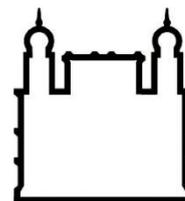




UFBA

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



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E DE POPULAÇÕES CELULARES EM BAÇOS
DE PACIENTES COM FORMAS GRAVES DE LEISHMANIOSE VISCERAL
HUMANA**

SELMA SOUSA MATOS

Salvador - Bahia

2019

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

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E DE POPULAÇÕES CELULARES EM BAÇOS
DE PACIENTES COM FORMAS GRAVES DE LEISHMANIOSE VISCERAL
HUMANA**

SELMA SOUSA MATOS

Orientador: Dr. Washington Luis Conrado dos Santos

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

Salvador – Bahia

2019

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

Matos, Selma Sousa.
M433a Alterações morfológicas e de populações celulares em baços de pacientes com
formas graves de leishmaniose visceral humana. / Selma Sousa Matos. - 2019.
74 f. : il. ; 30 cm.

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

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

1. Leishmaniose visceral. 2. Baço. 3. Plasmocitose. 4. Resposta Imune.
I. Título.

CDU 616.993.161

**“ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E DE POPULAÇÕES CELULARES EM BAÇOS DE
PACIENTES COM FORMAS GRAVES DE LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA”.**

Selma Sousa Matos

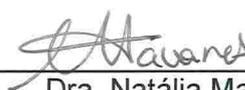
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 26 de novembro de 2019.

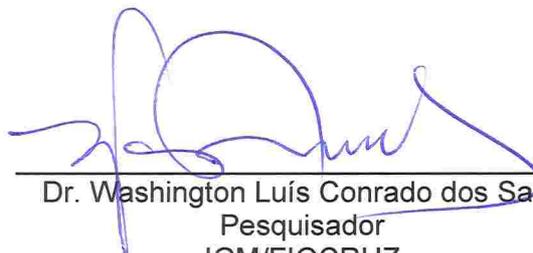
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Thiago Marconi de Souza Cardoso
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dra. Natália Machado Tavares
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ



Dr. Washington Luís Conrado dos Santos
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)”

Laboratório de Patologia Estrutural e Molecular do Instituto Gonçalo Moniz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Sidalva, meus filhos, Francisco e Artur, a meu namorado - Dipa, e a@s amig@s, por terem me dado colo, motivação, força, gentileza e me orientarem a ter tolerância para confeccionar este trabalho, tão árduo para mim. Agradeço e peço desculpas a eles, também, por terem tido tanta paciência e carinho comigo, diante de tantos momentos em que estive ríspida e desmotivada.

Agradeço aos colegas da Fiocruz, em especial aos colegas do Lapem e aos colegas de mestrado pela atenção.

Agradeço aos funcionários da Fiocruz que proporcionam as melhores condições possíveis para que todos nós, estudantes e pesquisadores, possamos desempenhar bem nossas atividades.

Agradeço aos professores pesquisadores que ministraram nossas aulas.

Agradeço ao meu orientador, incansável promotor da pesquisa e da busca pelo conhecimento amplo e irrestrito, que muito me estimulou ao crescimento profissional e muito me motivou ao crescimento pessoal.

Agradeço à natureza, ao Universo e aos querid@s cachorr@s e gat@s, que me imbuem de amor, alegria e otimismo.

“Todas as pessoas nascem livres e iguais em dignidade e direitos...”
(Artigo I da Declaração Universal dos Direitos Humanos)

“Paz sem voz não é paz, é medo”
(o Rappa)

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação.”
(Simone de Beauvoir)

