbano (MORGADO *et al.*, 2016; CUERVO-ESCOBAR *et al.*, 2014).

1.1.6 Imunopatologia na leishmaniose visceral

Após o repasto sanguíneo, as formas promastigotas metacíclicas regurgitadas na junção dermo-epidérmica do hospedeiro vertebrado são interiorizadas por células do sistema fagocítico mononuclear, macrófagos residentes na pele, assim como por células dendríticas e neutrófilos, e em diferentes órgãos como fígado, baço e linfonodo (MENDES *et al.*, 2014). A pele é o tecido inicialmente afetado pelo parasita. O modelo experimental murino resistente à infecção por *Leishmania major* é a cepa C57Bl/6. Neste, a resposta imune eficaz no controle de parasitas intracelulares é aquela mediada por células Th1 somada à secreção de IFN- γ , TNF- α , IL-2 e recrutamento de células para a formação de granulomas (ROGERS *et al.*, 2002; BARBIÉRI., 2006). Por outro lado, animais suscetíveis como os B10.D2 e BALB/c apresentam desenvolvimento da resposta imune mediada por células Th2. Nestes, há expressão de IL-4 e IL-10, citocinas que atuam na regulação negativa das subunidades do receptor para IL-12 diminuindo o desenvolvimento da resposta Th1 e macrófagos (ROGERS *et al.*, 2002; BARBIÉRI., 2006; FARIA *et al.*, 2009). No caso de infecção por *L. infantum*, os camundongos são resistentes à infecção e alcançam a cura espontânea após algumas semanas, com resposta imune mista Th1/Th2 limitando seu uso para estudos de longo termo e também com resultados translacionais difíceis para a infecção humana ou canina (PORROZZI *et al.*, 2014).

Outro modelo experimental bastante aplicado nos estudos para entendimento da imunopatogenia da leishmaniose visceral é o hamster dourado por apresentar alta susceptibilidade à infecção (PORROZZI *et al.*, 2014). Hamsters dourados, quando infectados experimentalmente por *Leishmania (Leishmania) donovani*, mimetizaram a manifestação visceral observada em humanos, a partir da supressão da resposta Th1 específica na fase ativa da infecção, ativação policlonal de linfócitos B, hiperplasia, parasitismo em células de Kupffer e formação de granulomas no espaço portal no fígado. Além disso, Goto & Lindoso (2004) relataram que neste modelo experimental há o desenvolvimento da forma progressiva da LV com hipergamaglobulinemia e pancitopenia. Também têm sido descritas diminuição da proliferação linfocitária, alterações morfológicas nos hepatócitos e hepatoesplenomegalia (REQUENA *et al.*, 2000). No entanto, estudos de análise de citocinas expressas durante a LV em fígado de hamsters demonstram uma marcante expressão de IFN- γ , IL-12 e IL-4, além de TNF, que juntos conferem característica de infecção auto-limitante no fígado. De forma

contrária, no baço destes animais há processo de esplenomegalia relacionado à persistência do parasita, desorganização da microarquitetura esplênica, falha no controle da replicação de formas amastigotas, e interessantemente, a exacerbação da expressão de TNF. O aumento de TNF pode estar associado ao dano na arquitetura esplênica e disfunção imunológica resultando no estágio inflamatório crônico (ENGWERDA *et al.*, 2004). Apesar da mimetização da infecção observada em humanos, o modelo de hamsters apresenta dificuldades na sua aplicação devido a dificuldades na comercialização da linhagem isogênica desta espécie além da disponibilidade reduzida de insumos para pesquisas específicos para hamsters, restringindo os estudos da imunopatologia das leishmanioses (REQUENA *et al.*, 2000; ENGWERDA *et al.*, 2004; PORROZZI *et al.*, 2014).

Alvar e Moreno (2002) descreveram que cães são excelentes modelos para o entendimento da imunopatologia da LV e têm sido considerados possíveis reservatórios do parasita dentro do ambiente urbano devido a sua relação com humanos e seu papel na manutenção do ciclo do parasita (ALVAR E MORENO, 2002; BRASIL, 2003), além disso, como medida preventiva tem sido indicada a eutanásia de cães infectados (BRASIL, 2003). Tanto em cães naturalmente infectados como experimentalmente infectados são aplicados nos estudos da LV, o que tem contribuído para os avanços nas pesquisas de novos medicamentos e componentes e componentes vacínicos, uma vez que este modelo é excelente para o entendimento da imunopatologia da LV (GOTO & LINDOSO *et al.*, 2004).

Em cães, tem sido descrito o acometimento de linfonodos, fígado, baço, medula óssea além de sistema nervoso central e órgãos genito-urinários (OLIVEIRA *et al.*, 2012; MELO *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013; MENDES *et al.*, 2014). Além disso, tem sido descritas hepatoesplenomegalia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia, linfadenopatia, onicogrifose, disfunção renal e perda de peso que são sinais clínicos observados também em humanos com LV (CARDOSO *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2009). A resposta imunológica em cães apresenta dois perfis, o perfil Th1 e o Th2. No perfil Th1 observa-se a expressão de citocinas como TNF- α , IFN- γ e IL-2, além da ativação da ação microbicida de macrófagos e produção de óxido nítrico que agem no controle da carga parasitária estando associada à resistência a infecção observada principalmente em cães assintomáticos (PINELLI *et al.*, 1994; MANNA *et al.*, 2012). No entanto em cães sintomáticos, onde pode ser observada a progressão da doença, há o marcante perfil de resposta Th2, associado à suscetibilidade a infecção (REINER & LOCKSLEY, 1995). Durante o desenvolvimento da resposta Th2 há a expressão de citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β além de uma marcada produção de imunoglobulinas e imunossupressão, uma vez que a resposta humoral não é eficaz contra o

parasita intracelular, favorecendo sua replicação e aumento da carga parasitária (RODRÍGUEZ-CORTÉS *et al.*, 2016). Além disso, cães sintomáticos apresentam alto parasitismo tissular, sendo fonte do parasita para o inseto vetor (SILVA *et al.*, 2015).

Moreno e Alvar (2002) apontam que em infecção experimental canina a resposta imune desenvolvida pode apresentar diferentes perfis. Além disso, Cães apresentam alterações clínicas, patológicas e imunológicas semelhantes as que são observadas em humanos e por isso têm sido um ótimo modelo para fornecer conhecimento sobre a imunopatologia da leishmaniose visceral tanto humana como canina (PORROZZI *et al.*, 2014). É importante destacar aqui que a aplicação de cães como modelo de estudo para o entendimento da imunopatologia da leishmaniose visceral é a possibilidade de estudar a infecção em modelo natural, que apresenta influência do meio ambiente, como demais co-infecções e desnutrição abrangendo assim vários aspectos imunológicos da infecção (MORENO & ALVAR, 2002; GOTO & LINDOSO 2004; ALVES *et al.*, 2010).

Alguns dos sinais clínicos observados nos modelos experimentais descritos acima também são relatados para humanos com leishmaniose visceral nos quais febre, hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia e hiperglobulinemia são sintomas frequentemente observados na forma humana da LV (BARRAL-NETTO *et al.*, 1991). Além destes sintomas, as condições ambientais, a idade e o estado nutricional são fatores que influenciam a intensidade da infecção do indivíduo (CALDAS *et al.*, 2002; BERN *et al.*, 2007).

A resposta imunológica observada em humanos pode ser dividida em perfil pró-inflamatório com a expressão de IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ e TNF- α principalmente no soro de indivíduos resistentes a infecção, além disso, a expressão de IFN- γ no baço e medula óssea é aumentada (ANSARI *et al.*, 2006). Por outro lado, Nylén e colaboradores (2007) descreveram que no soro de pacientes com leishmaniose visceral há elevados níveis de IL-10 e IL-10 mRNA no baço destes mesmos indivíduos. A elevada expressão de IL-10 tanto no soro quanto no baço, linfonodos e medula óssea de indivíduos infectados pode agir de forma supressora na imunidade mediada por células, regulando negativamente a expressão de IFN- γ e diminuindo a ação microbicida de macrófagos. Além disso, a expressão de IL-10 no baço pode também regular negativamente a expressão de TNF que segundo Kaye e colaboradores (2004) atua na manutenção da arquitetura esplênica, podendo estar associada à falha no controle da carga parasitária, ruptura do tecido esplênico e progressão da doença (KAYE *et al.*, 2004; COSTA & COSTA, 2014). De uma forma geral, estudos acerca da leishmaniose visceral têm apontado a disseminação e acometimento de fígado, linfonodos, medula óssea e baço. No fígado tem sido descrito que durante a infecção por *Leishmania* (*Leishmania*)

infantum, a matriz extracelular desempenha importante papel para a homeostase e manutenção da arquitetura lobular hepática e que durante a infecção ocorre o aumento na deposição de seus componentes como laminina, fibronectina e colágeno. Além disso, foi observado aumento de tamanho, dano hepático, reação inflamatória granulomatosa na capsula, no espaço portal, veias hepáticas e espaço perisinusoidal (ASHKAN *et al.*, 2008; MELO *et al.*, 2009). Baranwal e colaboradores (2007) descreveram relato de caso de 11 crianças que apresentaram falha hepática fulminante. Os mesmos autores descrevem que em pacientes co-infetados por HIV o fígado apresenta regiões de inflamação, hiperplasia de células de kupffer, presença de amastigotas, formação ineficaz de granuloma, necrose focal e fragmentada do tecido hepático.

Assim, o fígado, órgão responsável pelo metabolismo e homeostase imunológica a partir da mediação da resposta pró-inflamatória, detoxificação, produção de energia, conversão de nutrientes e balanço hormonal, é seriamente afetado na leishmaniose visceral contribuindo para a progressão da doença por sepsia ou falha hepática fulminante (BARANWAL *et al.*, 2007; MELO *et al.*, 2009; YAN *et al.*, 2014).

O fígado tem papel central desde a homeostase e resposta inflamatória até a metabolização de nutrientes, sendo de extrema importância na eliminação de bactérias e toxinas durante a resposta imunológica. No entanto, a resposta imune desencadeada neste órgão pode resultar em processo inflamatório, imunossupressão e dano tecidual (YAN *et al.*, 2014). Por outro lado, linfonodo e baço são órgãos linfoides secundários. Atuam na interação entre células apresentadoras de antígenos e linfócitos T e B, na eliminação de antígenos vindos pelos vasos linfáticos e sangue, destruição de hemácias entre outras funções. São divididos em córtex e região medular, polpa branca e polpa vermelha, respectivamente (ABBAS, 2011). Além do fígado, os linfonodos também são órgãos chave na eliminação de células infectadas atuando na filtração de fluidos vindos dos tecidos. São constituídos por capsula, seios subcapsular, córtex compartimentalizado em região de linfócitos B e centro germinativo- folículos, região paracórtex composta por linfócitos T e seio medular (ELMORE, 2006). Análises histopatológicas de linfonodos na LV têm demonstrado engrossamento da cápsula, inflamação crônica, reação inflamatória no seio subcapsular, hiperplasia folicular em área cortical, hipertrofia e hiperplasia de macrófagos no seio medular, congestão, hemosiderose e carga parasitária (Lima *et al.*, 2004)

Em relação à resposta imune celular nos linfonodos, Alves e colaboradores (2009) descreveram que animais assintomáticos apresentaram maior expressão de IFN- γ , IL-12 e

TNF- α , que são citocinas envolvidas na resposta imune mediada por células e eficazes para o controle da carga parasitária. Nestes mesmos animais, a carga parasitária foi menor quando comparados aos animais sintomáticos, nos quais a expressão de IL-10 foi maior, inclusive quando comparados ao grupo controle. Esses dados juntos reforçam a hipótese de que nos linfonodos a resposta imune celular efetora está diretamente envolvida no controle da carga parasitária e na progressão ou não da doença. A tabela 1.3 resume os diferentes perfis imunológicos entre os principais modelos de estudos da LV.

Tabela 1.3- Comparação entre os diferentes perfis imunológicos entre camundongos, hamsters, cães e humanos.

O perfil imunológico varia de acordo com a espécie infectada por <i>Leishmania (L.) infantum</i>.				
Espécies	Fenótipo	Perfil Imunológico	Citocinas predominantes	Referência
Camundongo (<i>Mus musculus</i>)	Susceptível/Resistente Dependendo da cepa de camundongo (aguda até a 4ª semanas e Autorresolutiva ao fim da 8ª semana)	Indivíduos Resistentes= Predomínio Th1 Indivíduos Susceptíveis= Predomínio Th2 O perfil imunológico irá depender da cepa de camundongo analisada	Th1-- IL-2, IL-12, TNF e IFN- γ Th2-- TGF- β , IL-10 e IL-27 Resposta órgão-específica	Stager <i>et al.</i> , 2003; Porrozzì <i>et al.</i> , 2014.
Hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>)	Susceptível	Th2 e supressão da resposta Th1	IFN- γ , IL-12 e IL-4 e aumento de TNF associado a desorganização da polpa branca esplênica além de imunossupressão de linfócitos T.	REQUENA <i>et al.</i> , 2006; ENGERDA <i>et al.</i> , 2004; Porrozzì <i>et al.</i> , 2014.
Cão (<i>Canis familiaris</i>)	Assintomáticos=Resistentes/ Infecção recente Sintomáticos= Susceptíveis	Assintomáticos= Th1/Th17A Sintomáticos= Th2 e supressão de Th1 e Th17 A	Assintomáticos= Th1--TNF- α , IFN- γ , TGF- β e IL-2. Th17A—IL-17 mRNA Sintomáticos=Th2--IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β	PINELLI <i>et al.</i> , 1994; MANNA <i>et al.</i> , 2012; Nascimento <i>et al.</i> , 2015; Porrozzì <i>et al.</i> , 2014. RODRIGUEZ-CORTÉS <i>et al.</i> , 2016
Humano (<i>Homo sapiens sapiens</i>)	Indivíduos Resistentes Indivíduos Susceptíveis	Th1/Th2 Indivíduos Resistentes= Predomínio Th1 Indivíduos Susceptíveis= Predomínio Th2 O perfil da resposta imunológica em humanos não é nítido havendo uma resposta Th1/Th2	Indivíduo Resistentes= Em soro IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ e TNF- α . No baço IFN- γ . Indivíduos Susceptíveis= Elevada expressão de IL-10 no baço, baixa expressão IFN e TNF.	KAYE <i>et al.</i> , 2004; ANSARI <i>et al.</i> , 2006; COSTA & COSTA, 2014

1.2 Baço

O baço é um órgão linfoide secundário que apresenta ampla diversidade celular e microambiente altamente compartimentalizado. Neste órgão é iniciado o desenvolvimento da resposta imunológica adaptativa frente a patógenos recolhidos do sangue. Este órgão alberga as células necessárias para o desenvolvimento da resposta imunológica, segregadas em áreas específicas e regiões de interação e apresentação antigênica (SANTANA *et al.*, 2008; MEBIUS & KRAAL, 2005). É um órgão altamente vascularizado (Figura 1.3, arteríola

trabelcular, central e folicular) que tem como papel central a eliminação de células senescentes, eritrócitos e partículas como, por exemplo, imunocomplexos e microorganismos opsonizados. A função esplênica somada a sua estrutura tecidual altamente compartimentalizada confere ao baço a característica de órgão fundamental para o desenvolvimento da imunidade reativa contra diversos microorganismos oriundos do sangue (MEBIUS & KRAAL, 2005).

1.2.1. Anatomia esplênica

O baço é localizado na região hipogástrica esquerda, apresenta textura maciça e é um órgão altamente vascularizado devido a essa característica apresenta coloração vermelho vivo ou violáceo, apresenta formato alongado e curvilíneo, seu tamanho pode variar entre espécies (MEBIUS & KRAAL, 2005). Além disso, este órgão é envolto por uma camada de tecido conectivo que em alguns momentos formam ramificações por dentro da polpa vermelha formando as estruturas trabeculares que dão sustento ao tecido altamente vascularizado. Os ramos menores da artéria aferente são envoltos por tecido linfoide que formam a polpa branca esplênica. Os ramos das artérias podem percorrer a polpa branca e chegar à polpa vermelha, formando o sistema de vascularização da polpa vermelha (MEBIUS & KRAAL, 2005). Além da sua compartimentalização, o baço conta com uma matriz extracelular altamente especializada que forma o sustento estrutural deste órgão (MEBIUS & KRAAL., 2005; LOKMIC *et al.*, 2008).

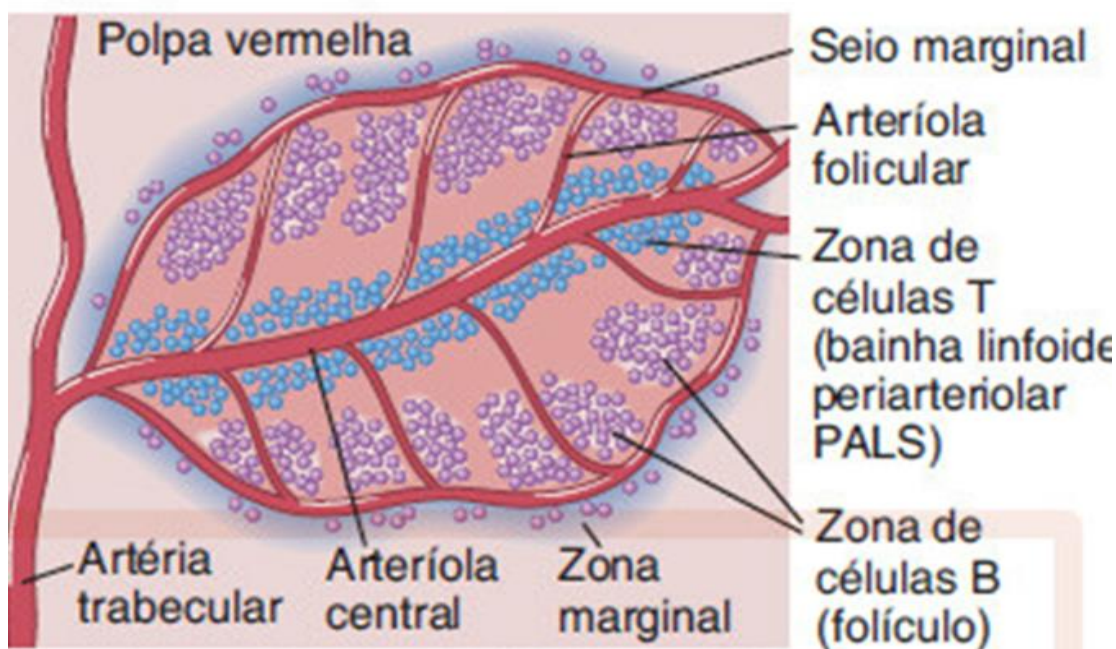


Figura 1.3- Figura ilustrativa representando as estruturas esplênica como zona marginal, zona de células B, bainha periarteriolar onde se encontram células T e arteriola central-Polpa branca. A artéria trabecular corta a polpa vermelha. Esquema ilustrativo, fonte: ABBAS, 2011. 7ª Edição.

1.2.2 Compartimentalização estrutural esplênica

O parênquima esplênico é anatômica e funcionalmente dividido em polpa vermelha e polpa branca. A polpa vermelha é composta basicamente por sinusóides capilares, células estromais, hemácias, macrófagos e células dendríticas, que auxiliam no processo de filtração do sangue, destruição de eritrócitos e eliminação de imunocomplexos a partir do sistema venoso ricamente distribuído por todo tecido esplênico (MEBIUS & KRAAL., 2005; LOKMIC *et al.*, 2008; ABBAS, 2011). Além da polpa vermelha, o baço também é dividido em polpa branca, estrutura altamente compartimentalizada em zona de células T ou bainha linfóide periarteriolar (PALS), região de células B, centro germinativo rico em linfócitos B plasmocitóides e zona marginal. Vale ressaltar a presença da arteriola folicular, uma ramificação da arteriola central que por sua vez se originou da ramificação da artéria trabecular (MEBIUS & KRAAL., 2005; LOKMIC *et al.*, 2008; ABBAS, 2011) (Figura 1.4). Os dois compartimentos funcionais esplênicos não divergem somente na quantidade de células, mas também pela constituição da matriz extracelular estrutura que fornece sustentação aos diferentes compartimentos esplênicos. As fibras reticulares da polpa vermelha

apresentam diâmetro menor do que as fibras reticulares da polpa branca (30-50nm, 1-2µm respectivamente) (MEBIUS & KRAAL, 2005). Além disso, a polpa vermelha é formada por componentes da membrana basal como colágeno IV, perlecan, nidogênio e laminina. Somada a essa membrana basal há a membrana microfibrilar composta por fibrilina 2 e colágeno IV. Estes constituintes da matriz extracelular da polpa vermelha contribuem para a função de retenção de eritrócitos (LOKMIC *et al.*, 2008). Embora a polpa vermelha apresente função complementar a polpa branca, a polpa branca diverge na sua composição de matriz extracelular. A polpa branca é separada da polpa vermelha pela zona marginal, composta por membrana basal contendo redes de fibras reticulares grossas e densas. Na zona marginal é possível observar linfócitos T e B além de macrófagos e células dendríticas (LOKMIC *et al.*, 2008).

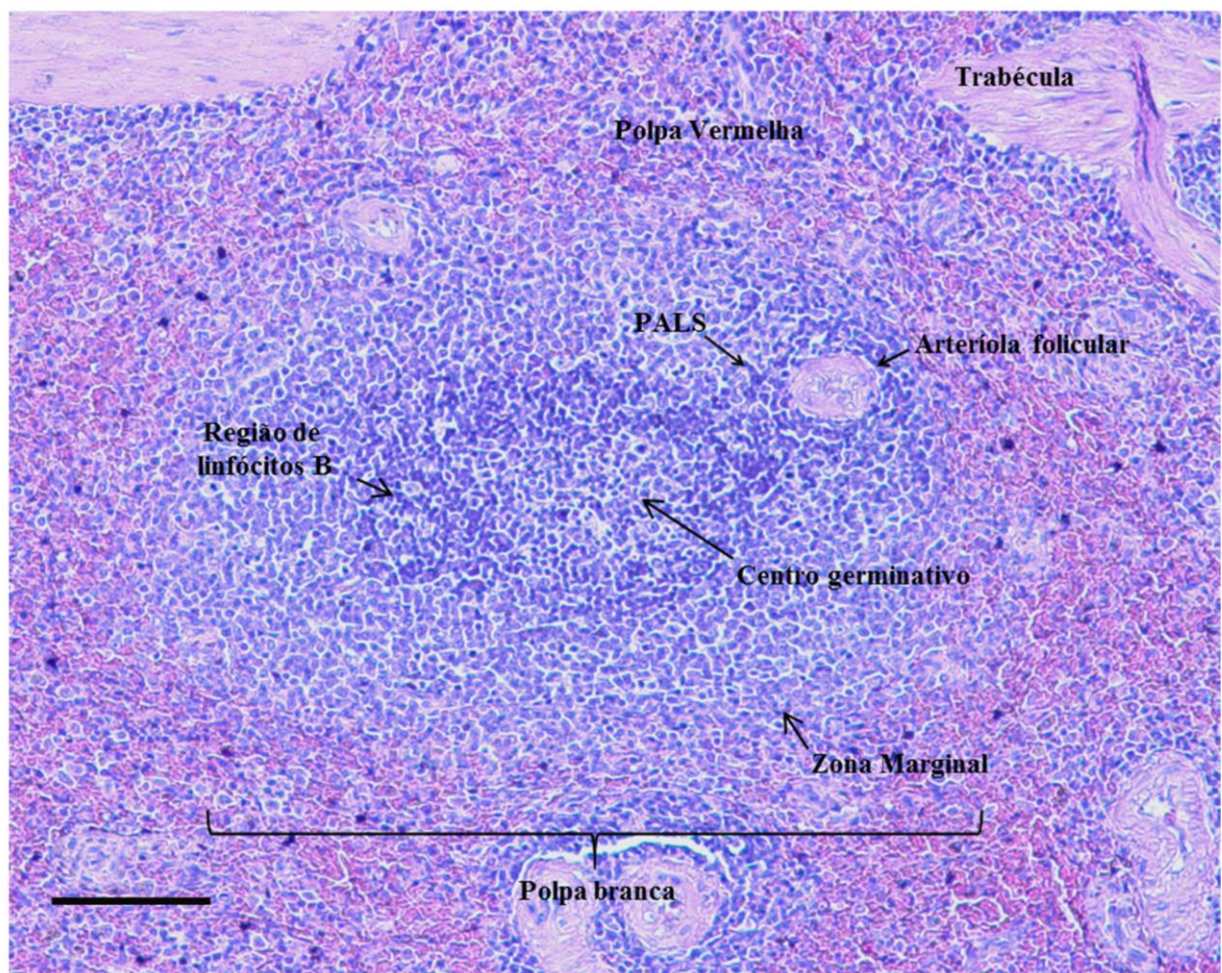


Figura 1.4- Compartimentalização do tecido esplênico. O baço é um órgão linfóide sistêmico formado por polpa branca esplênica a partir das regiões de PALS que envolve a arteriola foliular, região de linfócitos B que quando ativadas formam a região do centro germinativo, e zona marginal. A polpa vermelha é constituída por sinusóides, conduítes e trabéculas formadas por tecido conjuntivo. Imagem acervo pessoal do laboratório de pesquisa em Leishmaniose.

1.2.2.1 Polpa vermelha esplênica

A polpa vermelha é a região de maior extensão no baço, e nela estão localizadas diferentes células, vasos e estruturas como as trabéculas. Na polpa vermelha ocorre a filtração do sangue a partir da remoção de antígenos, debris celulares além de eritrócitos senescentes (CESTA, 2006). O arcabouço estrutural da polpa vermelha apresenta uma forma de árvore composto por cordas e sinusóides. Além disso, as cordas esplênicas presentes na região da polpa vermelha constituem o sustento estrutural composto por fibras reticulares tais como microfibrilas, fibras de colágeno, elastina entre outras proteínas, células reticulares como os miofibroblastos e fibroblastos, macrófagos e células dendríticas constituintes da membrana intersticial (SAITO *et al.*, 1988; CESTA, 2006). Embora o baço seja altamente compartimentalizado, cada compartimento, seja a polpa vermelha ou polpa branca, apresenta não só função individualizada, mas também complementares. A polpa vermelha atua na filtração do sangue arterial que chega à essa região após saírem da arteríola central chegando à polpa vermelha através das cordas esplênicas, um sistema aberto formado por fibroblastos e redes reticulares, formando um sistema sem a presença de tecido endotelial. A presença dessas redes reticulares cria uma pressão na região das cordas fazendo com que o sangue fique retido nesta região que por sua vez é rica em macrófagos e células dendríticas e assim o sangue é filtrado. Após esse processo de filtração, o sangue filtrado entra nos seios venosos onde sai para o sistema de circulação sanguínea corporal. Macrófagos ou células dendríticas infectados permanecem no baço (SAITO *et al.*, 1988; MEBIUS & KRAAL, 2005; CESTA, 2006).