MATOS, Selma Sousa. Alterações morfológicas e de populações celulares em baços de pacientes com formas graves de leishmaniose visceral humana. 2019. 74 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2019.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A leishmaniose visceral (LV) está associada a alterações arquiteturais esplênicas e redistribuição de populações celulares envolvidas na resposta imunológica. **OBJETIVO:** estudar a desestruturação da polpa branca do baço na LV humana e quais são as células e citocinas envolvidas neste processo. **METODOLOGIA:** Para este estudo, foram analisadas amostras de 10 baços humanos, 7 deles obtidas de esplenectomias em portadores de leishmaniose visceral grave e 3 oriundas de esplenectomias feitas em indivíduos sem leishmaniose. Seis dos 7 pacientes com LV são coinfectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), com carga viral indetectável. Na tentativa de avaliar se as alterações observadas em baços em modelos murinos e caninos estão também presentes no baço humano no curso da Leishmaniose visceral, as secções de baço foram marcadas com os anticorpos contra CD3, CD4, CD8, CD20, CD79- α , CD68, Caspase 3, Foxp3, IFN γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TGF β e TNF α . **RESULTADOS:** Os resultados observados, da comparação entre baços com LV e baços sem LV, evidenciaram plasmocitose na polpa vermelha, hiperplasia ou atrofia e desestruturação da polpa branca, além de redução da população de células T CD4+, aumento da população de linfócitos T CD8+ e redução das células CD20+ na polpa vermelha. Dentre as citocinas, houve redução de IL-10, IL-17 na polpa branca e na polpa vermelha. E, na polpa branca, houve aumento da expressão de TNF, Foxp3 e Caspase3 nos baços com leishmaniose visceral. **CONCLUSÃO:** Tais achados são compatíveis com uma resposta imune ineficiente frente a uma superexposição antigênica, diante da infecção crônica e/ou da coinfeção LV-HIV, culminando com exaustão, quando as células perdem a capacidade de resposta imune eficiente, com menor produção ou ausência de produção de moléculas protetoras para o hospedeiro e produção de moléculas inibitórias, o que favorece o agravamento da doença. O que vale dizer que a hiperestimulação antigênica crônica leva à ativação persistente, o que determina exaustão do sistema imune.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral; Baço; Plasmocitose; Resposta Imune Ineficiente.

MATOS, Selma Sousa. Morphological and cell population changes in spleens of patients with severe forms of human visceral leishmaniasis. 209. 74 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2019.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Visceral leishmaniasis (VL) is associated with splenic architectural changes and redistribution of cell populations involved in the immune response. **AIM:** The objectives of this dissertation were to study the spleen white pulp disruption in human visceral leishmaniasis (VL) and which cells and cytokines are involved in this process. **METHODOLOGY:** For this study, samples from 10 human spleens were analyzed, 7 obtained from splenectomies in patients with severe visceral leishmaniasis and 3 from splenectomies performed in individuals without leishmaniasis. Six of the VL patients are co-infected with the human immunodeficiency virus (HIV), with an undetectable viral load. In this study, we aimed to evaluate whether changes observed in spleens in murine and canine models are also present in the human spleen during the course of visceral leishmaniasis, considering that there are still few studies on the subject in humans. Spleen sections were labeled with anti-CD3, CD4, CD8, CD20, CD79- α , CD68, Caspase 3, FoxP3, IFN γ , IL-1b, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TGF β and TNF α antibodies. **RESULTS:** The observed results of the comparison between LV and spleen without LV showed red cell plasmacytosis, hyperplasia or atrophy and disruption of the white pulp, as well as a reduction in the CD4 + T cell population, an increase in the CD8 + T lymphocyte population and a reduction in CD20 + cells in the red pulp. Among the cytokines, there was reduction of IL-10, IL-17 in white pulp and red pulp. And, in white pulp, there was increased expression of TNF, Foxp3 and Caspase3 in spleens with visceral leishmaniasis. **CONCLUSIONS:** These findings are compatible with an inefficient immune response to antigenic overexposure to LV-HIV co-infection, culminating in exhaustion, when cells lose efficient immune response capacity, with less or no production of protective molecules for the host and production of inhibitory molecules, which favors the aggravation of the disease. It is worth mentioning that chronic antigenic hyperstimulation leads to persistent activation, which causes exhaustion of the immune system.

Keywords: Visceral leishmaniasis; Spleen; Plasmacytosis; Inefficient Immune Response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Situação da endemicidade de Leishmaniose Visceral em todo mundo em 2015.....	13
Figura 2. Casos de Infecção por LV por município.....	14
Figura 3. Desenho esquemático dos compartimentos do baço. Principais células e quimiocinas envolvidas na organização desses compartimentos.....	26
Figura 4. Sequência de eventos proposta na desorganização do baço	31
Figura 5. Esgotamento de células T: características, causas e conversão	38
Figura 6. Tipos de Baço	43
Figura 7. A - baço do grupo controle, sem LV; B - baço com LV mostra evidente plasmocitose	52
Figura 8. Contagem de plasmócitos em baços de pacientes Com e Sem LV	52
Figura 9. Contagem de Plasmócitos nos baços de cada indivíduos correspondes aos grupos formados.....	53
Figura 10. Percentual De PB/PV	54
Figura 11. Marcação com anticorpos anti-CD4	56
Figura 12. Marcação com anticorpos anti-CD8	57
Figura 13. Marcação com anticorpos anti-CD20	58
Figura14.Contagens de células marcadas com anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD20.....	59
Figura 15. Heatmap PB - IHQ com anticorpos de populações celulares, citocinas e outras moléculas	61
Figura 16. Heatmap PV –IHQ com anticorpos de populações celulares, citocinas e outras moléculas.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos anticorpos utilizados	45
Tabela 2: Parâmetros clínicos dos esplenectomizados portadores de LV.....	50
Tabela 3: Parâmetros laboratoriais dos esplenectomizados portadores de LV	52
Tabela 4: Contagem das células marcadas com anticorpos na PB esplênica.....	59
Tabela 5: Contagem das células marcadas com anticorpos na PV esplênica.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência humana
CCL	Ligantes de quimiocinas contendo 2 resíduos de cisteína juntos
CCR	Receptor de quimiocinas contendo 2 resíduos de cisteína juntos
CD	Nomenclatura sistematizada de moléculas (do inglês <i>Cluster Differentiation</i>)
CG	Centro Germinativo
CRs	Receptores de complemento (do inglês <i>Complement Receptors</i>)
CXC	Ligantes de quimiocinas com 2 resíduos de cisteína intercalados por outro aminoácido
CXCL	Ligantes de quimiocinas com dois resíduos de cisteína intercalados com outro aminoácido
CXCR	Receptor de quimiocinas contendo 2 resíduos de cisteína intercalados por outro aminoácido
DAB	Diamino benzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
FDC	Célula dendrítica folicular (do inglês <i>Follicular Dendritic Cell</i>)
FOL	Folículo Esplênico
FoxP3	Fator de Transcrição (do inglês <i>Forkhead Box P3</i>).
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IDC	Célula Interdigitante do estroma esplênico (do inglês <i>Interdigitant Cell</i>)
IFN γ	Citocina Interferon Gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MHC	Complexo de histocompatibilidade humana (do inglês <i>Major Human Complex</i>)
MMM	Macrófago Metalofílico
MZM	Macrófago de Zona Marginal
PALS	Bainha periarteriolar de linfócitos (do inglês <i>Periarteriolar Lymphoids Sheat</i>)
PB	Poupa Branca
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PD-1	Molécula inibitória de Morte programada 1 (do inglês <i>Programmed Cell Death 1</i>)
PV	Poupa Vermelha
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>)
RT-PCR	Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real
TARV	Terapia Anti-retroviral
TGF β	Fator de transformação do crescimento B (do inglês <i>Transforming Growth Fator B</i>)