1.2.2.2 Zona Marginal esplênica

Mebius & Kraal (2005) descreveram que a contínua migração de células hematopoiéticas vindas do sangue em direção aos órgãos linfoides secundários é um eficiente caminho para a captura de antígenos e patógenos. Os autores destacam a importância da zona marginal, mostrando que a mesma é um local importante transitório para o sangue que sai da corrente sanguínea para entrar na polpa branca. A zona marginal apresenta contato íntimo com a polpa vermelha e a região de linfócitos T (PALS) na polpa branca, sendo este contato extremamente importante para o processamento e apresentação de antígenos (KUPER *et al.*, 2002; MEBIUS AND KRAAL, 2005; CESTA, 2006). A zona marginal é rica em células

especializadas na apresentação antigênica, como macrófagos e células dendríticas da zona marginal. Além dessas células, linfócitos B também podem ser encontrados na zona marginal. Uma característica que diferencia os linfócitos B da zona marginal dos linfócitos B do centro germinativo e polpa branca é o seu fenótipo IgM^+ / IgD^- . Os macrófagos da zona marginal expressam o receptor MARCO, um receptor para colágeno. Tal receptor é usado para reter os linfócitos B dentro da zona marginal. No entanto, na zona marginal a expressão de receptores $S1P_1$ e $S1P_3$ para esfingosina-1-fosfato é maior do que em outras regiões. Nos linfonodos, tais receptores têm sido implicados na saída de linfócitos T. No baço, eles são altamente expressos por linfócitos B IgM^+ / IgD^- , sugerindo que tal linfócito possa circular entre a polpa vermelha e a polpa branca especialmente para a região de linfócitos B dentro do folículo (CHEN *et al.*, 2005; MEBIUS AND KRAAL, 2005).

1.2.2.3 Polpa branca esplênica

Dentro do baço, tecido altamente compartimentalizado, outra estrutura apresenta distintas compartimentalizações diferindo da polpa vermelha e da zona marginal. Tal estrutura é denominada polpa branca (Figura 1.4). Este nome é devido ao acúmulo de células brancas (leucócitos), principalmente linfócitos B e T. Nos folículos, os linfócitos B se diferenciam em plasmocitóides, células especializadas em expressão de anticorpos no seu citoplasma. As células plasmocitóides apresentam citoplasma conferindo coloração diferenciada quando comparados aos demais linfócitos, formando assim na polpa branca um anel com coloração lilás quando observadas pela coloração por hematoxilina e eosina. A polpa branca é compartimentalizada em região de linfócitos T (PALS) que se localiza em torno da arteríola central, região de folículo de linfócitos B e centro germinativo (MEBIUS & KRAAL, 2005). A polpa branca tem seus compartimentos mantidos pela expressão de quimiocinas como CXCL13 (ligante do receptor CXCR5) necessária para a migração e chegada de linfócitos B na área folicular, e quimiocinas CCL19 e CCL21 (ligantes do receptor CCR7) necessárias para a migração e manutenção dos linfócitos T e células dendríticas na região PALS da polpa branca. Tais quimiocinas são expressas pelas células estromais presentes no baço (MEBIUS & KRAAL, 2005; MANZO *et al.*, 2007; BEKIARIS *et al.*, 2009). Na região PALS há as subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ (STEINIGER *et al.*, 2006). O formato e a disposição de cada compartimento da polpa branca diferem para cada espécie analisada. Em resumo, a sua constituição é formada por uma arteríola central que é delimitada por linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$, fibroblastos reticulares (FRCs), células dendríticas e macrófagos, além dos

linfócitos B que formam um anel em volta do centro germinativo e, por fim, a zona marginal que delimita todo o folículo/polpa branca (STEINIGER, 2015). Além destas estruturas supracitadas, outra estrutura é de suma importância para a manutenção dos compartimentos da polpa branca esplênica: o sistema de conduítes. Formado basicamente por membrana basal, camada microfibrilar, colágeno IV e fibroblastos reticulares, tal sistema é responsável pela distribuição de quimiocinas quimioatrativas e outras moléculas de baixo peso molecular por toda extensão da polpa branca (LOKMIC *et al.*, 2008). Diferentes autores sugerem a presença desta estrutura somente na polpa branca. Além de participar da distribuição das quimiocinas, o sistema de conduítes auxilia na migração dos linfócitos e demais células, uma vez que os fibroblastos que revestem estas estruturas interagem com linfócitos e células apresentadoras de antígenos sendo popularmente conhecido como “corrimão” para a migração celular (LOKMIC *et al.*, 2008; GRETZ *et al.*, 2000; STEINIGER, 2015).

1.2.3 Matriz extracelular esplênica

A matriz extracelular é uma estrutura volumosa e altamente insolúvel, constituída por proteínas que apresentam domínios estruturais independentes formando arranjos entre demais proteínas que são altamente conservadas, formando um arcabouço estrutural tecidual (SOROKIN, 2010). A compartimentalização dos órgãos linfoides secundários é fundamental para o desenvolvimento da resposta imune adequada. Neste sentido, a matriz extracelular tem papel chave na manutenção desta compartimentalização. A matriz extracelular medeia a interação célula-célula e o transporte de quimiocinas e citocinas necessárias para a manutenção da compartimentalização celular necessária para o desenvolvimento da resposta imune, além de fornecer o arcabouço estrutural a partir de redes formadas por fibras reticulares que sustentam o baço (MEBIUS & KRAAL, 2005; LOKMIC *et al.*, 2008; SANTANA *et al.*, 2008). Lokmic e colaboradores (2008) descreveram que órgãos linfoides secundários apresentam a expressão de moléculas tanto da matriz intersticial, como por exemplo, colágeno do tipo I, II e III, fibronectina e tenacina C, quanto moléculas que constituem a membrana basal como, por exemplo, laminina, colágeno tipo IV proteoglicano de heparan sulfato e nidogênio. Os componentes da membrana basal também são importantes constituintes do sistema de conduítes pertencentes aos órgãos linfoides e pouco estudados no baço. No entanto, esse sistema é bem descrito nos linfonodos, e é constituído por canais pelos quais há o transporte de pequenas moléculas, quimiocinas e citocinas que são fundamentais

para o recrutamento de linfócitos T e B. (GRETZ *et al.*, 2000; NOLTE *et al.*, 2003; LOKMIC *et al.*, 2008; BRONTE & PITTET, 2013; LIMA *et al.*, 2014)

1.2.3.1 Matriz intersticial

A matriz intersticial ou estroma é basicamente composta por colágeno do tipo I, III, IV e XI, glicoproteínas como tenacina, fibronectina, vitronectina e proteoglicanas como condroitina, dermatan e keratan sulfato. Além dessas moléculas, na matriz intersticial há a presença de fibroblastos e células estromais. Sua principal função é a de fornecer resistência, conferida por proteoglicanas, e elasticidade ao tecido, conferidas pelos isotipos de colágenos (SOROKIN *et al.*, 2010).

1.2.3.1.1 Fibronectina

Dentre as glicoproteínas que constituem a matriz intersticial, a fibronectina ganha destaque por seu papel chave no processo de adesão e migração, uma vez que a interação entre seus domínios com integrinas (região RGD [arginina-glicina-ácido aspártico] liga-se a $\alpha 5 \beta 1$ integrina) promove o rearranjo dos filamentos de actina e assim estimula o processo de migração. As fibronectinas são glicoproteínas oblíquas que, reunidas a demais glicoproteínas, formam uma rede fibrilar presente em todos os tecidos e ao longo das diferentes fases da vida. (POTTS & CAMPBELL, 1996; SINGH *et al.*, 2010). Na figura 1.5 é demonstrada a estrutura da fibronectina e seus domínios de ligação a outras proteínas como fibrinas, colágeno e heparina (POTTS & CAMPBELL, 1996).

Além de apresentar papel chave na interação e adesão, seu papel no processo de migração é de extrema importância durante o desenvolvimento da resposta imune (SINGH *et al.*, 2010). Durante o processo de migração, moléculas de lipídeos como esfingosina-1-fosfato (S1P) interagem com seu receptor, membro da família da proteína G transmembranar induzindo a ativação de RhoA GTPase ativando a proteína Rho que por sua vez ativa a $\alpha 5 \beta 1$ integrina que interage com os fragmentos RDG de fibronectina induzindo a sua mudança conformacional e reestruturação da matriz extracelular (TYBULEWICZ & HENDERSON, 2009). Tal interação é capaz de ativar e modular diversas funções celulares como, por exemplo, divisão celular, sobrevivência, proliferação, adesão e migração. Assim pode-se observar o papel chave da fibronectina na comunicação célula-matriz extracelular (TYBULEWICZ & HENDERSON, 2009; SINGH *et al.*, 2010).

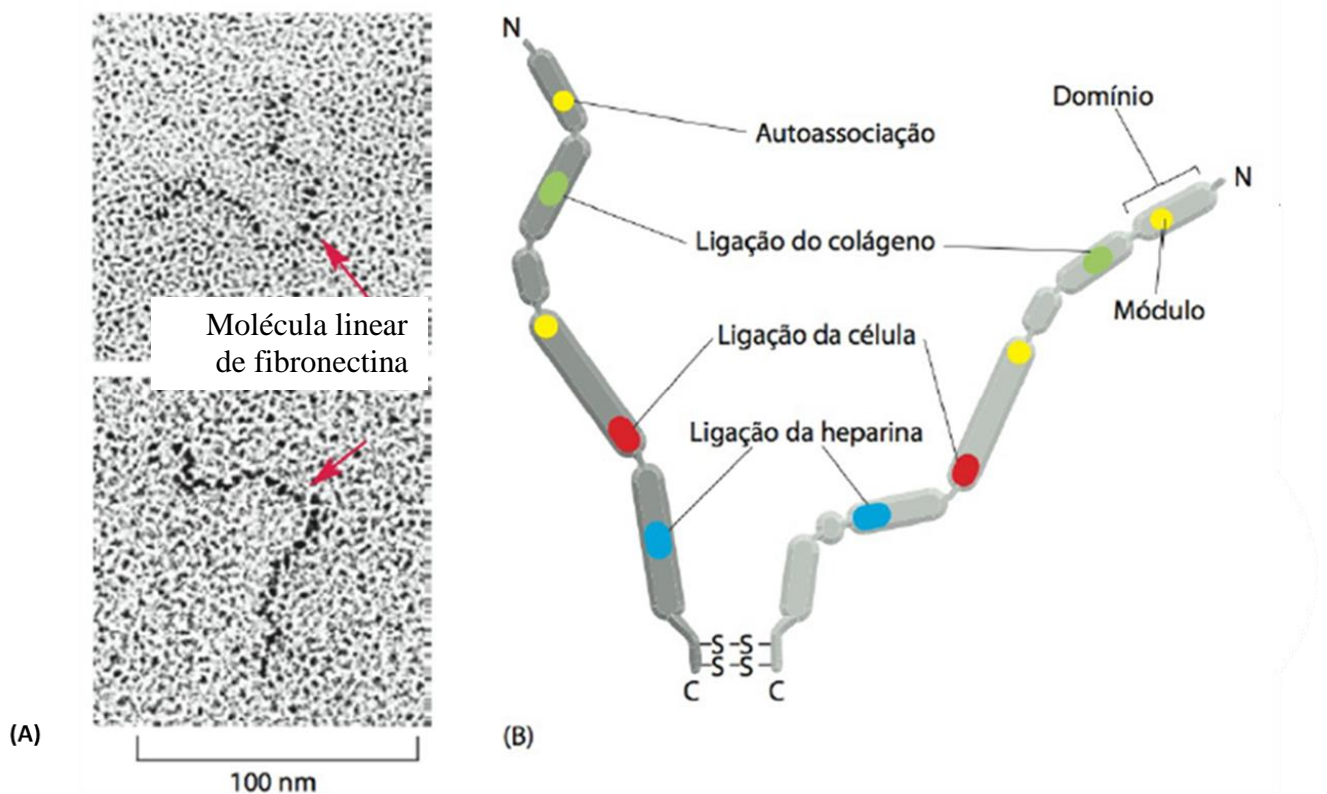


Figura 1.5 Esquema representativo da glicoproteína fibronectina. Esquema ilustrativo da fibronectina onde é possível observar suas subunidades. Em A, setas indicam a molécula linear de fibronectina. Em B, esquema representativo da cadeia de fibronectina e seus sítios de ligação para demais proteínas (Em azul, sítio de ligação para heparina; Em verde, sítios de ligação para colágeno; Em vermelho, sítios de interação com proteínas transmembranar). Fonte: ALBERTS, 2010.

1.2.3.2 Membrana basal

Outro componente que constitui a matriz extracelular é a membrana basal, importante componente funcional, estrutural e regulatório do órgão e vaso/capilares sanguíneos. A membrana basal é formada principalmente pela combinação de laminina, colágeno tipo IV, nidogênio e proteoglicano de heparan sulfato. Estas proteínas são expressas por células epiteliais, endoteliais e mesenquimais (KALLURI, 2003; SINGH *et al.*, 2010). A membrana basal é uma estrutura densa e amorfa que separa o tecido epitelial da matriz intersticial. Pode ser encontrada na região basolateral celular, no epitélio, na região axônica dos nervos periféricos, nos adipócitos e nas células musculares (KALLURI, 2003). A morfologia da membrana basal se assemelha a uma folha. Essa morfologia é uma característica conferida pelas ligações entre si de seus componentes. A laminina e o colágeno ligam-se entre si. Em adição, outras muitas interações ocorrem, como por exemplo interação entre a laminina-laminina e colágeno-colágeno formando o arcabouço estrutural da membrana basal. Já as

demais moléculas como nidogênio e proteoglicano de heparan sulfato, perlecan e entactina formam outras ligações no arcabouço formado por colágeno e laminina (KALLURI, 2003). A entactina e o nidogênio são proteínas que interagem com a região N-terminal da laminina e do colágeno, assim é formada a membrana basal (YURCHENCO' & SCHITTONY, 1990). Na figura 1.6 está ilustrado o esquema representativo do arcabouço estrutural formado através da interação entre laminina, colágeno e demais proteínas. A membrana basal é uma estrutural altamente *crosslinked* por suas moléculas insolúveis. Dentre tais moléculas, a laminina e o colágeno apresentam maior destaque na construção do arcabouço da membrana basal, além disso, ambas glicoproteínas atuam, juntamente com as demais proteínas, no processo de compartimentalização e envio de sinalização para as células epiteliais (YURCHENCO & SCHITTONY, 1990; KALLURI, 2003; SOROKIN, 2010). Seu papel de destaque é o de fornecer suporte mecânico para as células residentes. Funciona como barreira semipermeável entre compartimentos de tecidos, além de agir como reguladores entre os processos de migração celular, diferenciação e ligação através de suas proteínas (YURCHENCO & SCHITTONY, 1989).

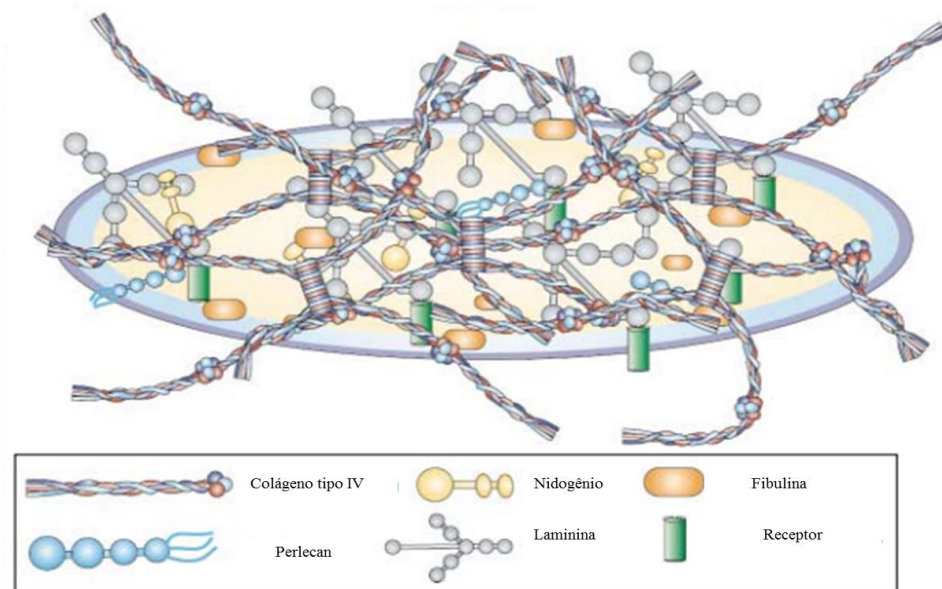


Figura 1.6- Esquema representativo do arcabouço estrutural formado pelas interações entre laminina, colágeno e demais proteínas que constituem a membrana basal. Observar a interação entre as moléculas de colágenos, laminina, nidogênio, Fibulina e perlecan através de interações moleculares para formar o arcabouço estrutural da matriz extracelular. KALLURI, 2010. doi:10.1038/nrc1094

1.2.3.2.1 Colágeno

Moléculas de colágeno são proteínas presentes na matriz extracelular que formam uma estrutura Tripla helicoidal (Figura 1.7), devido a sua interação com seus próprios domínios. O colágeno apresenta diferentes tipos e cada tipo tem sua função específica dentro da matriz intersticial e membrana basal. Dentre os tipos de colágeno podemos destacar os isotipos I, II, III, V e XI que formam fibrilas; os isotipos IV, VIII e X que formam estruturas semelhantes a redes; os isotipos IX, XII, XIV, XVI, and XIX que interagem com fibrilas e formam estruturas de colágenos associados a fibrilas; isotipo VI que formam filamentos; e os isotipos XIII e XVII que formam domínios intramembranares (PROCKOP & KIVIRIKKO, 1995). Dentre os isotipos de colágeno, o tipo IV é o mais abundante na membrana basal e apresenta característica de rede. Tem sido descrito por sua capacidade de formação de fibrose, diferindo dos demais tipos de colágeno. E, junto a laminina, a capacidade de regulação positiva ou negativa para a angiogênese (KALLURI, 2003). O colágeno é a fibra mais abundante nos mamíferos e não é somente importante na estruturação do arcabouço da membrana basal, mas também contribui para a estabilidade térmica e força mecânica (SHOULDERS & RAINES, 2009).

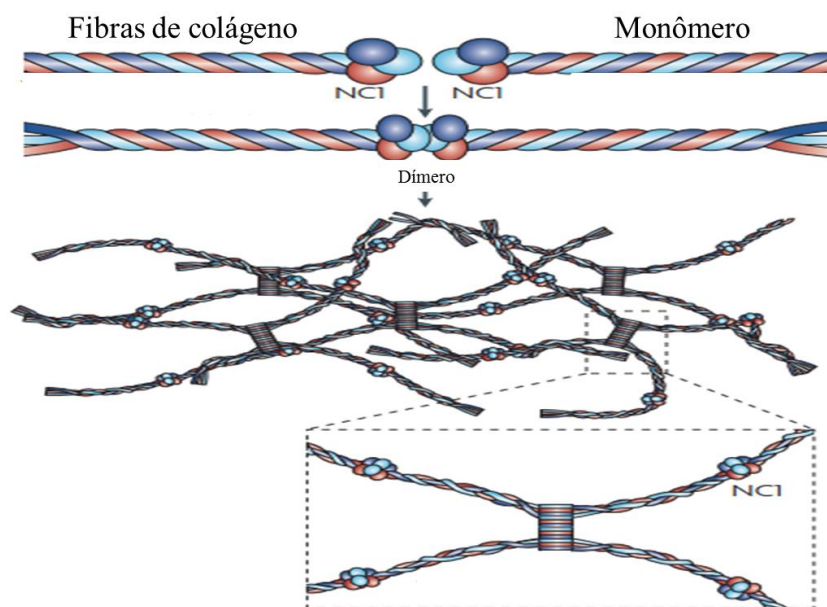


Figura 1.7 Esquema ilustrativo dos monômeros de colágeno tipo IV e a sua participação na formação do arcabouço estrutural da membrana basal. Note a interação entre os dois domínios de cada fibra de colágeno e a união entre essas duas fibras para a formação do arcabouço. Dois promotores de colágeno tipo IV se associam através do seu domínio N carboxi-terminal- NCI formando um trímero, após a formação do trímero, os domínios amino-terminal 7S glicosilados interagem entre si formando um tetrâmero. Essa formação é conhecida como núcleo para o arcabouço estrutural formado por colágeno. SOROKIN, 2010 doi: 10.1038/nri2852.

1.2.3.2.2 Laminina

Juntamente com o colágeno, a laminina é o maior componente da membrana basal e apresenta forma em cruz com três braços curtos de aproximadamente 37nm de comprimento e um braço longo com aproximadamente 77nm de comprimento (YURCHENCO & SCHITTNY, 1990) (Figura 1.8). Moléculas de laminina são heterodímeros de adesão celular e pertencente à família de glicoproteínas. É considerada uma glicoproteína trimérica apresentando uma cadeia α , uma cadeia β e uma cadeia γ podendo apresentar a combinação destas cadeias formando diferentes isotipos como, por exemplo, o isotipo laminina-423 formada pela combinação de cadeias $\alpha4$, $\beta2$ e $\gamma3$ (DURBEEJ, 2009). Tais domínios se unem para formar uma estrutura cruciforme e a interação da laminina com a superfície de receptores como, por exemplo, integrina é dado pela região globular de sua estrutura (MOUW & WEAVER, 2014). Na figura 1.8, pode-se observar os diferentes domínios presentes na estrutura cruciforme da laminina. Sua molécula é dividida em três regiões: sítio de ligação para colágeno, região helicoidal α e região de ligação para integrina. Partes das cadeias α , β e γ constituem o sítio de ligação para o colágeno (MOUW & WEAVER, 2014).

A interação entre os diferentes isotipos de laminina com seus receptores, como, por exemplo, as integrinas, podem ativar diversas funções a partir da ativação da cascata de sinalização celular como o processo de migração celular e indução da expressão de proteínas do leite em lactantes. Desta forma, a função da laminina é receptor-dependente desmistificando seu papel exclusivo na estruturação do arcabouço da membrana basal (COLOGNATO & YURCHENCO, 2000). A molécula de laminina apresenta diversas regiões para interação ao longo de sua estrutura. Na região N-terminal da laminina-LN- ocorre a interação com integrinas. A região domínio globular da laminina-LG- ocorre a interação com heparina e sulfatidas e o nidogênio interage com os canais $\gamma1$ e $\gamma2$, tendo cada interação diferentes funções (DURBEEJ, 2010).

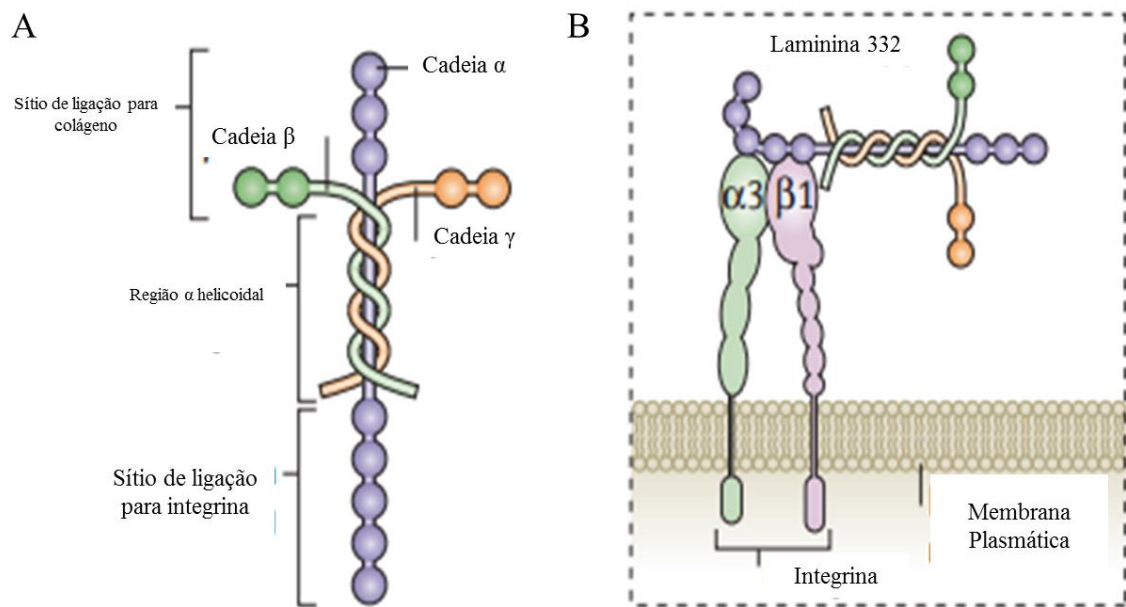


Figura 1.8-Representação esquemática da molécula de laminina e seus domínios. Em A, a estrutura molecular cruciforme da laminina onde é possível observar o sítio de ligação para o colágeno, a região alfa helicoidal e a região de ligação para receptores do tipo integrina. Em B, esquema representativo demonstrando a ligação entre a molécula de laminina e a integrina. MOUW *et al.*, 2014. Doi:10.1038/nrm3902

Embora a laminina tenha diversas funções e tais funções sejam dependentes da interação envolvida, o contato entre a laminina e as integrinas desencadeará a transdução de sinal no interior celular que terá como produto final a transcrição de genes ou a ativação de alguma função celular que possa ser importante, como por exemplo, para a resposta imune celular. Suzuki & Yokoyama (2005) descrevem que a laminina é a mediadora entre a membrana basal e o citoplasma celular. Sua interação com proteínas da membrana celular ativa sinalizações que resultarão em determinada resposta ao estímulo, e que a resposta desta interação dependerá do isotipo ou peptídeo de laminina.

1.2.4 Função esplênica-Órgão mediador da resposta imune adaptativa

A polpa branca apresenta diferentes compartimentalizações e cada uma contendo sua subpopulação celular. É de suma importância a compartimentalização da polpa branca, uma

vez que nela ocorrem os processos de apresentação antigênica e o desenvolvimento da resposta imune adaptativa (ABBAS, 2011). Macrófagos residentes na zona marginal são células apresentadoras de antígenos que expressam um amplo repertório de receptores capazes de reconhecer antígenos e patógenos que entram no baço a partir do sangue arterial. Tais receptores são MARCO, Toll-like (TLR) e SIGN-R1, e uma lectina do tipo C. SIGN-R1 e MARCO, juntamente com os receptores do tipo Toll, reconhecem os PAMPs, padrões moleculares associados a patógenos (ABBAS, 2011; PRABAGAR *et al.*, 2013). Ao capturar o antígeno circulante, tanto as células dendríticas quanto os macrófagos iniciam o processo de migração até a polpa branca, uma vez que estes estão localizados na zona marginal. Não somente macrófagos e células dendríticas reconhecem PAMPs, mas os linfócitos B da zona marginal também reconhecem antígenos via BCR e migram para o interior da polpa branca. Tais linfócitos B são ativados por produtos da cascata do sistema complemento e se diferenciam em células plasmocitóides, expressam IgM e são capazes de ativar a subpopulação de linfócitos T CD4⁺ via expressão de MHC II e a interação de moléculas co-estimuladoras, como por exemplo B7/CD28. Seja pela apresentação antigênica via células dendríticas e macrófagos, ou via células B, como resultado, há indução do processo de proliferação de células TCD4⁺ denominadas T *helpers*. Além disso, dependendo da natureza do antígeno, pode haver a ativação de linfócitos T CD8⁺ (ATTANAVANICH & KEARNEY, 2004). 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. Após a ativação dos linfócitos T, os linfócitos B podem permanecer no folículo ou migrar para a zona marginal (MEBIUS & KRAAL, 2005). Como resultado da ativação de T CD4⁺, pode haver a ativação de linfócitos TCD8⁺, e a expressão de uma gama de citocinas como IFN- γ , IL-2 e TNF α . Estas são importantes citocinas ativadoras da atividade anti-microbiana de macrófagos que passam a expressar a enzima iNOS (óxido nítrico sintase induzida) que catalisa a produção de óxido nítrico, um produto da via Th1 importante para a eliminação do patógeno intracelular como por exemplo *Leishmania sp.* Ao passo que a ativação de linfócitos T CD4⁺, através da sua interação com linfócitos B foliculares, resulta na expressão de IL-4 e IL-10, citocinas expressas pela via de resposta Th2 com a expressão de anticorpos como, por exemplo, IgG - importante imunoglobulina opsonizadora de patógenos e células em processo de apoptose (GUPTA *et al.*, 2013; LORÍA-CERVERA E ANDRADE-NARVÁEZ 2014). Apesar da via Th1 ser mais eficiente contra patógenos intracelulares devido a ação mediada por macrófagos e IFN- γ que agem no citoplasma da célula infectada eliminando o parasita no vacúolo

parasitífero, um balanço entre a resposta Th1 e Th2 parece ser a resposta necessária para o controle da infecção. Além disso, Loría-Cervera e Andrade-Narváez (2014) relataram que em PBMCs de cães assintomáticos experimentalmente infectados com *Leishmania infantum* houve um *mix* entre as respostas via células Th1 e Th2 com sobreposição dos níveis de mRNA de IL-2 e IFN- γ . Embora o balanço entre a resposta tipo I e II seja o ideal contra patógenos, em cães infectados por *Leishmania sp.* tem sido reportado dois painéis distintos: o painel que é relacionado a resistência do cão com a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF- α , IFN- γ , painel tipo I, bem como o painel que confere susceptibilidade ao cão, ou seja a expressão de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β , painel tipo II, não eficiente na eliminação do parasita favorecendo a sua persistência. Em cães infectados por *Leishmania infantum* tem sido observado o predomínio da resposta do tipo via células Th2 correlacionado a progressão da doença (GUPTA *et al.*, 2013; KAULSHAL *et al.*, 2014). No entanto, a expressão de IL-10 no baço de cães com leishmaniose visceral não foi correlacionada com os sinais clínicos. Tal resultado sugere que outros fatores como desnutrição ou co-infecções podem afetar a resposta imune favorecendo a persistência parasitária. Além dos linfócitos T CD4⁺, os linfócitos T CD8⁺ apresentam papel crucial na resposta imune mediada por células contra patógenos intracelulares. A subpopulação de linfócitos T CD8⁺ promove uma ampla imunidade contra diversos patógenos e em relação à *leishmania sp.*, esta subpopulação de linfócitos tem contribuído para a imunidade contra esse parasita (SANTOS & BRODSKYN, 2014). Linfócitos T CD8⁺ apresentam importante papel na eliminação de patógenos intracelulares através da liberação de perforinas e granzimas que atuam na perfuração da membrana de células infectadas induzindo o processo de apoptose de tais células, além da liberação de IFN- γ que auxilia na ativação de macrófagos (MULLER *et al.*, 1991; SANTOS *et al.*, 2013; SANTOS & BRODSKYN, 2014). No entanto, o papel central de linfócitos T CD8⁺ tem sido discutido e tem sido demonstrado tanto em leishmaniose visceral como em leishmaniose cutânea que a exacerbação da resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺ tem sido correlacionada à progressão da doença e lesão decidual. Além disso, tem sido amplamente discutido o fenótipo de exaustão e anergia de linfócitos T CD8⁺. O mesmo fenótipo é observado em T CD4⁺. (ESCH *et al.*, 2013; GAUTAM *et al.*, 2013; KAULSHAL *et al.*, 2014). Estudos envolvendo o fenótipo de exaustão em cães naturalmente infectados e o resultado deste fenótipo ainda são bem recente dentro dos estudos envolvendo a imunopatologia da leishmaniose visceral.

1.2.5 O baço na Leishmaniose visceral canina

O baço de cães infectados é um dos órgãos mais afetados na LV e tem sido amplamente demonstrada a desorganização da matriz extracelular esplênica (STRAUSS-AYALI *et al.*, 2007; LOKMI *et al.*, 2008; SANTANA *et al.*, 2008; CAVALCANTI *et al.*, 2015; SILVA-O'HARE *et al.*, 2015). Durante o processo infeccioso, a MEC sofre intenso processo de remodelamento onde seus componentes estruturais como laminina, fibronectina e colágeno são degradados por metaloproteinases e colagenases, por exemplo, MMP-2, MMP-9 e ADAM-10. Macrófagos, fibroblastos, linfócitos e células endoteliais são as principais células que expressam tais enzimas (HOPPS & CAIMI, 2012). Neste contexto, altos níveis de MMP-9 e MMP-2 no soro de cães infectados por *Leishmania (L.) infantum* já foram demonstrados (MELO *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Durante o processo infeccioso é necessária a migração de células para o sítio acometido. Neste sentido, a matriz extracelular esplênica fornece suporte para a migração celular. A matriz extracelular é uma estrutura altamente dinâmica, que auxilia na apresentação antigênica e na montagem de sítios para a infiltração celular e formação de granulomas. A reação granulomatosa é uma resposta imune mediada por células eficiente na eliminação do parasita intracelular. O granuloma é composto por macrófagos infectados e ativados que são envolvidos por outros macrófagos não infectados, fibroblastos e proteínas como fibras colágenas e demais substâncias do tecido conjuntivo (LEMOS 2010). Diferentes processos dinâmicos podem ocorrer na MEC, podendo resultar na degradação dos seus componentes que constituem a membrana basal e intersticial. Além da degradação, o processo inflamatório geraria o estímulo para a deposição destes mesmos componentes e como resultado do remodelamento da matriz extracelular esplênica haveria a alteração da microarquitetura do baço podendo resultar na alteração dos compartimentos da polpa branca, polpa vermelha e zona marginal conferindo o aspecto microscópico de desorganização da polpa branca esplênica (LU *et al.*, 2011).

1.2.5.1 Desorganização da matriz extracelular e a falha no controle da carga parasitária

Em cães naturalmente infectados tem sido demonstrada a desorganização da polpa branca esplênica (SANTANA *et al.*, 2008; O'HARE *et al.*, 2016; CAVALCANTI *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2012). No entanto, pouco se sabe sobre o momento em que se

inicia a desorganização, se ocorre no momento inicial da infecção, ou se ocorre em fase avançada. Outra questão a ser elucidada é se esta organização é induzida diretamente pelo parasita ou pela resposta imune gerada, nas quais as moléculas de matriz extracelular sofrem alterações na sua deposição durante este processo. A manutenção da microarquitetura esplênica e de suas áreas de segregação é necessária para a ativação de linfócitos efetores e o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz (REIS *et al.*, 2009; RODRÍGUEZ-CORTÉS *et al.*, 2016).

Em relação a deposição dos componentes da matriz extracelular, tem sido demonstrado a deposição de laminina, fibronectina e colágeno no fígado de cães infectados (KULKARNI *et al.*, 2008; MELO *et al.*, 2008; MELO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2013). O colágeno tem sido o maior componente da MEC envolvido neste processo. A deposição de laminina e fibronectina foi correlacionada positivamente com a carga parasitária. A degradação de laminina e fibronectina gera fragmentos com domínios de interconexão que ligados aos macrófagos podem reduzir a sua atividade, além de aumentar a capacidade de infecção de novas células (KULKARNI *et al.*, 2008; MELO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2013). Como resultado da diminuição da atividade de macrófagos pode haver a diminuição da expressão de IFN- γ , IL-12 e TNF- β afetando diretamente a resposta imune mediada por células do tipo Th1. A correlação positiva entre a deposição de laminina e fibronectina com a carga parasitária no fígado descrita por Melo e colaboradores (2009) pode ser justificada pela diminuição da atividade de macrófagos. Neste contexto, a existência de macrófagos M2 no baço de cães naturalmente infectados já foi demonstrada (MOREIRA *et al.*, 2016). Macrófagos que são ativados em presença de PAMPs ou DAMPs (Padrões moleculares associados a patógenos) e em ambientes com a predominância de citocinas expressas por linfócitos do tipo Th1 estes macrófagos quando ativados expressam citocinas deste perfil imunológico sendo classificado como M1, o mesmo acontece para macrófagos M2 que são ativados em presença de citocinas do perfil Th2 e recentemente foi descrito macrófagos M17 ativados em presença de IL-17, apresentando função regulatória (GORDON & MARTINEZ., 2010; KONTTINEN *et al.*, 2014) Trabalhos recentes em infecção experimental e natural em cães com *L. infantum*, tem demonstrado a capacidade destes animais em gerar uma resposta inicial pró-inflamatória com expressão de IFN- γ , porém ainda assim o parasita consegue sobreviver ao ambiente inflamatório e persistir no organismo dos cães (MOREIRA *et al.*, 2016; COSTA *et al.* 2013; STRAUSS-AYALI *et al.*, 2007; QUINNELL *et al.*, 2001).

Além do fígado, tem sido reportada no baço a presença de processo inflamatório crônico em compartimentos como polpa vermelha, polpa branca e região de capsula bem

como a diminuição da quantidade de células em volta da arteríola central, região conhecida como PALS onde se concentram os linfócitos T (Silva *et al.*, 2013). Santana e colaboradores (2008) descrevem que em cães infectados por *L. infantum* há depleção das regiões de linfócitos T, a baixa formação de granuloma, a hipertrofia da polpa branca e vermelha e intenso processo inflamatório na região de cápsula. No entanto, somente a deposição de colágeno mostrou correlação positiva com o aumento da carga parasitária (SILVA *et al.*, 2013). Contudo, a leishmaniose visceral é considerada uma doença inflamatória de caráter crônico com intensa formação de fibrose (SILVA *et al.*, 2013). Sabe-se que durante o processo inflamatório ocorre o remodelamento da matriz extracelular esplênica. No entanto, a pergunta é em que momento o processo inflamatório afeta o remodelamento da matriz extracelular esplênica fazendo com que haja a perda da homeostase desta matriz, alteração na deposição natural dos seus componentes ocasionando a desorganização do tecido esplênico? Por fim, qual seria o impacto desta desorganização na mediação da resposta imune celular, uma vez que para o desenvolvimento desta é necessária a adequada compartimentalização da polpa branca esplênica? Cavalcanti e colaboradores (2015) descreveram a correlação entre o aumento da carga parasitária e a ruptura da polpa branca esplênica, mostrando que tais eventos podem ser complementares e que há falha no controle da carga parasitária. Além disso, os autores descrevem um possível processo de imunossupressão devido à redução de diversas citocinas tanto do fenótipo de células Th1, IFN γ , IL-12, TNF e IL-6 perfil pró-inflamatório, quanto do fenótipo Th2, TGF β e IL-10 perfil anti-inflamatório/regulatório. Outros estudos mostram a associação da leishmaniose visceral com a atrofia e desorganização dos compartimentos esplênicos, e diminuição da expressão de quimiocinas como CXCL13 e CCL19, importantes quimiocinas responsáveis pela manutenção das áreas de linfócitos B e T nos compartimentos na polpa branca esplênica (SILVA *et al.*, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2013).

Em resumo, torna-se necessário entender qual o papel da deposição dos componentes estruturais como laminina, fibronectina e colágeno na desorganização da polpa branca esplênica e como essa deposição afeta a resposta imune e o controle da carga parasitária na leishmaniose visceral canina.

2.0 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar alterações estruturais, ocorridas na matriz extracelular (MEC), e celulares no baço de cães com LVC naturalmente infectados correlacionando-as com a carga parasitária e sinais clínicos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar clinicamente os animais infectados e escaloná-los em grupos de acordo com a apresentação de sinais clínicos;
- ✓ Quantificar da carga parasitária.
- ✓ Analisar a histopatologia do baço de cães naturalmente infectados levando em consideração a organização da polpa branca esplênica dividindo os animais em grupos;
- ✓ Avaliar qualitativa e quantitativamente a deposição de componentes estruturais da matriz extracelular: fibronectina, laminina e colágeno.
- ✓ Analisar qualitativa e quantitativamente os perfis celulares presentes no baço (linfócitos T CD3⁺, T CD4⁺, T CD8⁺ e linfócitos B CD21⁺, células em processo de proliferação (Ki-67⁺).
- ✓ Analisar qualitativa e quantitativamente o perfil funcional do tecido esplênico através da análise da expressão de IFN- γ , IL-10, MMP-9 e ADAM-10.
- ✓ Correlacionar a organização da arquitetura esplênica, deposição de componentes estruturais, perfil celular e perfil funcional com a carga parasitária.

3.0 Metodologia

3.1 Desenho experimental

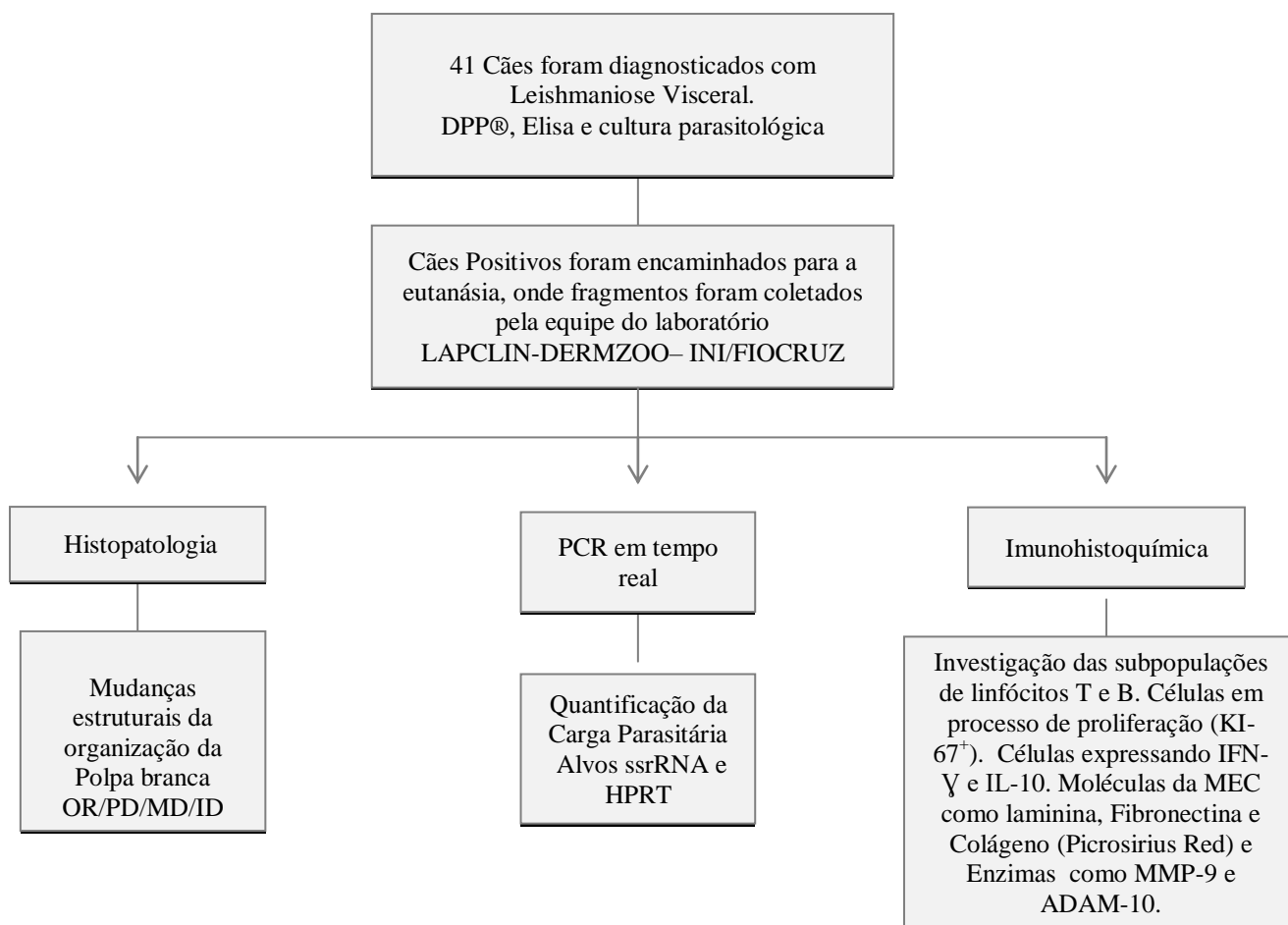


Figura 3.1 Desenho experimental. Demonstração da organização dos experimentos.

Teste rápido DPP®- Dual Path Platform. Ensaio de imunoabsorção enzimática-Elisa-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. LAPCLIN- Laboratório de pesquisas em dermatozoonoses-Instituto nacional de infectologia-INI/FIOCRUZ. OR-Polpa branca esplênica organizada, PD- Polpa branca esplênica pouco desorganizada, MD- Polpa branca esplênica médio desorganizada, ID- Polpa branca esplênica intenso desorganizada. Gene que codifica a proteína hipoxantina fosforribosiltransferase-HPRT, SSrRNA Pequena unidade subribossomal.

3.2 Aspectos éticos

Os animais incluídos neste estudo foram naturalmente infectados e destinados à eutanásia no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO-INI / FIOCRUZ), conforme recomendações do Ministério da Saúde (BRASIL, 2003). As amostras esplênicas foram colhidas após a confirmação da doença por cultura parasitológica, Elisa® e teste rápido DPP® seguida pela eutanásia dos cães (Figura 3.1). De acordo com as orientações do Comitê de Ética em Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz e a lei brasileira 11794/08, não houve a necessidade de licença, pois são amostras oriundas de necropsias.

3.3 Animais e avaliação clínica

Quarenta e um cães de Barra Mansa-RJ diagnosticados com leishmaniose visceral canina foram incluídos neste estudo. A confirmação diagnóstica se deu a partir dos métodos de ELISA, teste DPP® (antígeno rK39, Dual Path Platform Biomanguinhos) e cultura parasitológica realizados pelo Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO-INI / FIOCRUZ).

A eutanásia foi realizada por veterinários de LAPCLIN-DERMZOO utilizando 1,0% (1,0 ml/Kg) de Thiopental intravenoso (Thiopentax®, Cristália). Após a detecção da ausência de reflexo córneo-palpebral, induzida por anestesia profunda, foram administrados, por via intravenosa, 10 ml de cloreto de potássio a 19,1% (Isofarma). Durante a necropsia, dados clínicos e fragmentos de tecido do baço foram coletados e os últimos armazenados até à sua utilização.

A avaliação clínica foi realizada por dois veterinários de acordo com a escala clínica adaptada de Quinzel e colaboradores (2001). Em resumo, seis sinais clínicos comuns (dermatite, onicogribose, ceratoconjutivite, emaciação, alopecia e linfadenopatia) foram classificados em uma escala semi-quantitativa de 0 (ausente) a 3 (grave). A soma dos valores foi utilizada para determinar a classificação clínica final de escore: pontuação baixo (0-2), médio (3-6) ou alto (7-18) escore clínico (Tabela 3.1).

Tabela 3.1- Pontuação por escore dos sinais clínicos observados em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* (QUINNELL, 2001 modificado).

Ficha Clínica			
Sinal Clínico	Grau de intensidade		
	Fraca (1)	Média (2)	Intenso (3)
Ceratoconjutivite			x
Onicogribose		x	
Dermatite	x		
Alopecia			x
Emaciação	x		
Linfadenopatia		x	
Somatório Total			12

Na tabela acima é descrita a classificação clínica dos animais aplicados no estudo. No exemplo o animal é classificado como animal que apresenta alto escore clínico, uma vez que tem um somatório de 12 pontos de intensidade dos sinais clínicos apresentados.

3.4 Extração de DNA em tecido esplênico

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

3.5 Determinação da carga parasitária por qPCR

A carga de parasitas foi estimada por PCR em tempo real em amostras de baço como previamente descrito por Cavalcanti e colaboradores (2015). Utilizaram-se iniciadores HPRT (Tabela 2) para normalizar as concentrações de DNA canino em cada amostra. Para quantificar o número de cópias do DNA referente aos parasitas, os iniciadores SSrRNA (Tabela 2) descritos por Prina et al. (2007) foram utilizados para amplificar o gene que codifica o RNA de subunidade menor ribossomal (ssrRNA, multy-copy gene). As reações de qPCR foram realizadas no equipamento Step One (Applied Biosystems, Molecular Probes,

Inc.) utilizando o sistema de detecção Power Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc.). Adicionou-se 2 µl do DNA total purificado (100 ng) a um volume final de reação de PCR de 20 µl contendo Power Sybr Green 1X, 300 nM de cada iniciador para HPRT ou 500 nM para ensaios de PCR de *ssrRNA*. O qPCR foi realizado com uma etapa de ativação a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação e anelamento/extensão (95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto e 68°C durante 30 segundos). Realizou-se uma curva padrão para cada alvo específico. Todas as reações foram realizadas em duplicata para cada alvo e ambos os alvos foram executados na mesma placa para a mesma amostra.

As sequências dos primers específicos para o gene que codifica a proteína canina hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (HPRT) e para o gene que codifica uma pequena subunidade do RNA ribossomal do parasita (SSu rRNA) estão descritos na tabela 3.2. Os genes HPRT e SSu rRNA foram utilizados como controle positivos da reação em cadeia da polimerase (qPCR). O DNA canino foi obtido de células polimorfonucleares de sangue periférico de cães não infectados, já o DNA parasitário foi obtido de cultura das formas promastigotas da cepa MCAN/BR/2007/CG1. As células tanto do mamífero quanto do parasita foram contados utilizando um contador de células (Z1™ COULTER COUNTER®, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA). O DNA total foi extraído a partir de $1,0 \times 10^6$ células PBMC e $1,0 \times 10^7$ de promastigotas. As curvas padrão para os genes HPRT e *ssrRNA* foram preparadas utilizando diluições em série de 10 vezes de 10^{-2} a 10^7 de DNA purificado total. Os animais foram agrupados como carga parasitária alta ou baixa como descrito por Cavalcanti *et al* (2015).

Tabela 3.2 - Primers alvos e respectivas sequências utilizados na quantificação da carga parasitária

Gene Alvo	Acesso ou Número de referência		Sequência (5'-3')	Tamanho em pares de bases (pb)
HPRT	NW_003726126.1	S	AAAACAATGCAGACTTTGCT	58
		AS	CCTTGACCATCTTTGGATTA	
Alvo canino				
SSu rRNA	Prina et al. (2007)	S	TACTGGGGCGTCAGAG	153
		AS	GGGTGTCATCGTTTGC	
Alvo parasita <i>Leishmania (L). infantum</i>				

S, senso; AS, anti-senso, bp, pares de bases

3.6 Histopatologia

Os fragmentos de baço foram fixados em formalina tamponada a 10% posteriormente foram embebidos em parafina. Cortes com 5 um de espessura foram fixados em lâminas de microscópio e corados com hematoxilina e eosina e examinados por microscopia óptica (Nikon Eclipse E400 - Tokyo, Japão).

As alterações estruturais do tecido linfoide esplênico foram analisadas como descrito anteriormente (Santana *et al*, 2008). Os parâmetros analisados foram a presença de granuloma e grau de organização estrutural da polpa branca: 1- organizada - com bainha linfocitária periarteriolar distinta, centro germinativo, zona do manto e zona marginal, 2- pouco desorganizada - com alterações hiperplásicas ou hipoplásicas, levando a uma perda na definição de qualquer das regiões da polpa branca, 3 - moderadamente desorganizada - quando a polpa branca era evidente, mas suas regiões eram pouco individualizadas ou indistintas e 4 - desorganizada intensamente - quando presente, a estrutura folicular era pouco distinta da Polpa vermelha e áreas de células T). As análises foram feitas em grupos Organizados (Animais com PBE organizada a pouco desorganizada) e desorganizados (Animais com PBE médio a intenso desorganizada) de acordo com Santana e colaboradores (2008). Os grupos organizados/pouco desorganizados e médio/intenso desorganizado apresentam semelhança entre sí, desta forma eles foram analisados de forma a ter apenas 2 grupos de organização da PBE.

O número de folículos linfoides foi determinado como folículos linfoides/mm² usando o software Nikon ACT-1 versão 2.62 (Nikon). Os depósitos de colágeno foram quantificados em tecido corado com vermelho picrosírius e quantificados em software ImageJ 1.48v (NIH, EUA).

3.7 Imunohistoquímica

A imunohistoquímica foi baseada em Morgado e colaboradores (2008). Resumidamente, os fragmentos de baço congelados em resina OCT (Meio Tissue-Tek O.C.T. Compound, FR/118mL, Sakura-4583) foram cortados em secções de 3-5um de espessura e montados em lâminas de microscópio (slides silanizados, DakoCytomation, Carpinteria, CA, U.S.A.).

As lâminas foram fixadas em acetona PA (Merck, Darmstadt, Alemanha) e submetidas a hidratação, bloqueio de peroxidase endógena (reagente bloqueador de peroxidase, Dako) e

marcações inespecífica (BSA a 0,4%, Sigma, E.U.A.). Os espécimes foram então incubados com os anticorpos primários para: CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺, IFN- γ ⁺, IL-10⁺ (Serotec), Ki-67⁺ (eBiosciência), laminina, fibronectina, ADAM-10 e MMP-9 (Serotec), seguido por incubação com o Polímero Marcado (Envision System-HRP, Dako). Utilizou-se aminoetilcarbazole (kit AEC, Invitrogen) como o sistema substrato cromógeno e as lâminas foram contracoradas com a hematoxilina de Mayer (Sigma).

As lâminas foram examinadas sob microscópio óptico (Zeiss) e foi determinado o número de células/mm² de tecido na polpa vermelha. Os depósitos de laminina e fibronectina foram quantificados utilizando o software ImageJ 1.48v (NIH, EUA) e os resultados foram demonstrados como percentagem da área marcada.

3.8 Análise estatística

O programa SPSS para Windows, versão 16 (SPSS Inc., Chicago, IL, E.U.A.) foi utilizado para análise estatística. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a distribuição gaussiana das variáveis. Os dados foram analisados pelo teste T-Student para variáveis com distribuição paramétrica e o teste de Mann-Whitney para variáveis com distribuição não paramétrica. As correlações foram determinadas usando o coeficiente de correlação de Spearman. Os dados estão representados como média e 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). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4.0 Resultados

4.1 Onicogribose e dermatite foram os principais sinais clínicos presentes em cães naturalmente infectados

Neste estudo, foram analisados 41 animais com diagnóstico de leishmaniose visceral canina (LVC). Os principais sinais clínicos foram onicogribose (79,4%), dermatite (67,6%), perda de peso (41,2%), alopecia (38,2%), linfadenopatia (23,5%) e ceratoconjutivite (23,5%) (Figura 4.1). A cada sinal clínico foi dado uma pontuação que variava de 1 a 12 pontos por intensidade. Após a classificação da intensidade do sinal clínico a pontuação foi somada e assim os animais foram divididos em 3 grupos levando em consideração ao escore clínico. Os animais foram classificados em 3 grupos com base no escore clínico: 1 – baixo escore (N = 13, 31,7%); 2 – médio escore (N = 15; 36,6%); 3 – alto escore clínico (N = 13, 31,7%).

4.2 Animais com desorganização da polpa branca esplênica (PBE) apresentaram redução no número de folículos linfóides

Com base na análise histopatológica, os animais foram classificados como animais com PBE organizada (OR_n= 3, 7,31%), PBE pouco desorganizada (PD_n= 8, 19,51%), PBE com moderada desorganização (MD_n = 15, 36,6 %) e intensa desorganização (ID_n= 15, 36,6%) (Figura 4.2 A-D). Observou-se uma redução no número de folículos linfóides de acordo com o grau de desorganização da PBE (p= 0,0001) (Figura 4.3). A análise do número de granulomas/mm² no tecido esplênico revelou que apenas 6 cães apresentaram granuloma bem formado, sendo que 5 apresentaram polpa branca desorganizada e 1 apresentou polpa branca organizada (n=6, Média= 3,83 x 10⁶, Mediana 3,83 x 10⁶, Mínimo-Máximo 4,6100-20,300,000 parasitas/10⁶ células), e neles a carga parasitária foi maior do que em cães que não apresentaram formação de granuloma (animais com granuloma N= 6, Média= 3,82, Mediana= 1,99, Mín-Máx= 4,61- 2,03; animais sem granuloma N=35, Média 5,26 x 10⁵, Mediana= 4,29, Mín-Máx 145 - 6,970,000 parasitas/10⁶ células, P = 0,039).

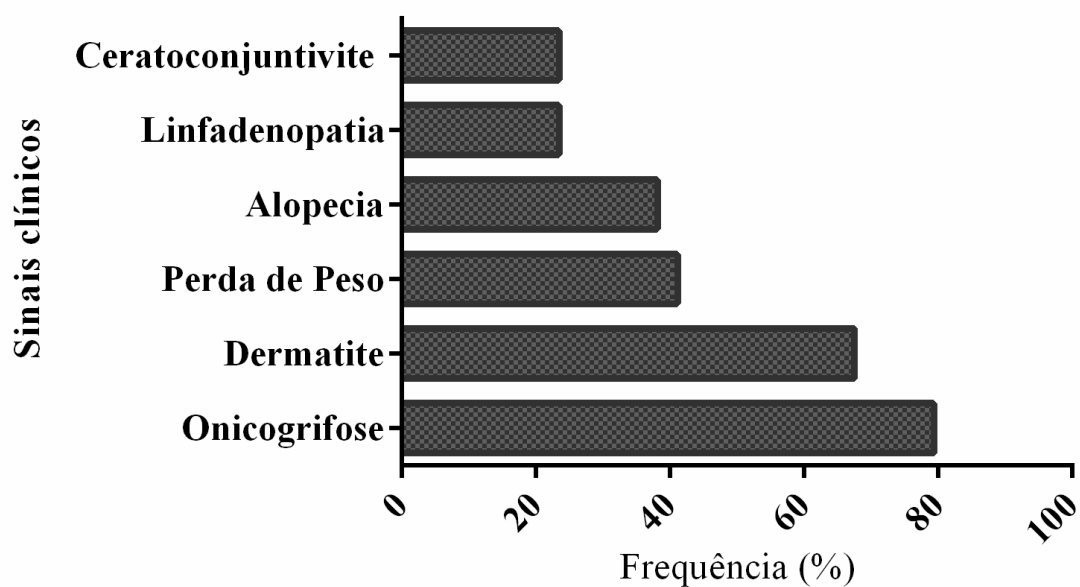


Figura 4.1 A frequência de sinais clínicos em cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. 41 animais naturalmente infectados foram incluídos no estudo. Os sinais clínicos mais frequentes nos animais foram onicogribose (79,4% dos animais) e dermatite (67,6% dos animais), mas também perda de peso (41,2% dos animais), alopecia (38,2% dos animais), linfadenopatia (23,5% dos animais) e ceratoconjuntivite (23,5% dos animais).

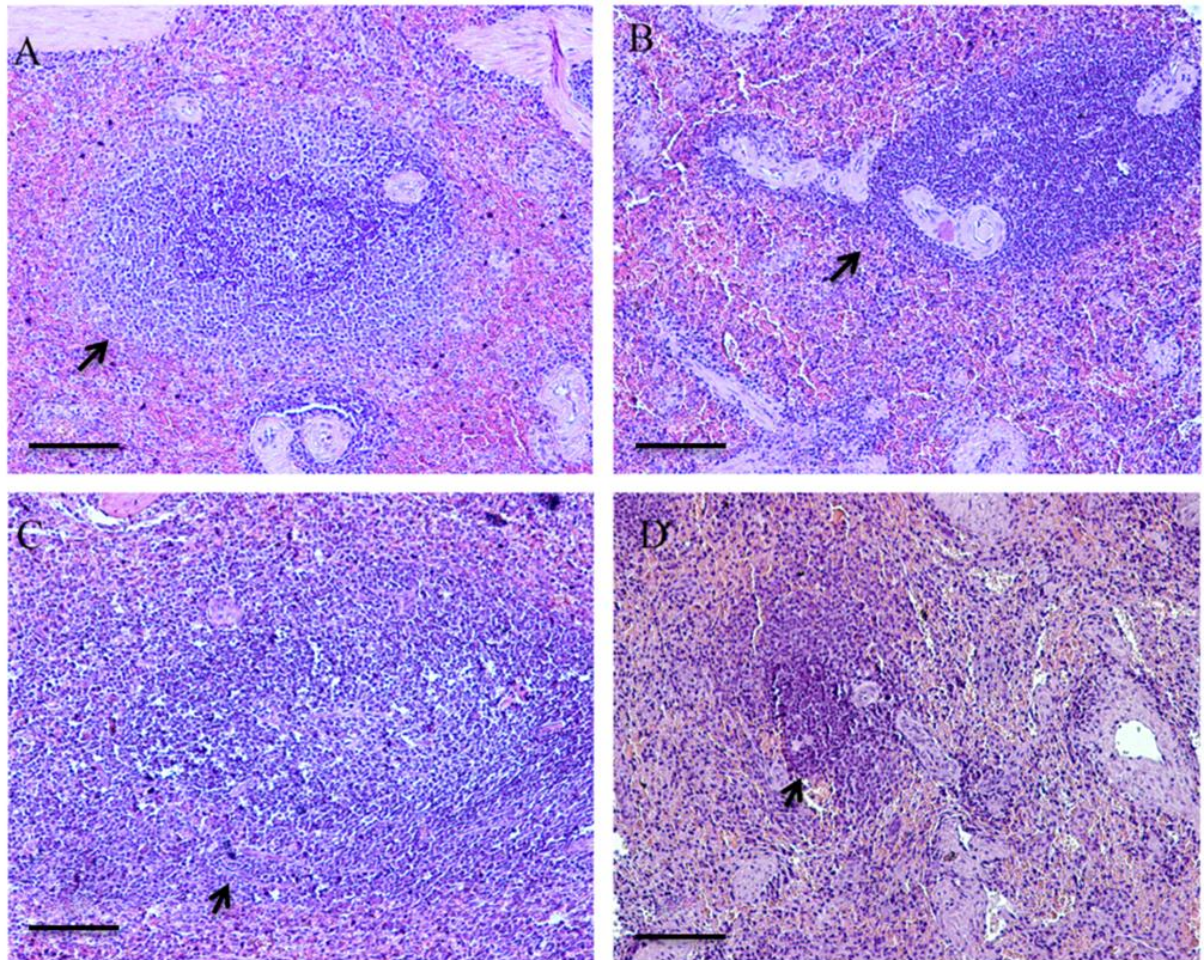


Figura 4.2 Graus de desorganização da polpa branca esplênica (PBE) em cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. (A) PBE organizada indicada pela seta- com bainha de linfócitos periarteriolar distinta indicada pela ponta de seta na parte direita inferior da imagem A, centro germinativo, zona do manto e zona marginal; (B) PBE pouco desorganizada - perda na definição de qualquer das regiões da polpa branca; (C) PBE moderadamente desorganizada - a polpa branca era evidente, mas suas regiões eram pouco individualizadas ou indistintas; (D) PBE intensamente desorganizada - a estrutura folicular era pouco distinta da polpa vermelha e áreas de células T. Objetiva 100x e barra de aumento=100 μ m. Hematoxilina e eosina.

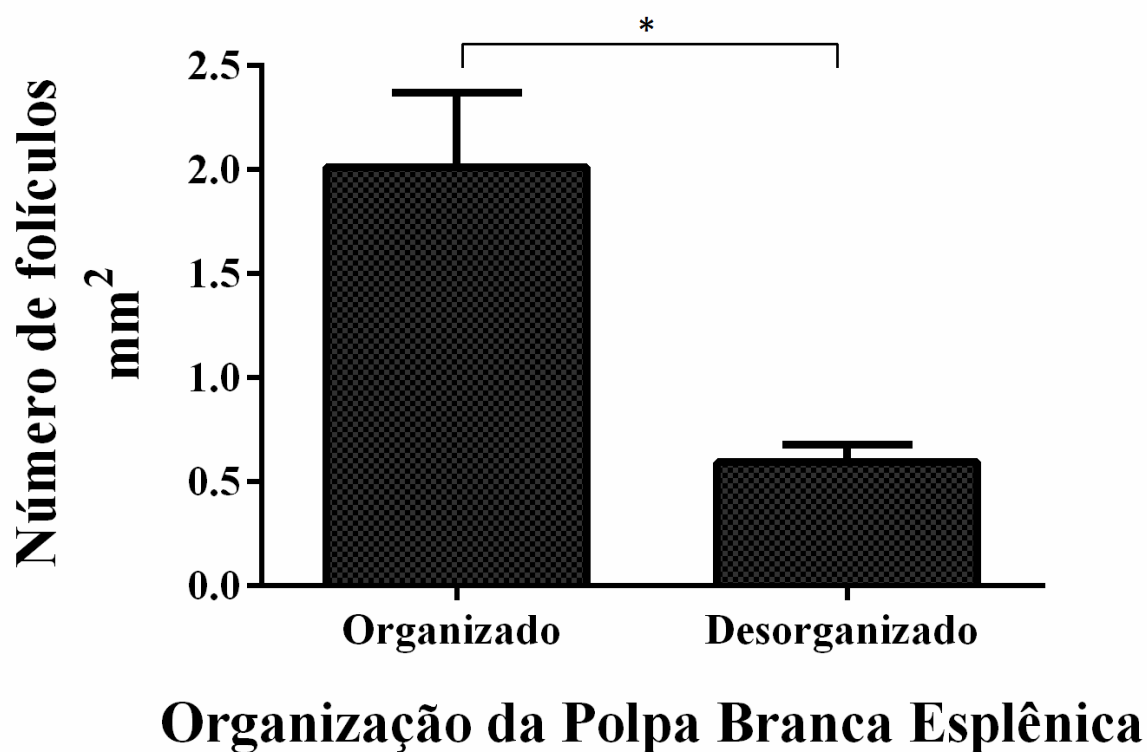
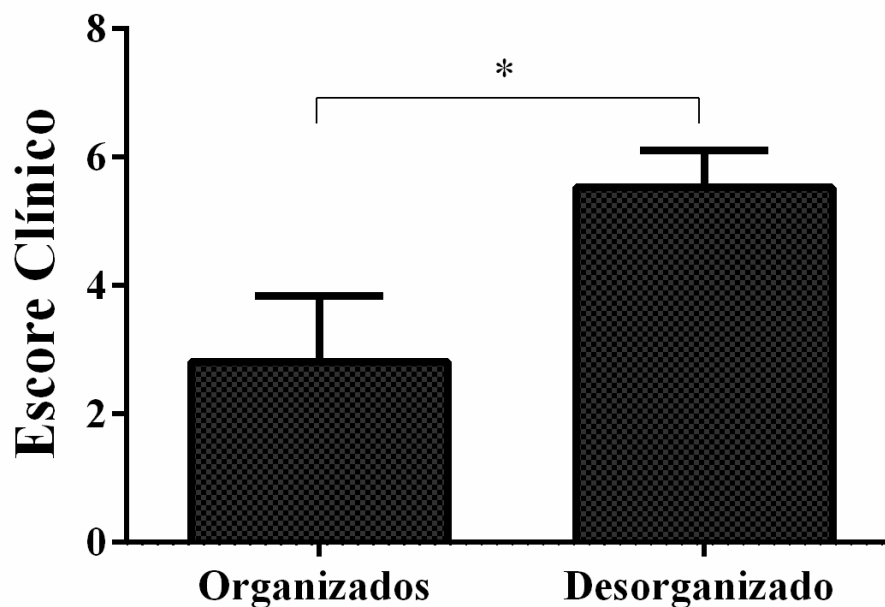


Figura 4.3 – Animais com desorganização da PBE apresentam redução do folículo linfóide. Grupo organizado é constituído por animais com PBE organizada a pouco desorganizada enquanto que o grupo desorganizado é constituído por animais com polpa branca médio a intensamente desorganizada.

4.3 A desorganização da PBE foi acompanhada de aumento do escore clínico

Os animais com PBE MD-ID apresentaram maior escore clínico (MÉDIA=2,81; Mediana 6,0; Mínimo-Máximo 0 a 12,0) do que os animais com PBE OR-PD (MÉDIA=5,53; Mediana 1,0 Mínimo-Máximo 0 a 8,0 $p = 0,021$) (Figura 4.4).



Organização da Polpa Branca Esplênica

Figura 4.4 A desorganização da polpa branca é associada ao progresso da doença. A desorganização da PBE foi acompanhada pelo aumento do escore clínico em cães naturalmente infectados. O grupo organizado é composto por animais com polpa branca organizada a pouco desorganizada e o grupo desorganizado é composto por animais com polpa branca moderadamente desorganizada a intensamente desorganizada. Teste T Student, $p=0,021$, $N_{OR-PD} = 11$; $N_{MD-ID} = 30$.

4.4 Aumento na deposição dos componentes da matriz extracelular (laminina e colágeno) está associado à desorganização da polpa branca esplênica

A maioria dos cães analisados neste estudo ($n= 30$, 73,2%) apresentou de moderada à intensa desorganização da PBE. Portanto, surge a hipótese dessa desorganização estar associada a uma modificação na expressão de moléculas de matriz extracelular. Neste contexto, a deposição de laminina, fibronectina e colágeno foram analisadas (Figura 4.5 A-I). Foi observada maior deposição de laminina e colágeno em cães com PBE de moderada a intensa desorganização (Figura 4.6 A-C) quando comparados aos animais com polpa branca organizada, desorganizada ($Pvalue= 0,045$ e $0,036$; respectivamente).

A deposição de fibronectina foi mais abundante na polpa vermelha e na região intrafolicular quando comparada com a deposição de laminina (Figura 4.5 A-C e 4.5 D-F, respectivamente). No grupo MD-ID, a deposição de laminina assumiu uma distribuição irregular, por exemplo, na delimitação de folículos a deposição de laminina foi descontínua e menos intensa do que em animais com polpa branca esplênica organizada a pouco desorganizada. Não foram observadas diferenças na deposição de fibronectina quando os grupos foram comparados. Por fim, observou-se uma correlação positiva entre as deposições de laminina e fibronectina ($p= 0,016$, $r^2 =0,393$ Figura 4.10A).

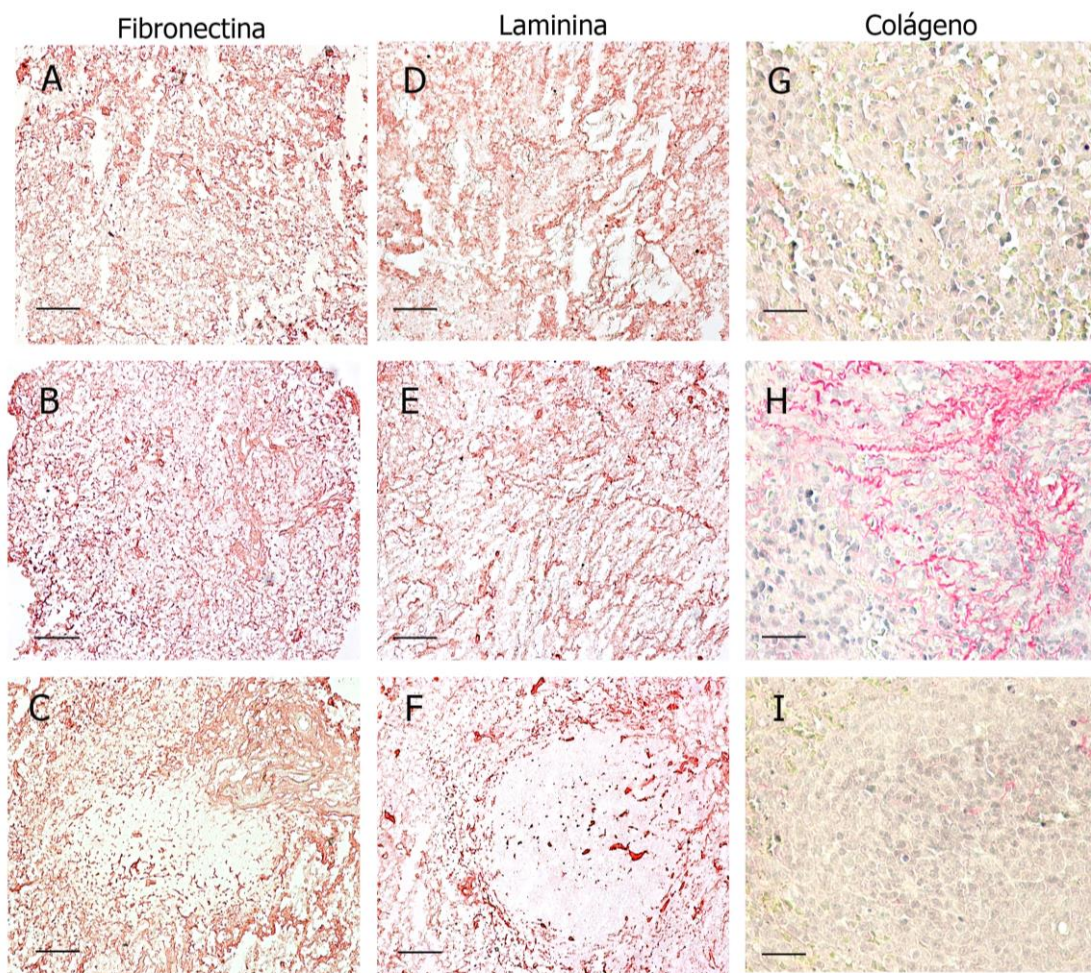


Figura 4.5- Prancha comparativa entre a deposição dos componentes estruturais da MEC esplênica de cão com polpa branca organizada, desorganizada e região folicular.

Em A, B e C deposição da fibronectina em cães com polpa branca organizada, desorganizada e região forlicular, respectivamente. Em D, E e F deposição de laminina em cães com polpa branca organizada, desorganizada e região folicular, respectivamente. Em G, H e I deposição de colágeno em animais com polpa branca organizada, desorganizada e região folicular. A-F Imunohistoquímica. G, H e I picrosírius red. Objetiva de 400x, barra de aumento de 25 μ m. As quantificações foram realizadas na polpa vermelha, uma vez que alguns animais apresentaram atrofia e ausencia de fólculo podendo interferir nas quantificações e resultados.

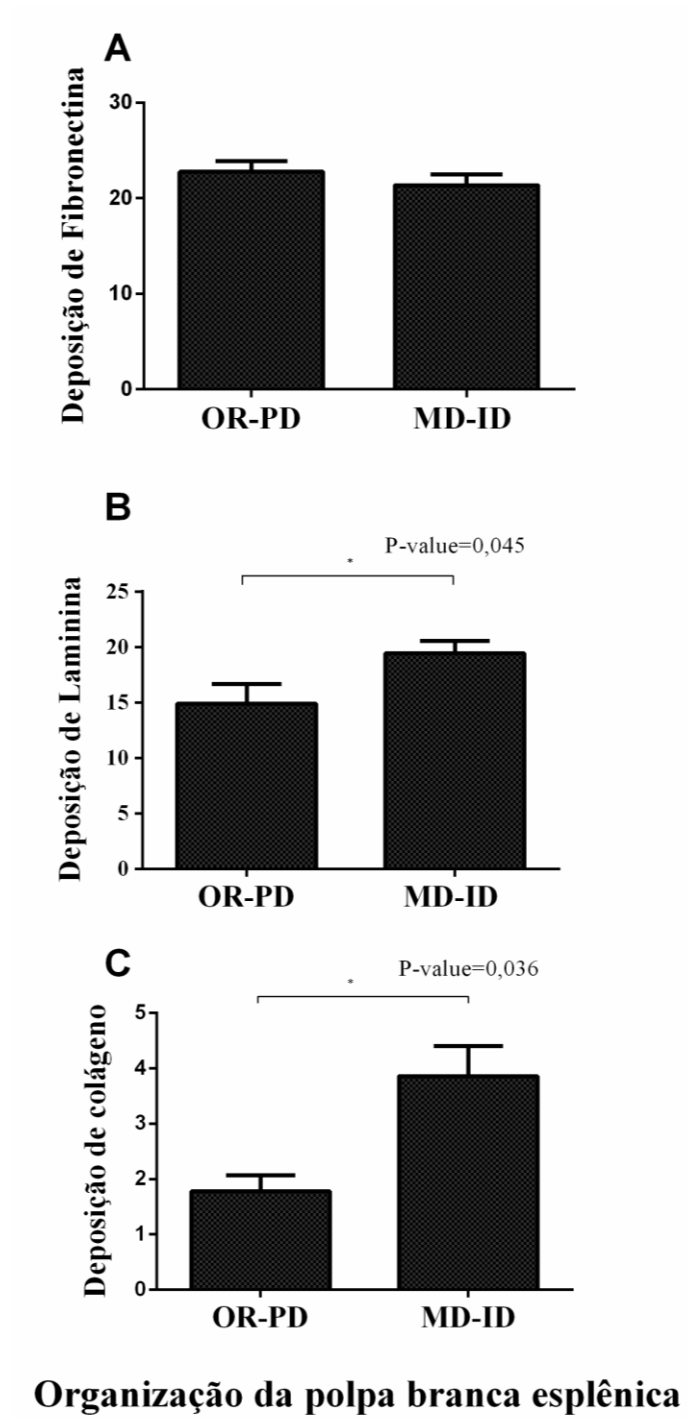


Figura 4.6- Cães naturalmente infectados apresentam moderada a intensa desorganização da polpa branca esplênica (PBE) e aumento na deposição de laminina e colágeno. (A) Deposição de laminina. (B) Deposição de fibronectina, (C) deposição de colágeno. Teste Mann-Whitney.

4.5 A expressão de metalopeptidase-9 é aumentada em animais com polpa branca esplênica desorganizada

Foram investigadas se as expressões de MMP-9 e ADAM-10 poderiam estar alteradas em animais apresentando algum grau de desorganização da PBE por imunohistoquímica (Figura 4.7 A-B). A expressão de MMP-9 esteve aumentada em animais que apresentaram PBE MD-ID quando comparados com OR-PD ($p= 0,025$) (Figura 4.7 C). Embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas para a expressão de ADAM-10, houve uma tendência em aumentar nos cães MD-ID ($p> 0,05$) (Figura 4.7 D).

4.6 Linfócitos CD4⁺ foram reduzidos no baço desorganizado

A fim de verificar quais subpopulações celulares estão reduzidas no baço de cães com polpa branca desorganizado, os linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e B CD21⁺ foram quantificadas na polpa vermelha através da técnica de imunohistoquímica (Figura 4.8 C, D e E respectivamente). As subpopulações de linfócitos CD4⁺ foram reduzidas em animais MD-ID quando comparadas com OR-PD ($p= 0,027$) (Figura 4.9 A). Não houve diferenças nas células CD8⁺ ou CD21⁺ entre os grupos (Figura 4.9 B e C) ($p> 0,05$). Além disso, houve correlações entre células CD21⁺ e expressão de MMP-9 ($p= 0,010$ e $r^2 = 0,401$) e deposição de colágeno ($p = 0,008$ e $r^2 = 0,418$) (Figura 4.10 C-B respectivamente). Foram avaliadas também células que expressam INF- γ ⁺ e IL-10⁺. Embora não houvesse diferenças entre os grupos, observou-se uma correlação positiva entre a expressão de INF- γ ⁺ e IL-10⁺ ($p= 0,0074$ e $r^2 = 0,412$) (Figura 4.9 D e E). Além disso, não houve diferença no processo de proliferação celular (Figura 4.9 F) As quantificações celulares foram realizadas na polpa vermelha uma vez que para a quantificação por mm² e percentual de área marcada o tamanho do folículo poderia ser um fator que influenciaria nestas contagens e nas futuras análises, o tamanho folicular pode apresentar variação até mesmo no mesmo campo analisado e muitos animais não apresentaram presença de folículo nos campos analisados. A polpa vermelha foi levada em consideração uma vez que é uma área de transição celular.

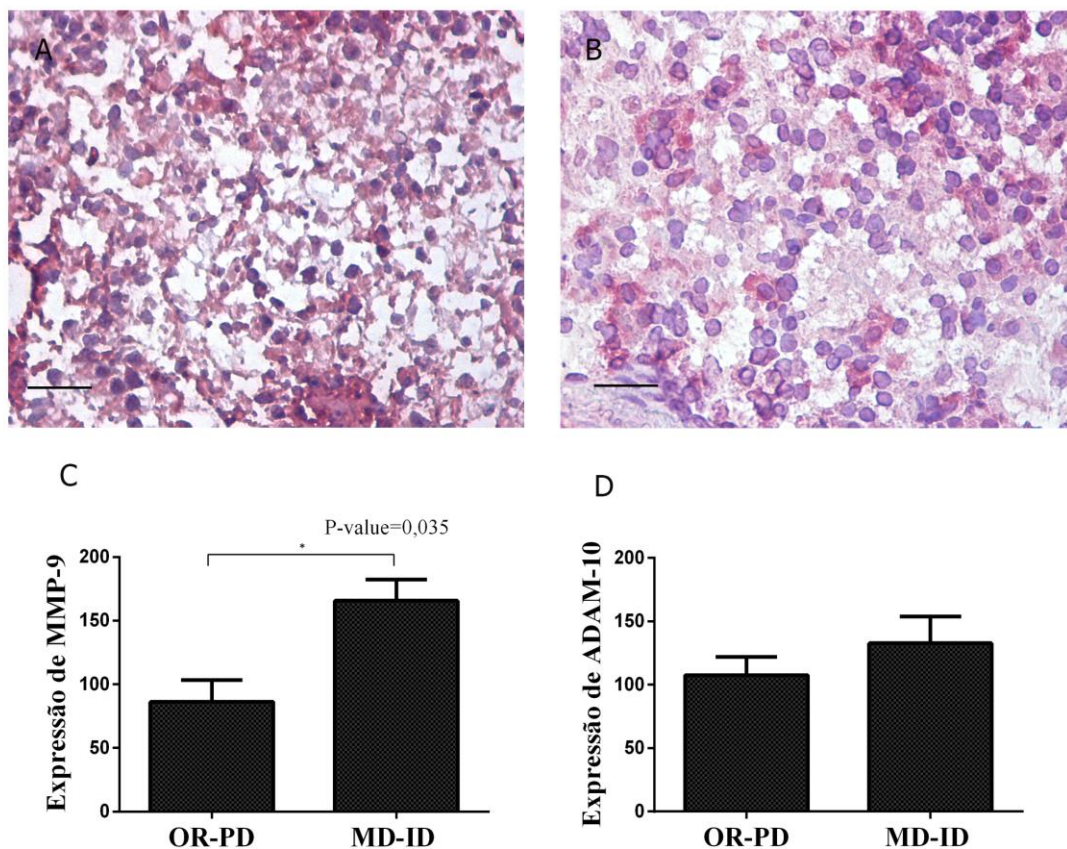


Figura 4.7- Análise da expressão de MMP-9 e ADAM-10 por imunohistoquímica. Em A, Imunomarcação de células expressando MMP-9. Em B, Imunomarcação de células expressando ADAM-10. Células positivas para MMP-9 e ADAM-10 estão marcadas em vermelho. Objetiva de 400x, barra de aumento de 25 μ m. Teste Mann-Whitney.

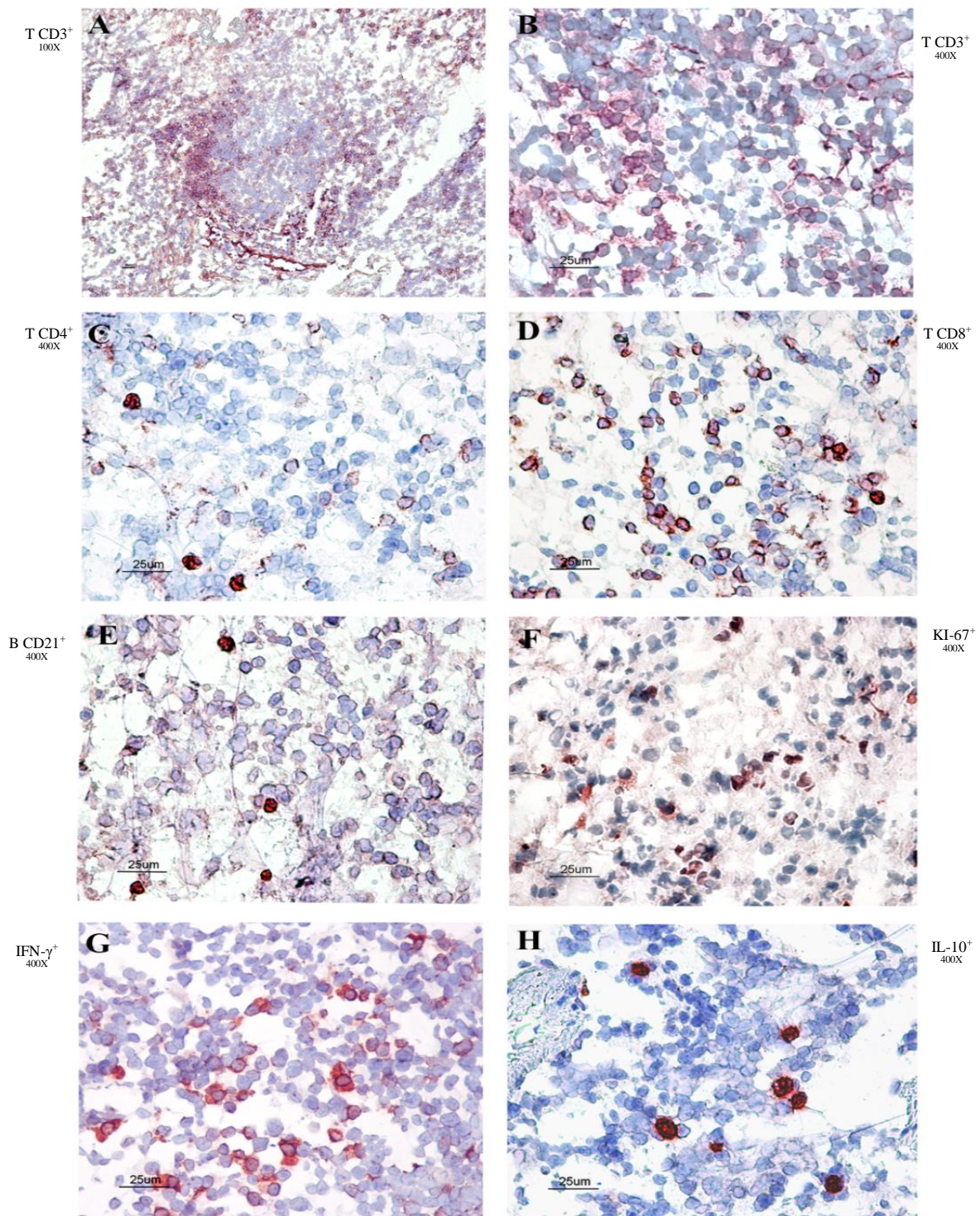
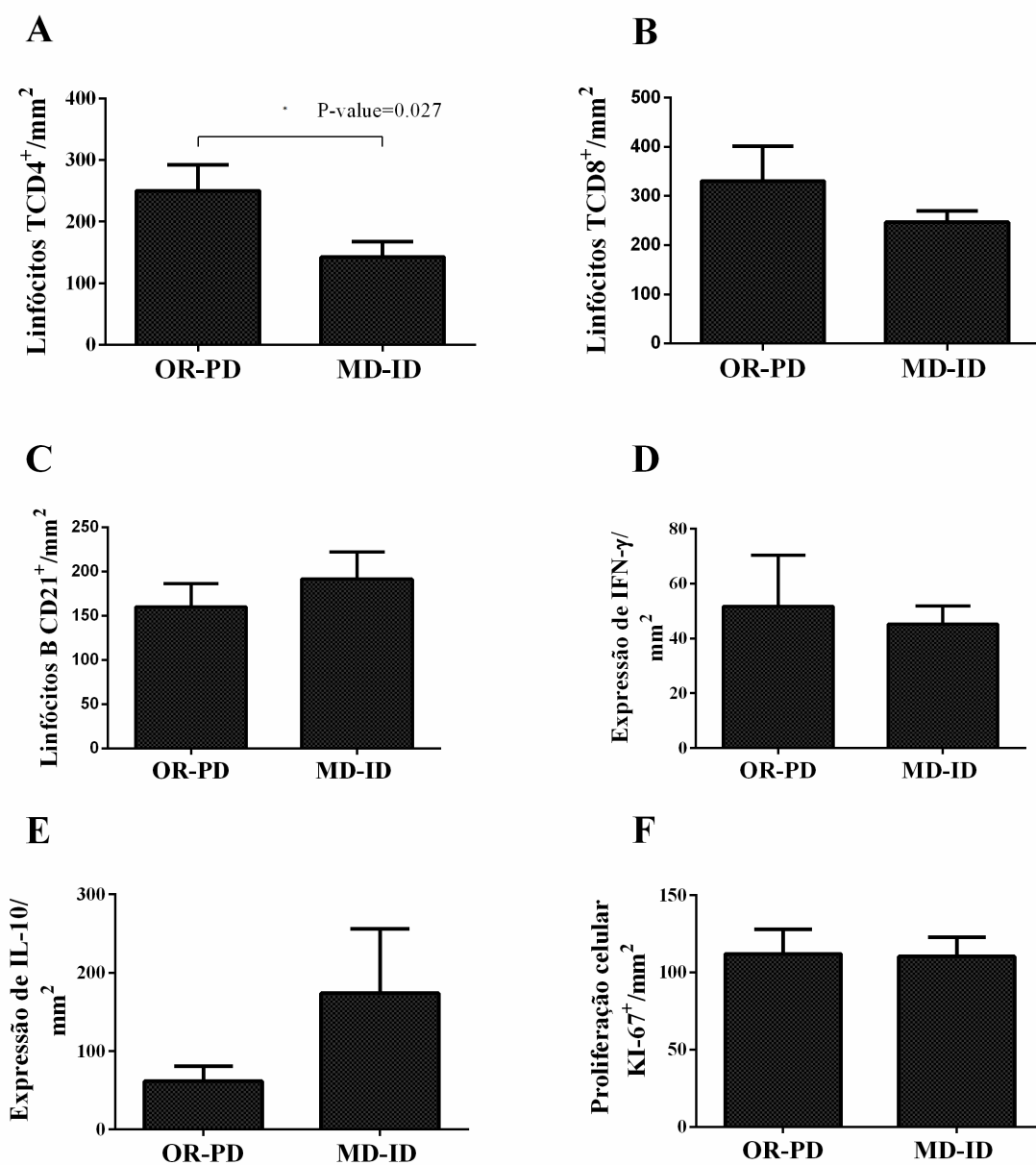


Figura 4.8 Imunohistoquímica das subpopulações celulares e citocinas (IFN-γ e IL-10) no tecido esplênico de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum*. Imunomarcção de células em (A) e (B) linfócitos CD3⁺, (C) CD4⁺, (D) CD8⁺, (E) CD21⁺ (F) Ki-67⁺, (G) IFN-γ⁺ e (H) IL-10⁺. Em A, Objetiva de 100x e barra de 100µm. Objetiva de 400x. Bar = 25µm. Células marcadas em vermelho são positivas para os alvos.



Organização da polpa branca esplênica

Figura 4.9- Animais com PBE desorganizada apresentam redução no número de linfócitos T CD4⁺, porém não há mudança no processo de proliferação celular. Em A, subpopulação de linfócitos T CD4⁺. Em B, subpopulação de linfócitos T CD8⁺. Em C, subpopulação de linfócitos B CD21⁺. Em D, células expressando IFN-γ. Em E, células expressando IL-10. Em F, células em processo de proliferação. Teste Mann-Whitney.

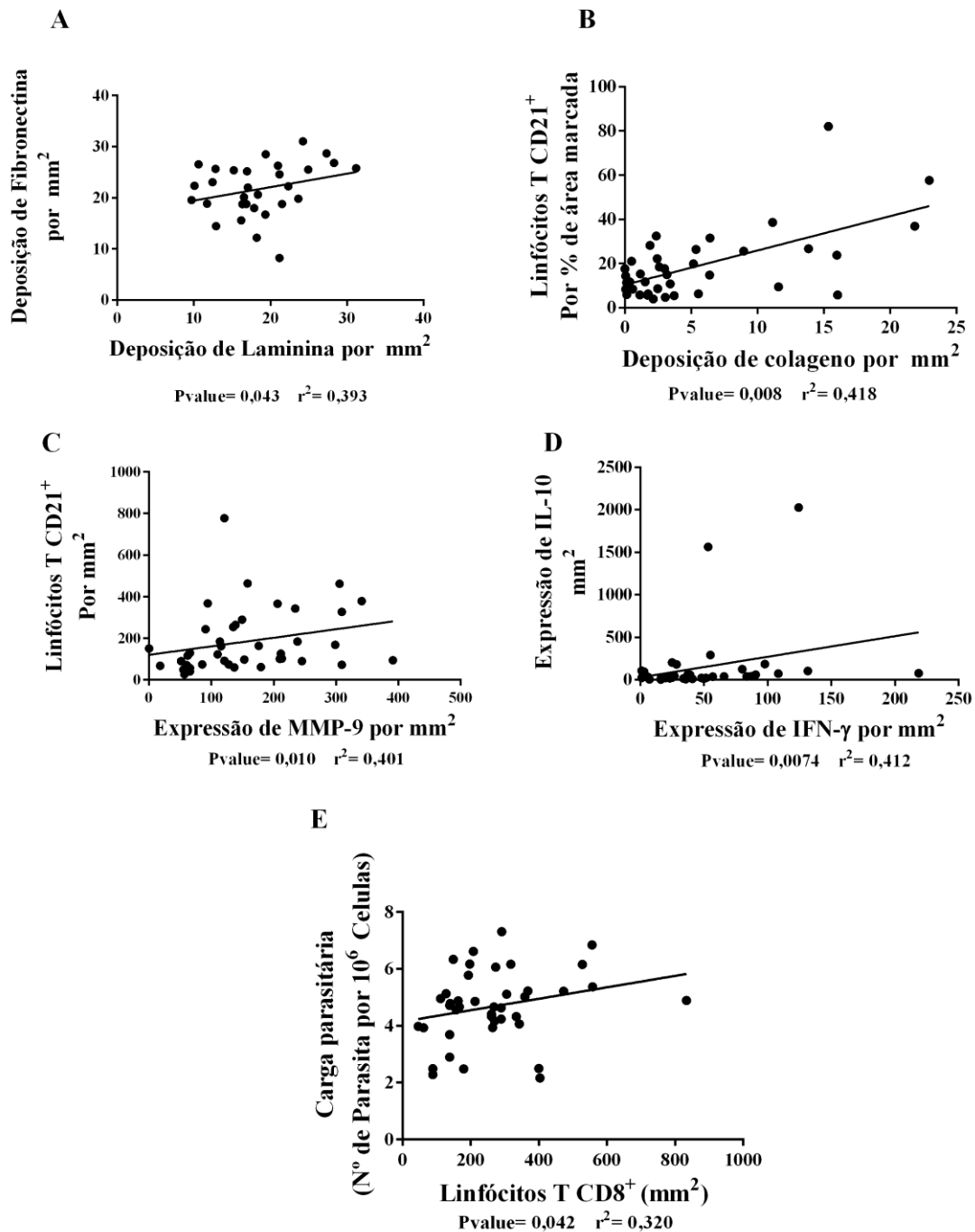


Figura 4.10- Correlações entre os componentes da matriz extracelular (MEC), subpopulações de células e carga parasitária. (A) Laminina e fibronectina, (B) células CD21⁺ e deposição de colágeno, (C) células CD21⁺ e expressão de MMP-9, expressão de (D) IL-10 e IFN- γ , células (E) CD8⁺ e carga parasitária. Correlação de Spearman.

4.7 Associação da análise histopatológica com carga parasitária para estimar uma evolução relativa da infecção

Como os cães foram infectados naturalmente e não são conhecidos os tempos de evolução, os dados sobre histopatologia foram associados aos de carga parasitária para estimar uma evolução relativa da infecção (Tabela 4.1). De acordo com Cavalcanti (2015), agrupamos os cães como: 1- Carga parasitária baixa e PBE organizada (LOW/OR); 2- Carga parasitária baixa e PBE desorganizada (LOW/DS) e 3- Carga parasitária elevada e PBE desorganizada (HIGH/DS). Apenas um animal apresentou alta carga parasitária e PBE organizada e por isso não foi incluído nesta análise. Comparando estes grupos, observou-se uma redução dos folículos linfoides ($p=0,0002$ para grupo LOW/DS e $p=0,021$ HIGH/DS, Figura 4.11 A). Houve aumento da deposição de laminina ($p=0,005$) mesmo antes da falha no controle do parasita (Figura 4.11 B). O aumento gradativo na deposição de colágeno ($p=0,041$, Figura 4.11 D) e expressão de MMP-9 ($p=0,035$, Figura 4.12 A) foram observados. Embora não significativa, houve uma tendência em aumentar a expressão de ADAM-10 em grupos desorganizados independente da carga parasitária (Figura 4.12 B). Não houve diferenças na deposição de fibronectina (Figura 4.11), bem como, no número de células $CD8^+$, $CD21^+$ e $Ki-67^+/\text{mm}^2$ ($p > 0,05$) (Figura 4.13 B-D). No entanto, observou-se redução dos linfócitos T $CD4^+/\text{mm}^2$ na polpa vermelha em cães com baixa carga parasitária e PBE desorganizada quando comparados com baixa carga parasitária e PBE organizada ($p=0,0021$) (Figura 4.13 A). Além disso, o número de linfócitos T $CD4^+/\text{mm}^2$ na polpa vermelha de animais que apresentam alta carga parasitária e PBE desorganizada foi similar aos animais com baixa carga parasitária e PBE organizada ($p > 0,05$), embora haja redução e atrofia da bainha periarteriolar e folículos linfoides (Figura 4.10 G). Em análise a expressão de citocinas, não houve diferenças significativas na expressão das mesmas entre os grupos formados pela organização da PBE e carga parasitária (Figura 4.12 C e D). Estes dados sugerem que em infecções avançadas, as células $CD4^+$ que restam no baço, permanecem retidas na polpa vermelha, provavelmente impedidas de migrar para as suas áreas de segregação na polpa branca esplênica.

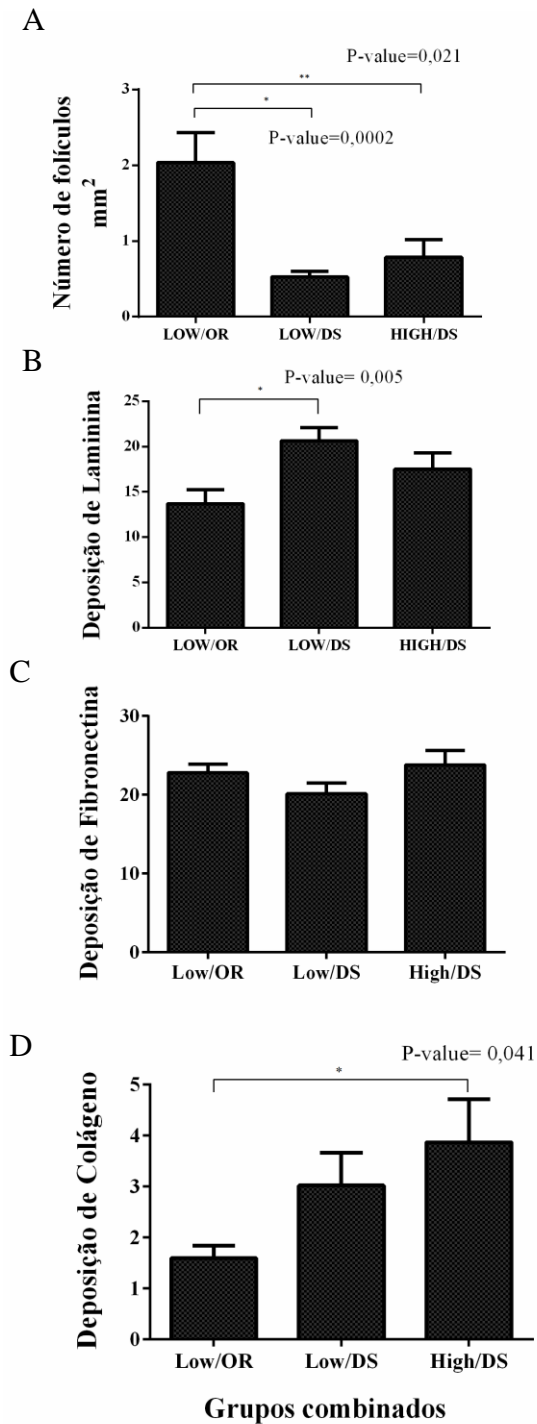


Figura 4.11- O processo de desorganização da PBE é associado ao aumento na deposição dos componentes da MEC e tem início quando os animais apresentam baixa carga parasitária. (A) Folículos linfoides, (B) deposição de laminina, (C) deposição de fibronectina, (D) deposição de colágeno. LOW/OR= carga parasitária baixa e polpa branca esplênica organizada LOW/DS= carga parasitária baixa e polpa branca esplênica desorganizada moderada a intensa. HIGH/DS = carga parasitária elevada e polpa branca esplênica desorganizada moderada a intensa. Teste Mann-Whitney.

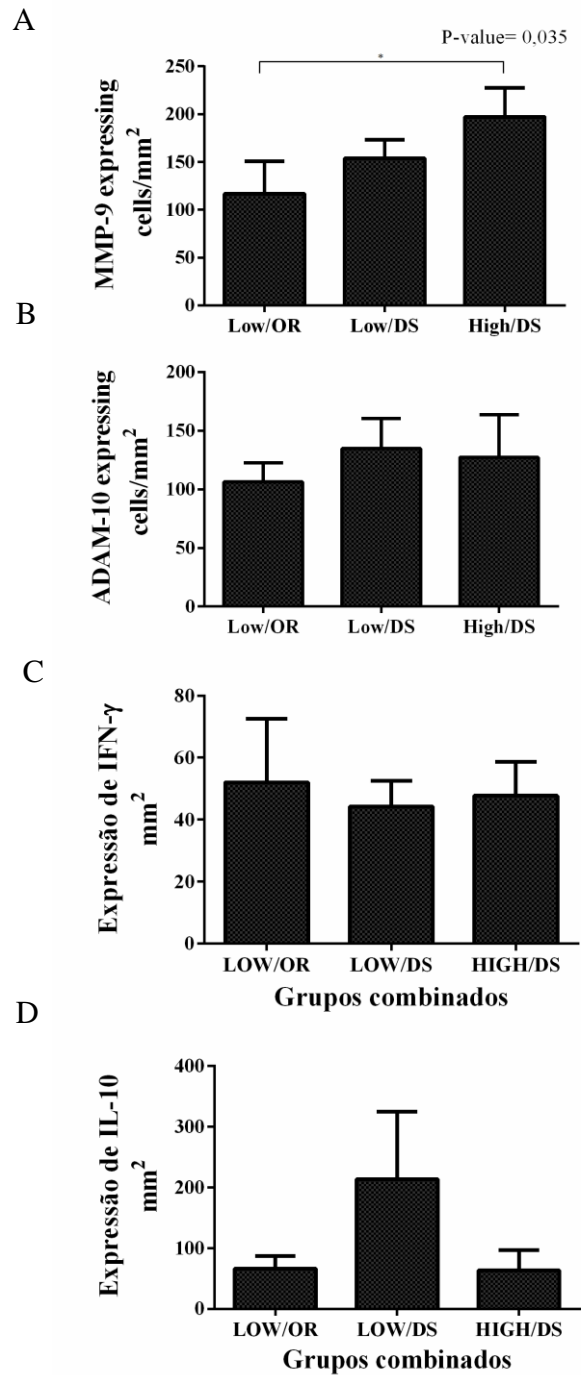
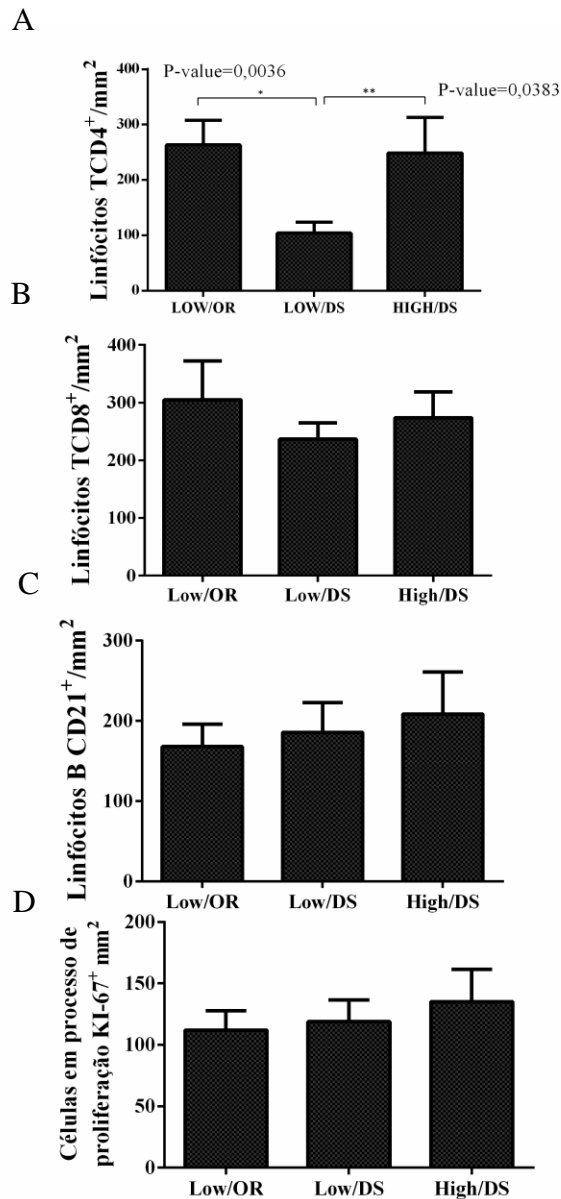


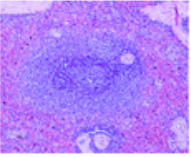
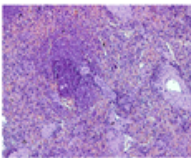
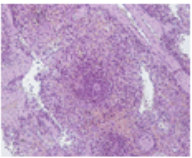
Figura 4.12- Animais com PBE desorganizada e alta carga parasitária apresentam maior expressão de MMP-9 quando comparada aos demais grupos. (A) Expressão de MMP-9 (B) Expressão de ADAM-10 (C) Expressão de IFN- γ (D) Expressão de IL-10. LOW/OR= carga parasitária baixa e polpa branca esplênica organizada LOW/DS= carga parasitária baixa e polpa branca esplênica desorganizada moderada a intensa. HIGH/DS = carga parasitária elevada e polpa branca esplênica desorganizada moderada a intensa.



4.13- O processo de proliferação celular não é afetado em cães naturalmente infectados, no entanto, animais com PBE desorganizada e baixa carga parasitária apresentam redução na subpopulação de linfócitos T CD4⁺. (A) Imunomarcagem de linfócitos TCD 4⁺. (B) Imunomarcagem de linfócitos TCD 8⁺. (C) Imunomarcagem de linfócitos B CD 21⁺ (D) Células KI-67⁺. LOW/OR= carga parasitária baixa e polpa branca esplênica organizada LOW/DS= carga parasitária baixa e polpa branca esplênica desorganizada moderada a intensa. HIGH/DS = carga parasitária elevada e polpa branca esplênica desorganizada moderada a intensa. Mann-Whitney.

/

Tabela 4.1 Estimativa relativa de evolução da imunopatogênese no baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*.

Animais Low/OR	Animais Low/DS	Animais High/DS
		
N=10	N=22	N=8
Baixa carga parasitária	Baixa carga parasitária	Alta carga parasitária
Compartimentalização da SWP	Perda da compartimentalização SWP, redução das áreas de células T	Perda da compartimentalização SWP, redução das áreas de células T
Presença de folículos compartimentalizados	Redução do número de folículos compartimentalizados	Redução/ausência do número de folículos compartimentalizados
Deposição Laminina, fibronectina e colágeno	Aumento na deposição de laminina e colágeno, mas não de fibronectina	Aumento da deposição de colágeno e laminina, mas não fibronectina
Expressão de MMP-9	Aumento na expressão de MMP-9	Aumento da expressão de MMP-9
Subpopulações de Linfócitos T e B na polpa vermelha	Redução do número de Linfócitos T CD4⁺ na polpa vermelha Não há diferença entre as demais subpopulações	Numero de linfócitos T CD4⁺ na polpa vermelha se aproxima ao número destes em animais Low/OR Não há diferença entre as demais subpopulações

Animais Low/OR- Animais com baixa carga parasitária (Low) e polpa branca organizada (OR)

Animais Low/DS- Animais com baixa carga parasitária (Low) e polpa branca desorganizada (DS)

Animais HIGH/DS- Animais com alta carga parasitária (Low) e polpa branca desorganizada (DS)

5.0 Discussão

Neste estudo, baços de 41 cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum* foram avaliados. Foram detectadas alterações histológicas, de componentes estruturais da matriz extracelular, expressão de metalopeptidases e quantidade de células CD4⁺.

A compartimentalização dos órgãos linfoides é de extrema importância para o desenvolvimento adequado da resposta imunológica, uma vez que nestas áreas são iniciadas as etapas de interação, apresentação antigênica, ativação celular e desenvolvimento da resposta imune efetora frente ao patógeno (LOKMIC *et al.*, 2008).

A manutenção da compartimentalização é dada através da distribuição de quimiocinas como CXCL13 para o recrutamento de linfócitos B para a região de polpa branca dentro do órgão linfoide. As quimiocinas CCL19 e CCL21 atuam no recrutamento de linfócitos T e células dendríticas para a região da bainha linfática periarteriolar e zona marginal, respectivamente, contribuindo assim para a organização dos compartimentos linfoides (MEBIUS & KRAAL, 2005; NOMBELA-ARRIETA, 2008).

Em infecção experimental, camundongos com deficiência na expressão de CCL19 e CCL21 foram mais susceptíveis a infecção por *Leishmania donovani*, uma vez que células dendríticas não conseguiram migrar para a região de PALS na polpa branca esplênica onde realizam a apresentação do antígeno para linfócitos T (ATO *et al.*, 2006). Além de CCL19 e CCL21, a quimiocina CXCL13 apresenta redução na sua expressão em cães infectados com polpa branca desorganizada, estando associada a atrofia folicular esplênica prejudicando a resposta imunológica do hospedeiro e progressão da leishmaniose visceral (SILVA *et al.*, 2012).

No entanto, vale ressaltar que o processo de desorganização da polpa branca não envolve somente a expressão de quimiocinas, mas também o aumento na deposição dos componentes da MEC como, por exemplo, a deposição de laminina, fibronectina e colágenos e remodeladas pela ação metaloproteínases como observado no presente estudo. Além disso, a distribuição de quimiocinas é realizada com auxílio de sistemas de condúites que segundo Lokmic e colaboradores (2008) são formados por laminina, colágeno tipo IV e fibroblastos. O aumento na deposição dos componentes estruturais da MEC no baço aqui descrito poderia estar associado à alteração na composição básica do sistema de condúites, contribuindo para a

baixa distribuição de quimiocinas e assim favorecendo a desorganização da compartimentalização esplênica. O aumento destes componentes pôde ser observado em animais com PBE já desorganizada, nos quais houve aumento da expressão de MMP-9, importante enzima degradadora de colágeno IV, proteína constituinte do sistema de conduítes.

Além de auxiliar no transporte de quimiocinas, citocinas e moléculas de baixo peso molecular, o sistema de conduítes atua na migração de células como células dendríticas, linfócitos B e T, agindo como um “corrimão” para estas células (GRETZ *et al.*, 2000; LOKMIC *et al.*, 2008; ROOZENDAAL *et al.*, 2009). Assim, o sistema de conduítes apresenta importante papel na manutenção da organização da PBE, bem como no direcionamento e suporte da migração de diferentes células envolvidas na resposta imune celular. No entanto, poucos estudos tem sido desenvolvidos sobre o papel desta estrutura e suas alterações durante a infecção por *Leishmania* sp.

Para o desenvolvimento de uma resposta imune adequada no tecido esplênico, faz-se necessária manutenção da compartimentação em áreas segregadas e, de acordo com Lokmic e colaboradores (2008), a MEC desempenha um papel importante no desenvolvimento de células imunes dentro de seus nichos esplênicos. Neste estudo, a maioria dos animais apresentou desorganização da microarquitetura da polpa branca esplênica (N = 30, 73,2%), o que sugere que esta seja uma alteração frequente na leishmaniose visceral canina. Esta desorganização foi acompanhada por uma redução no tamanho e número de folículos linfóides e bainha linfática periarteriolar, bem como uma redução na quantidade de linfócitos CD4⁺ na polpa vermelha. Estes dados sugerem que os linfócitos T e B não estejam migrando para seus locais específicos e/ou estejam entrando em processo de apoptose. A presença de células apoptóticas já foi demonstrada por Silva e colaboradores (2012), onde foi observado que animais naturalmente infectados apresentaram redução na população de linfócitos T totais e aumento da porcentagem de células apoptóticas no baço e sangue periférico. A infecção por *Leishmania chagasi* (sinonímia de *Leishmania infantum*) poderia induzir o processo de apoptose resultando na diminuição da celularidade no baço, além disso, porcentagem de células apoptóticas foi relacionada a desorganização da polpa branca contribuindo para a imunossupressão e ineficiência da resposta celular durante o curso da infecção. A redução da celularidade do baço já havia sido demonstrada no modelo murino de infecção experimental com *Leishmania infantum* (SILVA *et al.*, 2012; CUERVO-ESCOBAR *et al.*, 2014).

O baço é um órgão linfoide secundário que apresenta áreas segregadas de linfócitos T e B, o que favorece a apresentação e ativação antigênica dessas células. A ausência ou

redução de linfócitos em suas áreas específicas poderia levar a um déficit de ativação que contribuiria para a falha no controle da carga parasitária. Nesse sentido, observou-se a redução dos linfócitos T CD4⁺ nos animais com polpa branca variando de moderada a intensa desorganização. Em trabalhos prévios, já foi demonstrado que no baço de animais com leishmaniose visceral canina ocorre uma redução na expressão de várias citocinas, quimiocinas e seus receptores (QUINNEL *et al.*, 2001; CAVALCANTI *et al.*, 2015), em particular a redução de CXCL13 em linfócitos B, associada à atrofia e desorganização de folículos linfóides (SANTANA *et al.*, 2008; MICHELIN *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012; CAVALCANTI *et al.*, 2015). No presente estudo, observou-se que a maioria dos animais apresentava baixa carga parasitária e já mostravam algum grau de desorganização da polpa branca esplênica, bem como redução na quantidade de linfócitos T CD4⁺, acompanhada pelo aumento da expressão da laminina. O aumento na expressão de laminina, colágeno e MMP-9 coincidiram com a desorganização da polpa branca esplênica, mesmo em animais de baixa carga parasitária. Este aumento na expressão de moléculas de matriz extracelular pode ser causado pela inflamação intensa que ocorre nos momentos iniciais da infecção (STRAUSS-AYALI *et al.*, 2007; LOKMIC *et al.*, 2008; MELO *et al.*, 2011). O aumento de MMP-2 e MMP-9 no soro de cães com leishmaniose visceral foi demonstrado previamente (MELO *et al.*, 2011; HOPPS & CAIMI *et al.*, 2012). Neste contexto, as metaloproteinases produzidas por macrófagos ativados como MMP-9, MMP-3 e MMP-10 (LIM, 2013) podem ter suas expressões positivamente reguladas neste processo inflamatório inicial, levando a alterações na distribuição de colágeno, laminina e fibronectina. A participação destas moléculas nos processos de migração de células inflamatórias para o local da infecção já foi estabelecido (GEBERHIWOT *et al.*, 2000; YAMADA *et al.*, 2000; FUJIWARA *et al.*, 2001; LU *et al.*, 2011). Como resultado haveria a modificação do arcabouço tecidual, consequentemente, gerando a alteração histológica de desorganização da polpa branca esplênica. O aumento da deposição de componentes da MEC tem sido descrito no fígado, timo e linfonodo (DRUMEA-MIRACEA *et al.*, 2005; MELO *et al.*, 2009), e foi correlacionado com o aumento da carga parasitária, sugerindo que o parasita poderia usar laminina e fibronectina do hospedeiro para interagir com macrófagos. A degradação da fibronectina poderia gerar fragmentos de peptídeos, que se ligam a receptores em macrófagos, diminuindo a ativação e a função dessas células. Além disso, os autores sugeriram que as mudanças na deposição desses componentes poderiam refletir no processo inflamatório e degenerativo. Além disso, Santana e colaboradores (2008) mostraram que o processo inflamatório é importante na disseminação do parasita. Por outro lado, existe a possibilidade de que o parasita cause efeitos diretos sobre

as moléculas da matriz extracelular (MELO *et al.*, 2009). No entanto, não foi observada associação entre a carga parasitária e a expressão de laminina, fibronectina ou colágeno, o que torna a primeira hipótese mais provável.

No presente estudo observou-se aumento progressivo da expressão de MMP-9 associada à desorganização da polpa branca esplênica, bem como o aumento da carga parasitária. Foi descrito que a MMP-9 desempenha importante papel na orientação durante o processo de migração celular através da degradação de colágeno, importante componente da matriz extracelular (CHADZINSKA *et al.*, 2008; LU *et al.*, 2011). Assim, tal enzima está associada ao processo de remodelamento tecidual e a facilitação da migração de células que atuam no desenvolvimento do infiltrado inflamatório no sítio de lesão (CHADZINSKA *et al.*, 2008; JIN *et al.*, 2010; HOPPS & CAIMI, 2012; SCHUINDT *et al.*, 2012). No entanto, a possível ação dos inibidores das metalopeptidases não pode ser excluída (BREW *et al.*, 2010). Durante o remodelamento da matriz extracelular sob ação de metaloproteínas como MMP-9 há participação de reguladores das enzimas para que haja um adequado processo de remodelamento e reparo tecidual. TIMPs (*Tissue inhibitors of metalloproteinases*) são exemplo de reguladores de metalopeptidases, pois são inibidores endógenos de metaloproteínas (BREW *et al.*, 2010; BOURBOULIA *et al.*, 2010). A desregulação na expressão e ativação das metaloproteínas pode estar associada ao dano tecidual, perda da homeostase da matriz extracelular, aumento da migração celular, formação tumoral (BREW *et al.*, 2010). Em pacientes com leishmaniose dérmica pós-calazar, manifestação posterior em forma de pápulas e nódulos após o tratamento da LV no velho mundo, os níveis de TIMP-1, inibidor de gelatinase e protease, é maior que em pacientes com a LV ativa, mostrando que TIMP-1 atua na contenção do dano tecidual induzido por metalopeptidases (ANSARI *et al.*, 2008). Os TIMPs não atuam somente no controle da ação de metalopeptidases, mas também no controle da proliferação, migração e invasão celular e anti-angiogêneses, além disso, em relação à celularidade, em linfócitos B, TIMPs auxiliam na diferenciação para plasmócitos e em alguns momentos age também como molécula supressora do crescimento celular (BREW *et al.*, 2010).

Outra metalopeptidase avaliada neste estudo foi ADAM-10 (desintegrina e metalopeptidase 10). Em nosso conhecimento, este estudo consiste no primeiro relato sobre a expressão de ADAM-10 no baço de cães infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum*. A desintegrina ADAM-10 também está envolvida na degradação do colágeno tipo IV (LIM, 2013) e na ontogenia dos folículos linfóides (CHAIMOWITZ *et al.*, 2011; FOLGOSA *et al.*, 2013). Seu principal papel é agir como regulador dos processos celulares a partir da clivagem

de domínios transmembranares de receptores e ligantes auxiliando na ativação dos sinais intracelulares (GIBB *et al.*, 2010; CHILLAKURI *et al.*, 2012).

Outro importante papel de ADAM-10 é o de regulação e manutenção da arquitetura linfóide dos órgãos linfóides secundários, atuando na clivagem de pró-TNF- α em TNF- α importante citocina pro-inflamatória, formação dos centros germinativos e desenvolvimento dos linfócitos B da zona marginal via clivagem do receptor transmembranar NOCTH-2, (FOLGOSA *et al.*, 2013). A ausência de ADAM-10 em camundongos nocautes gerou déficit na expressão de TNF- α , que é clivado por ADAM-17, num mecanismo compensatório, resultando no aumento da transformação da forma pró-TNF- α em TNF- α e em paralelo, induzindo o aumento da expressão do gene relacionado a TNF (FOLGOSA *et al.*, 2013). A expressão aumentada de TNF- α gera desequilíbrio nos níveis de citocinas dentro da região de linfócitos B no folículo, induzindo a disruptura da arquitetura do folículo no linfonodo (FOLGOSA *et al.*, 2013). Neste contexto, Cavalcanti et al (2015) mostrou aumento de TNF em cães infectados com baixa carga parasitária.

No presente estudo, a expressão de ADAM-10 foi detectada em todos os grupos avaliados. Embora não significativa, houve tendência de aumento de sua expressão no baço de cães infectados de acordo com a desorganização da polpa branca esplênica. Os dados sugerem o envolvimento de metalopeptidases (MMP-9 e ADAM-10) na desorganização da polpa branca esplênica na leishmaniose visceral canina. Juntos, os dados corroboram a hipótese de que o processo inflamatório em resposta à infecção parasitária poderia estar diretamente relacionado às mudanças na deposição de componentes da matriz extracelular levando a uma desorganização da polpa branca esplênica. Apesar do ambiente inflamatório desenvolvido pelo hospedeiro, o parasita pode escapar do sistema imunológico nos cães (OLIVER *et al.*, 2005) e persistir levando a um estímulo permanente, dano tecidual e doença crônica.

Um exemplo de escape do sistema imunológico é a interferência produzida pelo parasita na interação entre o receptor CD40 expresso em células B, monócitos, células dendríticas, células endoteliais e epiteliais e seu ligante CD40L membro da família de TNF expresso em linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ (OLIVEIRA *et al.*, 2013). A forte interação entre CD40/CD40L induz a expressão de IFN- α e IL-12 e direciona a resposta imune para o perfil Th1, ao passo que a fraca interação entre CD40/CD40L induz a expressão de TGF- β e IL-10 direcionando a resposta imune para o perfil de células Th2 em infecção por *Leishmania major* (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Em macrófagos infectados por *Leishmania major* o parasita direciona a interação CD40/CD40L para uma fraca interação através do aumento da fosforilação da quinase regulada por sinal extracelular ERK-1/2 (Extracellular Signal-

Regulated Kinase 1/2) que ativa a expressão de IL-10 que não é eficiente no controle do parasita intracelular e assim favorecendo a persistência do parasita (MATHUR *et al.*, 2004).

Conseqüentemente, a inflamação prolongada poderia causar lesão tecidual e desorganização esplênica intensa. Esta desorganização poderia dificultar a comunicação celular, via déficit de expressão de citocinas e quimiocinas, conseqüentemente impedindo a ativação celular. A privação de estímulos poderia levar à apoptose destas células, e estes dois processos (migração deficiente e apoptose) poderiam estar correlacionados. Nesse sentido, De Lima e colaboradores (2012) observaram um aumento na apoptose no baço e sangue periférico de cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados, mas outros experimentos precisam ser realizados para confirmar esta hipótese. O padrão de migração dificultada, redução da celularidade na bainha linfática periarteriolar e atrofia folicular, bem como a ausência de estímulos celulares poderiam estar associados a uma possível falha no controle da carga parasitária e na progressão da doença. Os animais com polpa branca desorganizada apresentaram maior deposição de laminina e uma redução dos linfócitos T CD4⁺. No tecido tímico, O'campo e colaboradores (2008) relataram que o aumento da deposição de laminina estaria associada à migração e saída prematura dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Neste contexto, as células CD4⁺ poderiam sair do baço por mecanismos ainda não conhecidos. Em cães com alta carga parasitária, observou-se aumento de linfócitos CD4⁺ na polpa vermelha semelhante ao grupo de polpa branca esplênica organizada, porém houve atrofia de bainha linfática periarteriolar e folículos linfoides. Sugere-se que os linfócitos CD4⁺, em infecção avançada, estariam incapacitados de migrar para os seus compartimentos específicos dentro da polpa branca, talvez devido à baixa expressão de quimiocinas, citocinas e seus receptores, ou devido às alterações na distribuição de condúites esplênicos. Outras análises devem ser feitas para confirmar esta hipótese.

Um parâmetro para avaliar a resposta imune mediada por células é a formação de granulomas, que é considerada como a resposta imune eficiente no controle da carga parasitária na leishmaniose visceral (KAYEL & BEATTIE 2015). Em macaco Rhesus (*macaca mulata*) com LC, a formação granulomatosa ocorre por células gigantes de Langhans, células epitelióides, células plasmáticas, macrófagos parasitados e linfócitos. Tal estrutura é envolta por fibroblastos e deposição de fibrose estabelecendo o granuloma bem formado (KAYE & BEATTIE, 2016).

Em LV a formação completa do granuloma é controversa. Nos órgãos linfoides de pacientes sintomáticos no velho mundo, há formação incompleta de granulomas e nestes pacientes são observados hepatoesplenomegalia, linfadenopatia e elevados níveis de células

plasmáticas (KAYE *et al.*, 2004). Por outro lado, no fígado de pacientes assintomáticos também do velho mundo há relatos da formação de granuloma (PAMPIGLIONE, 1974). Em modelo canino, a formação de granuloma no fígado é bem descrita, com marcada formação dos mesmos e inflamação granulomatosa, ao passo que nos linfonodos e no baço não houve formação de granuloma, sendo observados também a depleção da polpa branca esplênica e macrófagos altamente infectados (XAVIER *et al.*, 2006).

No presente estudo observamos a presença de granulomas bem formados em apenas 6 animais. Contrariamente ao esperado, a carga parasitária nestes animais com granulomas bem formados foi maior do que nos animais onde esta formação não foi observada. Esses dados sugerem um atraso/déficit na formação de uma resposta eficiente e corroboram a hipótese de falha no controle da carga parasitária no baço de cães com leishmaniose visceral, e a sua participação como um órgão de persistência parasitária (MICHELIN *et al.*, 2011; CAVALCANTI *et al.*, 2015). Neste contexto, as medidas de imunomodulação que melhorem a capacidade de resposta imune neste órgão poderiam auxiliar no tratamento destes animais nos países onde este manejo é permitido.

Em infecção por *Leishmania infantum*, a resposta considerada protetora contra tal parasita é caracterizada pela resposta mediada por linfócitos T CD4⁺ do tipo Th1 com a ativação dos linfócitos TCD8⁺, predomínio da expressão de IFN- γ e TNF- α , ativação da ação microbicida de macrófagos infectados e controle da carga parasitária (MOREIRA *et al.*, 2016). Ao contrário disto, a susceptibilidade a infecção é caracterizada pela resposta por linfócitos T CD4⁺ do tipo Th2 com ativação dos linfócitos B e predomínio da expressão de IL-4, IL-10, TGF- β e imunoglobulinas (ABBAS *et al.*, 2011; MOREIRA *et al.*, 2016).

Além destes distintos perfis, há a polarização de macrófagos em M1 e M2, e plasticidade de macrófagos, onde macrófagos M1 estão associados ao perfil Th1 e quando ativado seu estado microbicida são chamados de macrófagos de ativação clássica (CASSETTA *et al.*, 2011). Em contrapartida, macrófagos M2 são conhecidos como macrófagos de ativação alternativa e estão associados à citocinas do perfil de células Th2 e a processos alérgicos, de cicatrização e remodelamento tecidual (CASSETTA *et al.*, 2011). No baço de cães infectados por *Leishmania infantum* foi descrita a população de macrófagos M2 associada a alta carga parasitária. De forma contrária no fígado há baixa carga parasitária e predomínio de macrófagos M1, indicando que a resposta Th2 com a participação de macrófagos M2 favorece a sobrevivência do parasita intracelular (Moreira *et al.*, 2016).

A infecção parasitária crônica pode influenciar no perfil de exaustão celular através da interação entre o receptor inibitório PD-1 (Morte programada 1) da família CD28 observados

em T CD4⁺ e T CD8⁺ com seus ligantes PD-L1 e PDL-2 expressos em células apresentadoras de antígenos (ABBAS, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2014). O processo de exaustão ocorre de forma progressiva, tendo como início a diminuição da proliferação celular até a perda da capacidade de produção de IFN- γ , TNF- α e diminuição de granzimas B e progressão da doença (RODRIGUES *et al.*, 2014).

Josh e colaboradores (2009) mostraram que durante a infecção crônica por *Leishmania donovani* houve aumento na expressão de B7.H1(PD-L1) em células dendríticas e esse aumento foi acompanhado pelo aumento na expressão de PD-1 na superfície de linfócitos T CD8⁺. O bloqueio de B7.H1 não alterou a proliferação de linfócitos T CD8⁺ nem os níveis de granzimas B. No entanto, a expressão de IFN- γ , TNF- α e IL-2 foram restauradas. e houve redução da carga parasitária em animais com B7.H1 bloqueados. Ao contrário de Josh e colaboradores (2009), em infecção por *Toxoplasma gondii*, Bhadra e colaboradores (2015) bloquearam a mesma molécula PD-L1 e observaram que houve aumento na proliferação de linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺ e granzimas B⁺.

No presente estudo foram investigadas as expressões de IFN- γ e IL-10, porém não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos formados pela organização da polpa branca e/ou formados pela organização da polpa branca e carga parasitária.

Com base nos dados obtidos neste estudo, podemos concluir que a desorganização da microarquitetura esplênica consiste em uma alteração frequente na leishmaniose visceral canina. É possível que a infecção e a persistência do parasita levem a um remodelamento intenso da matriz extracelular esplênica através da deposição de seus componentes estruturais, como laminina e colágeno, além da expressão de enzimas como ADAM-10 e MMP-9, necessárias para a degradação dos componentes da matriz extracelular favorecendo o processo de migração, interação célula-célula e ativação nos momentos iniciais da infecção (CHO *et al.*, 2006). Porém o estímulo antigênico persistente poderia aumentar a desorganização da polpa branca esplênica causando danos teciduais intensos, levando à redução e atrofia dos folículos linfóides e bainha linfática periarteriolar, bem como a diminuição das subpopulações de linfócitos T CD4⁺. Tais danos poderiam afetar a ativação e coestimulação celular levando ao processo de apoptose e/ou exaustão celular. Como consequência disto, ocorreria processo de imunossupressão, déficit na formação dos granulomas, falha no controle da replicação do parasita e progressão da doença. Os principais fenômenos encontrados neste estudo encontram-se resumidos na TABELA 4.1 e nos permite traçar parcialmente a sequência dos eventos imunopatológicos no baço de animais naturalmente infectados com *L. infantum*.

6.0 Conclusões e Hipóteses

- ✓ A desorganização da polpa branca esplênica consiste em uma alteração frequente na leishmaniose visceral canina e é acompanhada pela redução no tamanho e número de folículos linfoides e bainha linfática periarteriolar, bem como uma redução na quantidade de linfócitos CD4⁺ na polpa vermelha. Estes dados sugerem que os linfócitos T e B não estejam migrando para seus locais específicos e/ou estejam entrando em processo de apoptose;
- ✓ A desorganização da polpa branca esplênica é uma alteração que precede a perda de controle da carga parasitária em cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados;
- ✓ A desorganização da polpa branca esplênica se correlacionou a maior intensidade de sinais clínicos o que sugere que este seja um marcador de progressão da doença;
- ✓ A deposição e distribuição aumentadas das moléculas de matriz extracelular, laminina e colágeno, participam e podem auxiliar o processo de desorganização da polpa branca esplênica;
- ✓ As metalopeptidases MMP-9 e ADAM-10 também estão envolvidas nos processos de remodelamento tecidual esplênico e desorganização da polpa branca;
- ✓ A associação dos dados de desorganização da polpa branca esplênica e carga parasitária pode ser utilizada para estimar o tempo de evolução relativo na leishmaniose visceral canina;
- ✓ Assim, nós hipostenizamos que o estímulo antigênico persistente e consequente manutenção do processo inflamatório poderia levar a danos teciduais e desorganização da polpa branca esplênica. Como resultado, estariam afetados os processos de ativação celular gerando imunossupressão, déficit na formação de granulomas, falha no controle da replicação do parasita e progressão da doença.

7.0 Referências Bibliográficas

ABBAS AK, LICHTMAN HL, PILLAI S. Cellular and Molecular Immunology. 7^a edition. Elsevier. 545p. 2011.

ALBERTS, B. et al. Biologia Molecular da Célula. 5 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010. 1054p

ALVAR. J; AVATE. C. C; RREZ-SOLAR. B. G; JIME NEZ. M; LAGUNA. F; PEZ-VE LEZ. R. L; MOLINA. R; MORENO. J. Leishmania and Human Immunodeficiency Virus Coinfection: the First 10 Years. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS. Apr. 1997, p. 298–319.

ALVAR. J; VE LEZ. I.D; BERN. C; HERRERO. M; DESJEUX.P; CANO.J; JANNIN.J; BOER1.M.D;

ALVAR. J; VELEZ. I. D; BERN. C; HERRERO. M; DESJEUX. P; CANO. J; JANNIN. J; BOER. M. D. THE WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM". Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. May. 2012. N. 7. P. 12.

ALVES. C.F; AMORIM I.F.G; MOURA. E.P; RIBEIRO. R.R; ALVES. C.F; MICHALICK. M.S; KALAPOTHAKIS. E; BRUNA-ROMERO. O; TAFURI W.L; TEIXEIRA. M.M; MELO. M.N. Expression on IFN- γ , TFN- α , IL-10 and TGF- β in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with leishmania (leishmania) chagasi. Veterinary immunology and Immunopathology. 2009. N. 128. P. 349-358.

ALVES. G.B.B; PINHO. F.A; SILVA. S.M.M. S; CRUZ. M.S.P; COSTA. F.A.L. Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Braz J Med Biol Res. 2010, N. 43. P. 310-315.

ANSARI, N. A., SALUJA, S., AND SALOTRA, P. Elevated levels of interferon-gamma, interleukin- 10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. Clin. Immunol. 2006, N. 119. P.339–345.

ASHKAN. M.M; RAHIN. K.M; Visceral leishmaniasis in paediatrics: a study of 367 cases in southwest Iran. TROPICAL DOCTOR, 2008. Jul. N. 38. P. 186–188.

ASLAN. H; OLIVEIRA. F; MENESES. C; CASTROVINCI. P; GOMES. R; TEIXEIRA. C; DERENGE.CA; ORANDLE.M; GRADONI. L; OLIVA.G; FISCHER,L; VALENZUELA J.G; KAMHAWI.S. New Insights Into the Transmissibility of *Leishmania infantum* From Dogs to Sand Flies: Experimental Vector-Transmission Reveals Persistent Parasite Depots at Bite Sites. *The Journal of Infectious Diseases*. Jan. 2016. N. 213. p.1752–61

ATO. M; MAROOF. A; ZUBAIRI. S; NAKANO. H; KAKIUCHI. S; KAY. P. M. Loss of dendritic cell migration and impaired resistance to *L. donovani* infection in mice deficient in CCL19 and CCL21. *J Immunol*. 2006 . N. 176. P. 5486–5493.

ATTANAVANIC. K; KEARNEY J.F. Marginal zone, but not follicular b cells, are potent activators of naive cd4 t cells. *j immunol* 2004. n. 172. p. 803-811.

BARANWAL. A.K; MANDAL R.N; SINGH. R. Fulminant Hepatic Failure Complicating Visceral Leishmaniasis in an Apparently Immunocompetent Child. *Indian Journal of Pediatrics*. 2007. May. N.74. P. 489-491.

BARBIÉRI. C. L. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*. 2006. N.28. P. 329–337.

BARRAL-NETTO. M; BADARD. R; BARRAL. A; ALMEIDA. R.R; SANTOS. S. B; BADARO. F; PEDRAL-SAMPAIO. D; CARVALHO. E. M; FALCOFF. E; FALCOFF. R. Tumor Necrosis Factor (Cachectin) in Human Visceral Leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*. 1991. No. 4. pp. 853-857.

BEKIARIS. V; GASPAL. F; KIM. M-Y; WITHERS. D.R; MCCONNELL. F.M; ANDERSON. G; LANE. P.J.L. CD30 Is Required for CCL21 Expression and CD4 T Cell Recruitment in the Absence of Lymphotoxin Signals. *J Immunol*. 2009.N. 182. P.4771-4775.

BERN. C; HAQUE. R; CHOWDHURY. R; ALI. M; KURKJIAN. K. M; VAZ. L; AMANN. J; WAHED. M. A; WAGATSUMA. Y; BREIMAN. R. F; SECOR. J. W. W. E; MAGUIRE. J. H. The Epidemiology Of Visceral Leishmaniasis And Asymptomatic Leishmanial Infection In A Highly Endemic Bangladeshi Village. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*2007. N. 76. p. 909–914.

BHADRA. R; GIGLEY. J. P; WEISS. M. L; KHAN. I. A. Control of *Toxoplasma* reactivation by rescue of dysfunctional CD8⁺ T-cell response via PD-1/PDL-1 blockade.

BOITÉ. M. B. Desenvolvimento e aplicação de marcadores moleculares para estudos taxonômicos, genéticos e epidemiológicos em *Leishmania (Viannia)*. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Orientadora Dr^a Elisa Cupolillo. 2014.

BORGHI. S.M; FATTORI. . V; Conchon-Costa.I; Pinge-Filho. P; Pavanelli. W.R; Verri Jr. W.R. Leishmania infection: painful or painless. Parasitol Res. 2016. Nov.

BORJA. L. S; SOUSA. O. M. F; SOLCÀ. M. S; BASTOS. L. A; BORDONI. M; MAGALHÃES. J. T; LARANJEIRA. D. F; BARROUIN-MELO. S. T; FRAGA. D. B. M; VERAS. P.S. T. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. 2016. N. 15. P.110–117.

BOURBOULIA. D & STETLER-STEVENSONA. W. G. Matrix MetalloProteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of MetalloProteinases (TIMPs): positive and negative regulators intumor cell adhesion. Semin Cancer Biol. 2010. N. 20. P. 161–168.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BREW. K; NAGASE. H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. Biochim Biophys Acta. 2010. N. 1803. P. 55-71.

BRONTE. V; PITTET M.J; The spleen in local and systemic regulation of immunity. NIH Public Access. 2013. Nov. N. 14. P. 806–818.

BUTLER NS, MOEBIUS J, PEWE LL, TRAORE B, DOUMBO OK. Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established bloodstage Plasmodium infection. Nat Immunol. 2012. N. 13. P.188–195.

CALDAS. A. J. M; COSTA. J.M. L; SILVA. A.A. M; VINHAS. V; BARRAL. A. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2002, N. 96 .P. 21-28.

CARDOSO. L; SCHALLIG. H.D.F. H; CORDEIRO-DA-SILVA. A; CABRAL. M; ALUNDA. J. M; RODRIGUES. M. Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. 2007. V. 117. P. 35–41.

CASSETTA. L; CASSOL. E; POLI. C. Macrophage Polarization in Health and Disease. TheScientificWorldJOURNAL . 2011. N. 11. P. 2391–2402.

CAVALCANTI. A.S; RIBEIRO-ALVES. M., PEREIRA. L., MESTRE. L. G., FERREIRA. A. B. R.MORGADO. F. N., BOITÉ. M. C., CUPOLILLO. E., MORAES. M. O.,PORROZZI. R. Parasite load induces progressive spleen architecture breakage and impairs cytokine mrna expression in *Leishmania infantum*-naturally infected dogs. Plos One. 2015April. 1-17.

CESTA. M. f. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. Toxicologic Pathology. 2006. P. 455–465.

CESTA. M.F. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. Toxicologic Pathology 2006. N.34. P.455–465CHADZINSKA. M; BAGINSKI. P; KOLACZKOWSKA. E; SVELKOU. H. F. J; VERBURG-VAN KEMENADE.B.M.L. Expression profiles of matrix metalloproteinase 9 in teleost fish provide evidence for its active role in initiation and resolution of inflammation. 2008. May. N. 125.P. 601–610.

CHAIMOWITZ. N. S; MARTIN. R. K; CICHY. J; GIBB. D. R; PATIL. P; KANG1. D-J; JULIE FARNSWORTH. J; EUGENE C. BUTCHER. E.C; MCCRIGHT. B; CONRAD. H.D. ADAM-10 regulates antibody production and maintenance of lymphoid architecture. J Immunol. 2011. Nov. N. 15. P.5114–5122.

CHAPPUIS. F; SUNDAR.F; HAILU.A; GHALIB.H; RIJAL.S; ROSANNA W. PEELING. R.W; JORGE ALVAR. J; MARLEEN BOELAERT. M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? NATURE REVIEWS. 2007.Nov.873- 882.

CHEN. Y; PIKKARAINEN. T; ELOMAA. O; SOININEN. R; KODAMA. T; KRAAL G. TRYGGVASON. K. 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 Immunology*. 2005. N. 175. P. 8173-8180.

CHILLAKURI. C. R.; SHEPPARD. D.; LEA. S. M.; HANDFORD. P. A. Notch receptor-ligand binding and activation: insights from molecular studies. *Semin Cell Dev Biol*. 2012. N. 23.P. 421-8.

CHO. JY., MILLER. M., MCWELWAIN. K., MCWELWAIN. S., SHIM. JY., RAZ. E., BROIDE. DH. Remodeling associated expression of matrix metalloproteinase 1 in airway epithelium: Modulation by immunostimulatory DNA. *J Allergy Clin Immunol*. Mar. 2006. V.117.

COLOGNATO. H. & YURCHENCO. P.D. Form and Function: The Laminin Family of Heterotrimers. *Developmental Dynamics*. 2000. N. 218.P. 213–234.

COSTA & COSTA. Leishmaniose visceral. Livro Leishmaniose do continente americano. Autores: CONCEIÇÃO-SILVA & ALVES. C. R. 1º edição. Parte VI. capítulo 19. Pagina 228. 2014.

COSTA. D. J; CARVALHO. R. M. A; ABBEHUSEN. M; TEIXEIRA. C; PITOMBO. M; TRIGO. J; NASCIMENTO.F ; AMORIM. L; ABREU-SILVA. A. L. A; CRUZ. M. S. P; MIRANDA. J. C; FUKUTANI. K; OLIVEIRA. C. I; BARRAL. A; BARRAL-NETTO. M; BRODSKYN. C. Experimental Infection of Dogs with Leishmania and Saliva as a Model to Study Canine Visceral Leishmaniasis. *PLOS ONE*. Apr. 2013. N. 8. P. 11.

CUERVO-ESCOBAR. S., LOSADA-BARRAGA N. M., UMANÁ-PEREZ A., PORROZZI. R., SABOIA-VAHIA L., MIRANDA. L. H. M., MORGADO. F. N., MENEZES R. C., SÁNCHEZ-GOMEZ. M., CUERVO. P. T-Cell Populations and Cytokine Expression Are Impaired in Thymus and Spleen of Protein Malnourished BALB/c Mice Infected with *Leishmania infantum*. December 2014. P 22.

CUNNINGHAM-RUNDLES. S; MOON A; MCNEELEY. D. F. Malnutrition and Host Defense. *Physiology and Pathophysiology*. 2008. P. 261-271.

CUNNINGHAM-RUNDLES. S; MOON. A; MCNEELEY. D. F. Malnutrition and Host Defense. *Physiology and Pathophysiology*. 2008. P. 261-271.

CUPOLILLO. E; BOITÉ. M. C; PORROZZI. R. Leishmaniose do continente americano. 1ª edição. Autores: CONCEIÇÃO-SILVA & ALVES. C. R. 2014. Parte I. Capítulo 2. Pagina 39.

DE LIMA VM, FATTORI KR, DE SOUZA F, EUGÊNIO FR, DOS SANTOS PS, ROZZA DB, MACHADO GF. 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.

DEANE. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop.* 1962. 4. p.198-212.

DESJEUX. P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases.* 2004. N. 27.p. 305–318.

DINIZ. S. A; MELO. M. S; BORGES. A. M; BUENO. R; REIS. B. P., TAFURI. W. L; NASCIMENTO. E. F; SANTOS. R. L. Genital Lesions Associated with Visceral Leishmaniasis and Shedding of *Leishmania* sp. in the Semen of Naturally Infected Dogs. *Vet Pathol.* 2005. 42.p.650–658.

DRUMEA-MIRANCEA. M; WESSELS. T.J; MULLER. A.C; EBLE. A.J; TOLOSA. E; KOCH. M; REINHARDT. D.P; SIXT. M; SOROKIN. L; STIERHOL.Y.D; SCHWARZ. H; KLEIN. G. Characterization of a conduit system containing laminin-5 in the human thymus: a potential transport system for small molecules. *Journal of cell science.* 2005. p 1396-1405.

DURBEEJ. M. Laminins. *Cell Tissue Res.* 2010. N. 339. P. 259–268.

ELMORE S.A. Histopathology of the Lymph Nodes. *Toxicol Pathol.* 2006. N. 34. P. 425–454.

ENGWERDA, C. R.; ATO, M.; KAYE, P. M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2004. N.20. P. 524-30.

ESCH K.J; JUELGAARD. 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* 2013. N. 191. P.5542-5550.

Ezra N, Ochoa MT, Craft N. Human Immunodeficiency Virus and Leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases.* 2010. N 2. P.248-257. doi:10.4103/0974-777X.68528.

FARIA. D .R; SOUZA. P.E.A; DURÃES. F.V; CARVALHO. E.M., GOLLOB. K.J; MACHADO. P.R., DUTRA. W.O. Recruitment of CD8+ T cells expressing granzymeA is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* . 2009. Aug. N. 31. P.432–439.

FERREIRA. G.E. M; SANTOS.B.N; DORVAL.M. E. C; RAMOS. T. P. B; PORROZZI. R; PEIXOTO. A. A; CUPOLILLO. E. The Genetic Structure of *Leishmania infantum* Populations in Brazil and Its Possible Association with the Transmission Cycle of Visceral Leishmaniasis. 2012. N.7. 10p.

FOLGOSA. L; ZELLNER.H. B; SHIKH.M .E. E; CONRAD. D .H. Disturbed follicular architecture in B cell ADAM10 knockouts is mediated by compensatory increases in ADAM17 and TNF α shedding. *J Immunol*. 2013 Dec. N. 15. 17p.

FUJIWARA. H; KIKKAWA. Y; SANZEN. N; SEKIGUCHI. K. Purification and Characterization of Human Laminin-8 . *The Journal Of Biological Chemistry*. 2001. N.20. P. 17550–17558.

GARG. R & DUBE. A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res*. 2006. Mar. N. 123. P.439-54.

GEBERHIWOT. T; ASSEFA. D; KORTESMAA. J; INGERPUU. S; CLAUDIO PEDRAZA. C; WONDIMU. Z; CHARO. J; KIESSLING. R; VIRTANEN. I; TRYGGVASON. K; PATARROYO. P. Laminin-8 ($\alpha 4\beta 1\gamma 1$) is synthesized by lymphoid cells, promotes lymphocyte migration and costimulates T cell proliferation. 2000. *Journal of Cell Science*. N. 114. P. 423-43.

GIBB. D. R; SHIKH. M. E; KANG. D. J; ROWE. W. J; SAYED. R. E; CICHY. J;YAGITA. H; TEW. J. G. H; DEMPSEY. P. J; CRAWFORD. H. C; CONRA. D. H. ADAM10 is essential for Notch2-dependent marginal zone B cell development and CD23 cleavage in vivo. *JEM*. 2010. N. 207. P. 623-635.

GONÇALVES. B. S. Leishmaniose visceral canina na área urbana de Cuiabá-MT: comparação de técnicas laboratoriais, tentativa de desenvolvimento de metodologia para o

diagnóstico e caracterização da espécie de *Leishmania* sp. circulante em amostra selecionada. Dissertação de Mestrado Acadêmico. Rio de Janeiro. Orientadora Elizabeth Gloria Oliveira Barbosa dos Santos e Sérgio Augusto Chaves de Miranda. 2010.

GORDON. S; MARTINEZ. F. O. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity*. 2010. N. 32. P. 593-604.

GOTO. H; LINDOSO. J.A.L. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*. 2004. vol.37 no.4. P. 615-623.

GRETZ J.E; NORBURY C.C. ANDERSON. A.O; PROUDFOOT. A.E.I; SHAW. S. Lymph-borne Chemokines and Other Low Molecular Weight Molecules Reach High Endothelial Venues via Specialized Conduits While a Functional Barrier Limits Access to the Lymphocyte Microenvironments in Lymph Node Cortex *The Journal of Experimental Medicine*. 2000. N. 10. P.1425–1439.

GUPTA. G; OGHUMU. S; SATOSKAR. A.R Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. *Adv Appl Microbiol* . 2013. N. 82. P. 155–184.

HOPPS. E; CAIMI. G. Matrix metalloproteinases in metabolic syndrome. *European Journal of internal medicine*. 2011. p 99-104.

JIN. R; YANG. G; LI. G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. 2010. Jan. N. 87. P. 779-789.

JOSHI. T; RODRIGUEZ. S; PEROVIC1. V; COCKBURN. I. A; STA "GER. S. B7-H1 Blockade Increases Survival of Dysfunctional CD8⁺ T Cells and Confers Protection against *Leishmania donovani* Infections. *PLoS Pathogens*. 2009. V.5. P. 1-15.

KALLURI. K. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature reviews*. 2003. N. 3. P. 422-433.

KAUSHAL. H; BRAS-GONÇALVES. R; NEGI. N.S; LEMESRE. J-L; PAPIEROK. G; SALOTRAL. P. Role of CD8⁺ T cells in protection against *Leishmania donovani* infection in healed Visceral Leishmaniasis individuals. Kaushal et al. *BMC Infectious Diseases*. 2014. N.14 P. 2-7.

KAYE P. M; BEATTIE. L. Lessons from other diseases: granulomatous inflammation in leishmaniasis. *Semin Immunopathol.* 2015. p 1-12.

KAYE. P. M; SVENSSON. M; ATO. M; MAROOF. A; POLLEY. R; STAGER. S; ZUBAIRI. S; ENGWERDA. C. R. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunological Reviews.* 2004. Vol. 201. P. 239–253.

KERR. S. F. Palaeartic Origin of Leishmania. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000. V. 95. P 75-80.

KONTTINEN. Y. T; PAJARINEN. J; TAKAKUBO. Y; GALLO. J; NICH. C; TAKAGI. M; GOODMAN. S. B. Macrophage Polarization and Activation in Response to Implant Debris: Influence by “Particle Disease” and “Ion Disease”. *J Long Term Eff Med Implants.* 2014. N. 24(4). P. 267–281.

KULKARNI.M. M; BARBI. J; MCMASTER. W. R; GALLO. R. L; SATOSKAR. A. R; MCGWIRE. B. S. Mammalian antimicrobial peptide influences control of cutaneous Leishmania infection. *Cell Microbiol.* 2011. Jun. N. 13. P. 913–923.

KUPER D. F.; DE HEER, E.; VAN LOVEREN, H. VOS J. G. IMMUNE SYSTEM. IN: HASCHEK, W. M.; ROUSSEAU, C. G.; WALLIG, M. A. (ED.). *Handbook of Toxicologic Pathology.* San Diego: Academic Press, 2002. p. 585-646.

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 Jan 15;115(1-2):135–45.

LAINSON R, RANGEL EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005. V. 100 811–827.

LAINSON R, SHAW JJ. The Leishmaniasis in Biology and Medicine: Evolution, classification and geographical distribution; Peters W, KillickKendrick R, editors. London: Academic Press. 1987. pp 1–120.

LEMOS. C. S. Caracterização *in situ* da resposta imune granulomatosa *Leishmania braziliensis* em lesões dérmicas, crônicas no primata *macaca mulata*. Tese de doutorado como

pré-requisito para obtenção de título de doutor. Instituto Oswaldo Cruz-ioc/fiocruz Rio de Janeiro. Orientador Renato Porrozzi. 2010. 124p.

LIM. S. C. Interrelation between Expression of ADAM 10 and MMP 9 and Synthesis of Peroxynitrite in Doxorubicin Induced Cardiomyopathy. *Biomol Ther.* 2013.N. 21. P. 371-380.

LIMA ID, QUEIROZ JW, LACERDA HG, QUEIROZ PV, PONTES NN, BARBOSA JD, MARTINS DR, WEIRATHER JL, PEARSON RD, WILSON ME, JERONIMO SM. *Leishmania infantum chagasi* in northeastern Brazil: asymptomatic infection at the urban perimeter. *Am J Trop Med Hyg.* 2013 Jan;86(1):99-107.

LIMA, W.G.; MICHALICKM, S.M.; MELO, M.N. Canine Visceral Leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Tropica.* 2004. v.92, p.43-53.

LIMA. I.S; SILVA. J.S; ALMEIDA. V.A; JUNIOR. F.G.L; SOUZA. P.A.N; LARANJEIRA. D.A.F; MOURA-NETO. J.P; FRAGA. D. B. M; FREITAS. L. A. R; DOS-SANTOS. W. Severe Clinical Presentation of Visceral Leishmaniasis in Naturally Infected Dogs with Disruption of the splenic white pulp. *plos one.* 2014. feb.v. 9 .

LINDOSO. J. A. L; CUNHA. M. A; QUEIROZ. I. T; MOREIRA. C.H.V. Leishmaniasis–HIV coinfection: current challenges. *Research and Palliative Care.* 2016.N.8. P. 147–156.

LOKMIC. Z; LAMMERMANN. T; SIXT. M; CARDELL. S; HALLMANN. R; SOROKIN. LYDIA. The extracellular matrix spleen as a potential organizer of immune cell compartments. *Seminars in immunology.* 2008. p 4-13.

LORÍA-CERVERA. E.N; ANDRADE-NARVÁEZ. F.J. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. *Rev. Inst. Med. Trop.* 2014. Jan-Feb. N. 56. P. 1-11.

LU. P; TAKAI. K; WEAVER. VALERIE. M; WERB. Z. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011.

LUTZ A, NEIVA A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1912. N. 4. P.84-95.

MAIA. C; ALMEIDA. B; COIMBRA. M; FERNANDES.M. C; CRISTÓVÃO. J. M; , RAMOS.C; MARTINS. A; MARTINHO. F; SILVA. P; NEVES. N; NUNES. M; VIEIRA. M. L; CARDOSO. L; CAMPINO. L. Bacterial and protozoal agents of canine vector-borne diseases in the blood of domestic and stray dogs from southern Portugal. *Parasites & Vectors*. 2015. N. 8. p138.

MANNA.L; PACIELLO. O; MORTE.R.D; GRAVINO. A.E. Detection of *Leishmania* parasites in the testis of a dog affected by orchitis: case report. *Parasites & Vectors*. 2012. Sept. N.5. P. **216**.

MANZO. A; BUGATTI. S; CAPORALI. R; PREVO. R; JACKSON. D G; GUCCIONI. M U; BUCKLEY. C.D; MONTECUCCO. C; PITZALIS. C. CCL21 Expression Pattern of Human Secondary Lymphoid Organ Stroma Is Conserved in Inflammatory Lesions with Lymphoid Neogenesis. *The American Journal of Pathology*.2007. N. 171.P.1549-1562.

MARANGONI, N.R., MELO, G.D., MORAES, O.C., SOUZA, M.S., PERRI, S.H.V., MACHADO, G.F., 2011. Levels of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 33, 330–334.

MATHUR. R. K; AWASTHI. A; WADHONE. P; RAMANAMURTHY. B; SAHA. B. Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses. *Letters*. 2004. N. 5. P. 540-544.

MEBIUS. R & KRAAL. G. Structure and function of the spleen. *Nature Reviews*. V. 5. 2005. Aug. P. 607-616.

MELO GD, MARANGONI NR, MARCONDES M, LIMA VM, MACHADO GF. High levels of serum matrix metalloproteinases in dogs with natural visceral leishmaniosis: a preliminary report. *Vet J*, 2011. 188 (2): 243-5.

MELO. F. A., MOURA. E. P., RIBEIRO, R. R., ALVES. C. F, CALIARI. M. V., W. L. TAFURI., CALABRESE. K.S, TAFURI. W.L. Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *International journal of experimental pathology*. June 2009. 538–548.

MELO. G.D; SERAGUCI. T.F; SCHWEIGERT. A; SILVA. J.E; GRANO.F.G; PEIRÓ.J.R; LIMA. V.M.F; MACHADO. G.F.Pro-inflammatory cytokines predominate in the brains of

dogs with visceral leishmaniasis: A natural model of neuroinflammation during systemic parasitic infection. 2013. V.193. P.57-66.

MENDES. R. S; GURJÃO. T. A; OLIVEIRA. L. M; SANTANA. V. L; TAFURI. W.L; J.R.S. SANTOS. J.R.S; DANTAS. A.F.M; SOUZA. A. P. Miocardite crônica em um cão naturalmente infectado com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*: aspectos clínicos e patológicos. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2014. v.66, n.1, p.79-84.

MICHELIN. A. F; PERRI. S. H. V; LIMA. V. M. F. Evaluation of TNF-a, IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. Annals of Tropical Medicine & Parasitology. 2011. p 373–383.

MOREIRA. PR; FERNANDO. FS; MONTASSIER. HJ; ANDRÉ MR; DE OLIVEIRA VASCONCELOS. R. Polarized M2 macrophages in dogs with visceral leishmaniasis. Vet Parasitol. 2016. N. 226. P.69-73.

MORENO. J; ALVAR. J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. trends in Parasitology. 2002. N. 18. P.399-405.

MORGADO. F. N; CAVALCANTI. A. S; MIRANDA. L. H; O'DWYER. L. H; MARIA REGINA LUCAS DA SILVA.M. R. L; MENEZES. R. C; SILVA. A. V. A; BOITÉ. M. C; CUPOLILLO. E ; PORROZZI. R. Hepatozoon canis and Leishmania spp. coinfection in dogs diagnosed with visceral leishmaniasis. Braz. J. Vet. Parasitol. 2016.

MOUW. J. K; GUANQING OU. G; WEAVER. M.V. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. Nature Reviews. 2014. N.15. 771-785.

MULLER. I; PEDRAZZINI. T; KROPF. P; LOUIS. J; AND MILON. G. Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8⁺ T cells. International Immunology. 1991. N.3. P. 587-597.

NASCIMENTO. M.S.L; ALBUQUERQUE. T.D.R.; NASCIMENTO. A.F.S. ; CALDAS. DO-VALLE-MATTA. I. S; SOUTO. M. A; J.T. TALVANI. A.; BAHIA. M.T. , GALVÃO. L.M.C.; CÂMARA. , A.C.J; GUEDES. P.M.M. Impairment of Interleukin-17A Expression in Canine Visceral Leishmaniasis is Correlated with Reduced Interferon- γ and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression. Journal of Comparative Pathology. 2015.N. 4.P. 197-205. .

NIAN. M; LEE. P; KHAPER. N; LIU. P. Inflammatory Cytokines and Postmyocardial Infarction Remodeling. *Circulation Research*. 2004. P. 1543-1553.

NOLTE. M. A; BELIËN. J. A.M; SCHADEE-EESTERMANS. I; JANSEN. W; UNGER. W. W.J; ROOIJEN. N.V; GEORG KRAAL. G; MEBIUS. R. E. A Conduit System Distributes Chemokines and Small Blood-borne Molecules through the Splenic White Pulp. *J. Exp. Med*. 2003. N. 3. P. 505–512.

NOMBELA-ARRIETA. C. Intracellular signaling pathways mediating lymphocyte trafficking. *nmunología* 2008. N.4. P. 192-204.

NYLÉN. S; SACKS. D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunology*. 2007. V. 28. p378–384.

O'CAMPO JSP, BRITO JM, CORRÊIA-DE-SANTANA E, BOROJEVIC R, VILLAVERDE DMS, SAVINO W. Laminin-211 control thymocyte-thymic epithelial cell interactions. *Cellular immunology*. July, 254, p 1-9, 2008.

OLIVEIRA. F. A; SILVA. C. V. O; DAMASCENA. N. P; PASSOS. R. O; DUTHIE. M. S; GUDERIAN. J. A; BHATIA. A; MOURA. T. R; REED. S. G; ALMEIDA. R. P. A; JESUS. A. R. High levels of soluble CD40 ligand and matrix metalloproteinase-9 in serum are associated with favorable clinical evolution in human visceral leishmaniasis. *BMC Infectious Diseases* 2013. N.13. 331P.

OLIVEIRA. G. M.; MADEIRA. M. F.; OLIVEIRA F. S.; PACHECO. R. S. PCR Associated with Molecular Hybridization Detects *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Healthy Skin in Canine Tegumentary Leishmaniasis. *Journal of Parasitology*. p 91-93. 2015.

OLIVEIRA. G.M; MADEIRA M.F; OLIVEIRA F.S; PIRES. M.Q; PACHECO. R.S. Canine Cutaneous Leishmaniasis: Dissemination and Tissue Tropism of Genetically Distinct *Leishmania (Viannia) braziliensis* Populations. *Veterinary Medicine International*. 2013. P. 1-5.

OLIVEIRAI. V. V. G; JUNIOR. L. C. A. A. S. Genital pathologies associated with canine visceral leishmaniasis. *Ciências Rural*. 2012. N.9. P. 1614-1620.

OLIVIER. M; GREGORY. D. J; FORGET. G. Subversion Mechanisms by Which Leishmania Parasites Can Escape the Host Immune Response: a Signaling Point of View. *clinical microbiology reviews*. 2005. Apr, p. 293–305.

PAMPIGLIONE S., MANSON-BAHR P.E.C., GIUNTI F., GIUNTI G., PARENTI A. & TROTTI C.G. (1974b) Studies on Mediterranean leishmaniasis. II. Asymptomatic cases of visceral leishmaniasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1974. N. 68, P.447±453

PARMENTIER. L; CUSINI. A; MÜLLER. N; ZANGGER. H; HARTLEY. M-N; DESPONDS. CASTIGLIONI. P.C; DUBACH. P; RONET. C; BEVERLEY. S.M; FASEL. N. Case Report: Severe Cutaneous Leishmaniasis in a Human Immunodeficiency Virus Patient Coinfected with *Leishmania braziliensis* and Its Endosymbiotic Virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2016. N. 94.P. 840–843.

PINELLI. E; KILLICK-KENDRICK. R; WAGENAAR. J; BERNADINA. W; REAL. G. D; RUITENBERG. J. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. *Infection And Immunity*. 1994. P. 229-235.PNAS. 2011. No. 22. pp. 9196-9201.

PORROZZI. R. A; CAVALCANTI. A.S; CUPOLILLO. E. Modelos experimentais na leishmaniose visceral. Autores: CONCEIÇÃO-SILVA & ALVES. C. R. *Leishmaniose do continente americano*. 1º edição. Parte V. capítulo 16. Pagina 277. 2014.

PORROZZI. R. CAVALCANTI. A. S; CUPOLILLO. E. *Leishmaniose do continente americano*. 1º edição. Autores: CONCEIÇÃO-SILVA & ALVES. C. R. 2014. Parte V. Capítulo 16. Pagina 278.

POTTS. J. R. & CAMPBELL. I. D. Structure and Function of Fibronectin Modules. *Matrix Biology*.1996. N.15. pp. 313-320.

PRABAGAR. M.G; DO. Y; RYU S; PARK J.Y; CHOI H.J; CHOI W.S; YUN T.J; MOON .J; CHOI I.S; KO. K; KO. K; YOUNG SHIN. C; CHEONG. C; KANG Y-S. SIGN-R1, a C-type lectin, enhances apoptotic cell clearance through the complement deposition pathway by interacting with C1q in the spleen. *Cell Death and Differentiation* 2013. N. 20. P. 535–545

PRINA E, ROUX E, MATTEI D, MILON G (2007) Leishmania DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes Infect* 9: 1307–1315.

PROCKOP. D.J & KIVIRIKKO. J. Collagens: Molecular Biology, Diseases, and Potentials for Therapy. *Annu. Rev. Biochem.* 1995.N. 64. P. 403-34.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J. J.; SHAW, M. A.; DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology.* 2001. V. 22. P. 253-61.

READY. P. D. FACTORS AFFECTING EGG PRODUCTION OF LABORATORY-BRED LUTZOMYIA LONGIPALPIS (DIPTERA: PSYCHODIDAE). *J. Med. Entomol.* 1979. Nov. N. 5. p. 413-423.

REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. The Regulation of Immunity to *Leishmania Major*. *Annual Review of Immunology.* 1995. V. 13. P. 151-177.

REIS. A. B., MARTINS-FILHO. O. A., TEIXEIRA-CARVALHO. A., GIUNCHETTI. R. C., CARNEIRO, C. M. , MAYRINK. W., TAFURI. W.L., CORRÊA-OLIVEIRA. R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 2009, p 87–95.

REQUENA. J. M; SOTO.M; DORIA. M. ÂAD; ALONSO. C. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 2000. N. 76. P. 269-281.

RODRIGUES. A; CLARO. M; ALEXANDRE-PIRES. G; MARTINS. C; VALÉRIO-BOLAS. A; RAFAEL-FERNANDES. M; PEREIRA. M.A; FONSECA IP; TÓMAS. A.M; SANTOS-GOMES. G. *Leishmania infantum* antigens modulate memory cell subset of liver resident T lymphocyte. *Immunobiology.* 2016. Aug. P. 1-14.

RODRIGUES. V; CORDEIRO-DA-SILVA. A; LAFORGE. M; OUAISSI. A; AKHARID. K; SILVESTRE. R; ESTAQUIER. J. R. E. Impairment of T Cell Function in Parasitic Infections. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2014. N. 2. P. 1-10.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A; CARRILLO. E; MARTORELL. S; TODOLÍ. F; OJEDA. A; MARTÍNEZ-FLÓREZ. A; URNIZA. A; MORENO. J; ALBEROL. J. Compartmentalized Immune Response in Leishmaniasis: Changing Patterns throughout the Disease. Plos one. 2016. V.37. P. 683-693.

ROGERS. K.A; DEKREY. G.K; MBOW. M. L; GILLESPIE. R.D; BRODSKYN. C.I; TITUS. R. G. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. FEMS Microbiology Letters. 2002. N. 209 p.1-7.

ROOZENDAAL. R; MEMPEL. T. R; PITCHER. L. A; GONZALEZ. S. F; VERSCHOOR. A; MEBIUS. R. E; ANDRIAN. U. H. V; CARROLL. M. C. Conduits Mediate Transport of Low Molecular Weight Antigen to Lymph Node Follicles. Immunity. 2009. N. 30. P. 264–276. doi:10.1016/j.immuni.2008.12.014.NIH.

SAITO H; YOKOI Y; WATANABE S; TAJIMA J; KURODA H; NAMIHISA T. Reticular Meshwork of the Spleen in Rats Studied by Electron Microscopy. the american journal of anatomy. 1988. N. 181. P. 235-252.

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 Jun;70(6):618–24.

SANT'ANA. J.A.P; LIMA. W. G; OLIVEIRA. M.R; SIMÕES. L.A; MICHALICK. .S.M. M.N. MELO. M. N; TAFURI. W. L; TAFURI. WG.L. Hepatic granulomas in canine visceral leishmaniasis and clinical status. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2007. v.59, n.5, p.1137-1144.

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. Oct; 30(10):515–24. 2008.

SANTOS. C.S; BOAVENTURA.V; CARDOSO. C.R; TAVARES. N; LORDELO. M.J; NORONHA. A; COSTA J; BORGES. V.M; OLIVEIRA. C.I; WEYENBERGH. J.V; BARRAL. A; BARRAL-NETTO. M; BRODSKYN. C.I. CD8⁺ Granzyme B–Mediated Tissue Injury vs. CD4⁺IFN γ –Mediated Parasite Killing in Human Cutaneous Leishmaniasis. Journal of Investigative Dermatology. 2013. P. 1533-1540.

SANTOS. C.S; BRODSKY. C.I; the role of CD4 and CD8 T cells in human cutaneous leishmaniasis. *Frontiers in public health | infectious diseases* 2014. Sep. N. 165. P.1-6.

SAPORITO. L; GIAMMANCO. G. M; DE GRAZIA. S; GOLOMBA. C. Visceral Leishmaniasis: Host-parasite interaction and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. *International journal of infectious diseases*. 2013.Dec. p. 572-576.

SCHUINDT SHS, OLIVEIRA BCL, PIMENTEL PMO, RESENDE TL, RETAMAL CA, DAMATTA RA, SEIPEL D, ARNHOLD ACV. Secretion of multi-protein migratory complex induced by *Toxoplasma gondii* infection in macrophages involves the uPA/Upar activation system. *Veterinary parasitology*. Nov; 186, p 207-2015. 2012.

SHOULDERS. M. D; RAINES; R. T. Collagen Structure And Stability. *Annu Rev Biochem*. 2009 . N.78. P. 929–958.

SILVA JS, ANDRADE AC, SANTANA CC, SANTOS LQ, OLIVEIRA CI DE, VERAS PST. Low CXCL13 expression, splenic lymphoid tissue atrophy and germinal center disruption in severe canine visceral leishmaniasis. *PloS One*. 2012;7(1):e29103.

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.Silva LC, Castro RS, Figueiredo

SILVA. F. M. F; SANTOS. E.M .S;TORRES. S. M; YAMASAKI. E. M; RAMOS. R. A. N; ALVES. L. C. Parasite load in intact and ulcerative skin of dogs with leishmaniasis. *Braz. J. Vet. Parasitol.*, Jaboticabal. 2015. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612016014>.

SILVA. K.L.O; ANDRADE. M.M.C; MELO. L.M; PEROSO. J; VASCONCELOS. R. O; MUNARI. D.P; LIMA. V.M.F. CD4+FOXP3+ cell produce IL-10 the spleens of dogs with visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 2014. Mar. N. 202. P. 313-318

SILVA. R. B.S; MENDES. R.S; VANESSA L. SANTANA. V. L; SOUZA. H. C; RAMOS. C. P.S; SOUZA; A. P; ANDRADE. P. P; MELO. M. A. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. *Pesq. Vet. Bras*. 2016. N.36. P. 625-629.

SILVA-O'HARE. J. S; OLIVEIRA. I. S; KLEVORN. K; ALMEIDA. V. A; OLIVEIRA. G. G. S; ATTA. J. J; FREITAS. L. A. R; SANTOS. W. L. C. Disruption of Splenic Lymphoid Tissue and Plasmacytosis in Canine Visceral Leishmaniasis: Changes in Homing and Survival of Plasma Cells. PLoS ONE.2015. N. 11. May. P. 1-17.

SINGH. P; CARRAHER. C; SCHWARZBAUER. J. E. Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix. Annu Rev Cell Dev Biol . 2010. N. 26. P.397–419.

SOROKIN. L. The impact of the extracellular matrix on inflammation. Nature Reviews Immunology. 2010. Oct. p.713-723.

SPIEGEL. C. N; DIAS. D. B. S; ARAKI. A. S; HAMILTON. J. G. C; BRAZIL. R. P; JONES. T. M. The Lutzomyia longipalpis complex: a brief natural history of aggregation-sex pheromone communication. Parasites & Vectors. 2016. V. 9. 15P.

STEINIGER. B.S. Human spleen microanatomy: why mice do not suffice. Immunology. 2015. P. 334-346

STEINIGER. B; TIMPHUS. E.M; BARTH. P.J. The splenic Marginal zone humans and rodents: an enigmatic compartment and its inhabitants. Histochem cell biol. 2006. N. 126. P.641-648

STRAUSS-AYALI D, BANETH G, JAFFE CL. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. Vet Res. 2007 Aug;38(4):547–64.

SUZUKI. N; YOKOYAMA. F; Functional Sites in the Laminin Alpha Chains. Connective Tissue Research. 2008. N. 46. P. 142–152.

THISSEN. J. P & Underwood. L. E. Translational status of the insulin-like growth factor-I mRNAs in liver of protein-restricted rats. 1991. Journal of endocrinology. N 132. P141-147.

TYBULEWICZ. V. L. J & HENDERSON. R. B. Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. Nature Reviews. 2009. N. 9. P. 631-644.

URSINE.R.L; DIAS.J.V.L; MORAIS.H.A; PIRES. H. H.R. Human and canine visceral leishmaniasis in an emerging focus in Araçuaí, Minas Gerais: spatial distribution and socio-environmental factors. Mem Inst Oswaldo Cruz. 8. 2016. Aug.p. 505-511.

VILELA. M; AFONSO. M. M; COSTA. S. M; COSTA. W. A; RANGEL. E. F. Leishmaniose do continente americano. 1º edição. Autores: CONCEIÇÃO-SILVA & ALVES. C. R. 2014. Parte IV. Capítulo 10. Pagina 183.

WHO Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva: World Health Organization. 2011. xiii: 186.

WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. 2012. May. 7. p.1-12.

XAVIER. S.C; CHIARELLI. I. M; LIMA. W. G; GONÇALVES. R; TAFURI. W. R. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal reported from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2006. n.6, p.994-1000.

YAMADA. K. M. Fibronectin peptides in cell migration and wound repair. The Journal of Clinical Investigation . 2000. N. 11. P. 1507-1509.

YAN. J. The role of the liver in sepsis. Int Rev Immunol. 2014 . N. 33. P. 498–510

YURCHENCO' P. D & SCHITTNY. J. C. Molecular architecture of basement membranes. The easer journal. 1990. N.6 , p.1577-1590.

8.0 ANEXOS

8.1 Tabela descritiva dos dados estatísticos aplicados no estudo para organização da polpa branca esplênica.

Tabela descritiva dos dados estatísticos para grupos formados a partir da organização da polpa branca esplênica (PBE)		
Marcações observadas	Média ±SEM Grupo OR-PD	Média ±SEM Grupo MD-ID
Deposição de Laminina (% de área marcada)*	15,18±1,52	19,42±1,10
Deposição de Fibronectina (% de área marcada)	22,79±1,11	21,35±1,14
Deposição de Colágeno** (% de área marcada)	2,10±0,14	3,26±0,51
Expressão de MMP-9***	1,28±3,29	1,65±1,65
Expressão de ADAM-10	131,07±26,97	132,7±20,9
Células T CD4 ⁺ mm ² ****	2,50±4,25	1,42±2,49
Células T CD8 ⁺ mm ²	325,1±64,24	246,28±23,99
Células B CD21 ⁺ mm ²	159,35±23,62	192,8±31,39
Células em proliferação KI-67 ⁺ /mm ²	132,8±25,3	123,2±14,58
Células expressando IL-10/mm ²	61,57±19,63	173,8±82,02
Células expressando IFN-γ/mm ²	51,79±18,54	45,16±6,68

Pvalue= 0,045; **Pvalue=0,036; ***Pvalue=0,022; *Pvalue=0,027**

Contagem da marcação dos componentes da matriz extracelular por porcentagem de área da polpa vermelha marcada, das subpopulações de linfócitos T e B e células em processo de proliferação por mm². Pvalue inferior e/ou igual a 0,05 foram considerados significativo. Teste Mann-Whitney.

8.2 Tabela descritiva dos dados estatísticos aplicados no estudo para grupos combinados entre a carga parasitária e organização da polpa branca esplênica.

Tabela descritiva dos dados estatísticos para grupos formados a partir da organização da polpa branca esplênica (PBE) e carga parasitária

Marcações observadas	Média ±SEM	Média ±SEM	Média ±SEM
	Grupo LOW/OR	Grupo LOW/DES	Grupo HIGH/DES
Deposição de Laminina*	15,18±1,52	20,37±1,38	17,53±1,38
Deposição de Fibronectina	22,79±1,11	20,13±1,38	23,79±1,82
Deposição de Colágeno**	1,78±0,28	3,02±0,63	3,86±0,84
Expressão de MMP-9***	1,16±3,40	1,53±1,95	1,97±3,03
Expressão de ADAM-10	132,4±29,78	134,7±25,77	127,33±36,34
Células T CD4 ⁺ mm ² ****	2,63±4,46	1,04±2,02	2,48±6,38
Células T CD8 ⁺ mm ²	304,8±67,38	236,3±28,62	273,5±45,16
Células B CD21 ⁺ mm ²	166,2±24,99	118,8±17,67	135,1±26,44
Células em proliferação KI-67 ⁺ / mm ²	112,0±15,9	118,8±17,67	135,1±26,44
Células expressando IL-10 / mm ²	66,13±21,11	213,9±110,6	63,3±33,47
Células expressando IFN-γ / mm ²	52±20,49	44,21±8,3	47,7±10,94

Pvalue= 0,005; **P value=0,041; ***P value=0,035; ****P value=0,0021**

Grupos formados de acordo com a organização da polpa branca esplênica (PBE) e carga parasitária com o objetivo de estimar a evolução relativa da infecção. Marcações por imunohistoquímica de componentes da matriz extracelular por porcentagem de área marcada, subpopulações celulares marcadas por mm² e células em processo de proliferação. P value inferior e/ou igual a 0,05 foram considerados significativo. Teste Mann-Whitney.

Anexo 8.31- Dados brutos de cães naturalmente infectados com *L. infantum* avaliados neste estudo.

Registro Animal	Escore clínico	Carga parasitária 10 ⁶ /Cells	Classificação parasitária ^a	Organização da polpa branca ^b	Grupos combinados ^c	Presença de granuloma ^d	Linfócito T CD4 ⁺ /mm ²	Linfócito T CD8 ⁺ / mm ²	Linfócito B CD21 ⁺ / mm ²	Proliferação celular (KI-67 ⁺ / mm ²)	Células expressando IFN- γ ⁺ / mm ²	Células expressando IL-10 ⁺ / mm ²	Deposição de laminina mm ²	Deposição de fibronectina /mm ²	Deposição de colágeno/ mm ²	Expressão MMP-9/ mm ²	Expressão ADAM-10 mm ²
001/2013	7	6.06	2	4	3	2	184.90	273.80	97.78	172.44	65.78	40.89	12.83	25.64	NA	152.89	76.44
002/2013	0	2.48	2	4	2	2	62.20	179.60	90.67	183.11	56.89	39.11	16.19	15.58	NA	51.56	53.33
003/2013	6	5.37	1	4	2	1	176.00	558.20	161.78	53.33	53.33	1564.44	21.20	8.21	NA	NA	131.56
004/2013	6	3.98	1	3	2	2	17.80	46.20	464.00	117.33	7.11	7.11	NA	NA	2.93	158.22	24.89
001/2014	1	3.69	1	4	2	2	30.20	138.70	776.89	97.78	124.44	2026.67	11.71	18.86	1.09	120.89	NA
002/2014	2	4.66	1	4	2	1	17.80	167.10	254.22	46.22	83.56	40.89	16.85	18.78	NA	135.11	7.11
003/2014	6	6.16	1	4	3	2	55.10	318.20	462.22	26.67	19.56	14.22	12.89	14.46	2.95	305.78	368.00
004/2014	9	7.31	1	3	3	1	145.80	291.60	92.44	42.67	87.11	42.67	19.40	28.53	5.69	120.89	156.44
005/2014	2	4.86	1	4	2	2	378.70	213.30	368.00	112.00	37.33	64.00	19.35	16.71	3.66	94.22	3.56
006/2014	5	5.13	2	3	2	2	76.40	128.00	184.89	55.11	21.33	32.00	23.65	19.82	4.42	238.22	142.22
007/2014	3	4.78	2	1	1	2	174.20	140.40	289.78	195.56	2.00	71.11	NA	NA	1.85	149.33	90.67
008/2014	3	6.84	1	3	3	2	56.90	556.40	56.89	97.78	90.67	62.22	24.94	25.50	6.41	65.78	85.33
009/2014	9	4.88	1	3	2	2	129.80	163.60	26.67	117.33	3.00	97.78	10.61	26.54	1.98	56.89	92.44
010/2014	5	4.23	1	4	2	2	83.60	289.80	74.67	37.33	1.00	24.89	18.21	12.19	5.62	128.00	250.67
011/2014	8	4.33	1	3	2	2	64.00	261.30	60.44	74.67	1.00	106.67	21.52	18.78	8.80	136.89	131.56
012/2014	7	4.57	2	2	1	2	56.90	158.20	129.78	112.00	6.00	23.11	20.99	26.27	2.67	65.78	71.11
015/2014	2	5.22	1	4	2	2	48.00	368.00	366.22	289.78	6.00	33.78	18.36	20.60	1.38	206.22	117.33
016/2014	4	4.06	1	1	1	2	481.80	343.10	184.89	46.22	97.78	186.67	15.20	25.37	1.75	113.78	136.89
017/2014	0	6.16	2	2	NA	2	115.60	528.00	90.67	341.33	49.78	16.00	NA	NA	1.85	NA	117.33
018/2014	6	4.41	1	3	2	2	64.00	261.30	122.67	.00	40.89	14.22	NA	NA	7.91	110.22	106.67
019/2014	7	6.34	1	3	3	1	323.60	149.30	343.11	211.56	55.11	293.33	12.43	23.04	7.30	234.67	53.33
020/2014	0	4.66	1	3	2	2	120.90	268.40	62.22	183.11	39.11	58.67	NA	NA	NA	179.56	33.78
021/2014	0	4.63	1	2	1	2	384.00	289.80	161.78	133.33	49.78	14.22	NA	NA	0.91	115.56	131.56
022/2014	0	2.16	1	2	1	2	384.00	403.60	67.56	158.22	26.67	46.22	16.95	25.18	1.35	17.78	81.78
023/2014	0	4.96	2	2	1	2	240.00	112.00	264.89	28.44	28.44	183.11	10.08	22.36	1.76	138.67	366.22
024/2014	8	5.02	1	2	1	2	215.10	359.10	74.67	90.67	23.11	28.44	9.70	19.56	1.46	85.33	138.67
025/2014	1	4.89	2	1	1	2	371.60	833.80	94.22	147.56	218.67	78.22	17.06	22.02	2.40	391.11	7.11
026/2014	3	6.17	1	3	3	2	469.30	197.30	327.11	234.67	24.89	28.44	16.55	20.12	1.06	309.33	94.22
027/2014	8	4.72	1	2	1	1	69.30	138.70	243.56	99.56	51.56	24.89	16.34	18.76	3.45	90.67	131.56
028/2014	2	2.29	1	3	2	2	3.60	88.90	72.89	209.78	16.00	16.00	NA	NA	1.04	309.33	26.67
029/2014	8	5.11	1	4	2	2	87.10	305.80	49.78	117.33	80.00	126.22	27.33	28.69	NA	55.11	460.44
030/2014	4	5.22	1	3	2	1	238.20	472.90	101.33	40.89	48.00	23.11	31.22	25.77	1.16	209.78	168.89
031/2014	5	5.78	1	4	3	2	538.70	193.80	126.22	147.56	16.00	5.33	24.25	31.04	3.90	211.56	122.67
032/2014	0	2.50	1	4	2	2	289.80	400.00	103.11	176.00	131.56	104.89	NA	NA	2.79	213.33	231.11
033/2014	9	4.32	1	4	2	2	47.10	334.20	168.89	156.44	24.89	204.44	22.35	22.25	2.28	298.67	99.56
034/2014	9	4.16	2	2	1	2	257.80	270.20	151.11	108.44	16.00	5.33	NA	NA	0.21	0.00	168.89
035/2014	6	6.61	1	3	3	2	216.90	208.00	163.56	147.56	23.11	19.56	17.03	22.05	1.06	176.00	62.22
036/2014	12	2.90	1	4	2	2	69.30	138.70	71.11	312.89	35.56	8.89	17.89	17.97	NA	60.44	291.56
037/2014	10	2.49	1	4	2	2	3.60	88.90	117.33	151.11	33.78	17.78	28.32	26.82	NA	62.22	21.33

a: 1= Low (Baixa carga parasitária); 2=High (Alta carga parasitária)

b: 1=Organizado; 2=Pouco desorganizado; 3=Moderadamente desorganizado; 4=Intensamente desorganizado.

c: 1= Low=Baixa carga parasitária/ Polpa branca organizada; 2= Baixa carga parasitária/ Polpa branca desorganizada ; 3= Alta carga parasitária/ Polpa branca desorganizada

d: 1= Sim; 2= Não