Th1	Linfócitos T auxiliares tipo 1 (do inglês <i>T helper-1</i>)
Th2	Linfócitos T auxiliares tipo 2 (do inglês <i>T helper-2</i>)
TNF	Fator de Necrose Tumoral (do inglês <i>Tumoral Necrosis Factor</i>)
ZM	Zona Marginal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	LEISHMANIOSE VISCERAL	13
1.1.1	Epidemiologia	13
1.1.2	Transmissão da LV e Ciclo Biológico Do Parasita	15
1.1.3	Patogenia da LV	18
1.1.4	Coinfecção LV e HIV	18
1.1.5	Tratamento cirúrgico da LV grave –Esplenectomia	20
1.2	BAÇO	21
1.2.1	Histórico dos Estudos sobre o Baço, Embriogênese e Alterações não infecciosas adquiridas...	21
1.2.2	Estrutura e Funções Esplênicas	22
1.2.3	Distribuição de Células e Quimiocinas Envolvidas na Resposta Imune Esplênica	23
1.2.4	Baço e LV	27
2	JUSTIFICATIVA	39
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	POPULAÇÃO EM ESTUDO	41
4.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO NO ESTUDO	41
4.3	DIAGNÓSTICO DE LV	41
4.4	DIAGNÓSTICO DE HIV	42
4.5	ANÁLISE HISTOLÓGICA	42
4.5.1	Caracterização da Amostra	42
4.5.2	Preparo das Amostras	42
4.5.3	Análise Histológica	43
4.5.4	Classificação dos Tipos de Baço	43
4.6	IMUNOHISTOQUÍMICA	44
4.6.1	Captura das Imagens Obtidas das Lâminas com Secções de Baço	44

4.6.2	Imunofenotipagem de Células e Mensuração da Expressão de Citocinas e outras Moléculas nas Amostras de Baço.....	44
4.7	MORFOMETRIA.....	45
4.7.1	Contagem de Plasmócitos.....	45
4.7.2	Quantificação do Percentual de PB em Relação à PV	46
4.7.3	Contagem das Células Marcadas com Anticorpos	46
4.7.4	Dados Clínicos dos Pacientes com LV.....	46
4.8	ANÁLISE E EXPRESSÃO DE RESULTADOS.....	47
5	RESULTADOS	48
5.1	ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS	48
5.2	CONTAGEM DE PLASMÓCITOS NA PV.....	52
5.3	PORCENTAGEM DA ÁREA DE PB EM RELAÇÃO À ÁREA DE PV.....	53
5.4	DISTRIBUIÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES E DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS E OUTRAS MOLÉCULAS NA PB E NA PV ESPLÊNICAS.....	54
5.4.1	Análise Qualitativa das Populações Celulares Esplênicas	54
5.4.2	Análise Qualitativa da Expressão de Citocinas e Outras Moléculas.....	57
5.4.3	Análise Quantitativa das Populações Celulares Esplênicas	57
5.4.4	Análise Quantitativa da Expressão de Citocinas e Outras Moléculas.....	58
6	DISCUSSÃO	61
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSE VISCERAL

1.1.1 Epidemiologia

A leishmaniose representa a segunda causa mais prevalente de doenças causadas por protozoários no mundo e a apresentação visceral (LV) é a forma mais grave. (HENN et al., 2018). A Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como Calazar, é uma doença grave e sistêmica com taxa de letalidade mundial de até 6,0%. É uma das 7 maiores doenças mundialmente negligenciadas, presente em 4 continentes, com exceção apenas da Oceania, num total de aproximadamente 70 países. (OMS, 2014).

Cerca de 95% dos casos de LV é fatal, quando não tratada; há cerca de 20.000 a 30.000 mortes por ano no mundo em decorrência da LV. A maioria dos casos ocorre na América do Sul, na África Oriental e no Sudeste Asiático. Estima-se que 50.000 a 90.000 novos casos de LV ocorram em todo o mundo a cada ano, dos quais apenas cerca de 25-45% são reportados. Em 2017, 20.792 dos 22.145 (94%) casos novos reportados à OMS ocorreram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão, conforme mostrado na figura 1 (OMS, 2017).

Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2015

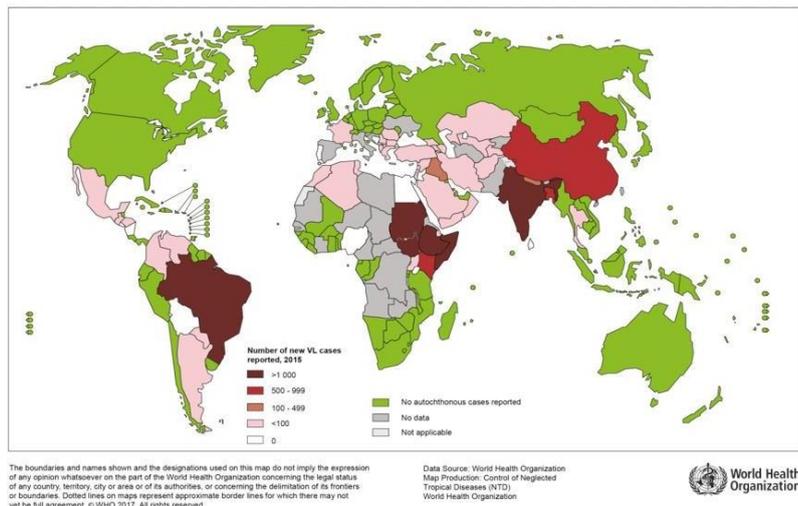


Figura 1. Situação da endemicidade de Leishmaniose Visceral em todo mundo em 2015. Figura adaptada (WHO, 2017)

Nas Américas, destaca-se o aumento do número de mortes causadas por LV desde 2012 alcançando, em 2016, uma taxa de letalidade de 7,9%, considerada a mais elevada, quando comparada a outros continentes (WHO, 2017). Cerca de 96% dos casos de LV, no continente americano, ocorrem no Brasil, onde a mortalidade chega até a 8,8%, mesmo com tratamento, sendo um grande problema de saúde pública em expansão evidente, conforme mostra figura 2 (BRASIL, 2017).

No Brasil, na década de 1990, aproximadamente 90% dos casos de LV relatados ocorreram na região nordeste, entretanto, esta tendência parece estar mudando, já que a doença atinge áreas urbanas e peri-urbanas de todas as regiões do país (CALDART et al., 2017). Segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil, em 2017, 44,5% dos casos de LV ocorreram na Região Nordeste; 40,9% dos casos acometeram crianças entre 0 e 9 anos de idade e a taxa de coinfectados LV-HIV foi de 7,8%. A LV é uma endemia de impacto significativo na saúde e na economia da população mundial, com uma carga estimada de 2,1 milhões de *DALY* (*disability-adjusted life years*, lê-se: anos de vida ajustados por incapacidade). (TOWNSON et al., 2005). No Brasil, em 2017, foram registradas 2.744 internações com média de permanência de 13,3 dias (MS-2017).

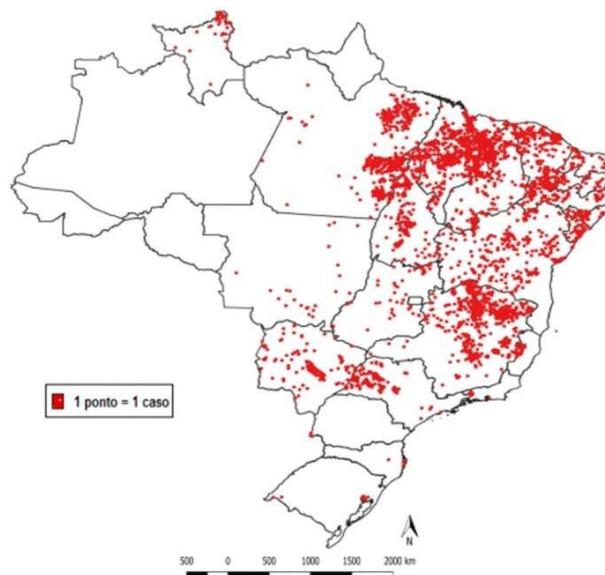


Figura 2. Casos de Infecção por LV por município.

Figura adaptada (MS, 2017)

Condições socioeconômicas que favorecem a expansão da LV têm sido apontadas como importantes fatores demográficos e ecológicos desencadeadores,

dentre elas, a presença do inseto vetor nas cidades, pobreza, subnutrição, más condições sanitárias, desmatamento, alterações climáticas, mobilidade da população e o aumento da população de cães reservatórios junto à população (SILVA et al., 2001; CALDAS et al., 2002; CABRERA et al., 2003; WHO, 2019).

1.1.2 Transmissão da LV e Ciclo Biológico Do Parasita

A LV é transmitida através da picada de um inseto vetor, um flebotomíneo, conhecido popularmente como Mosquito Palha, asa-dura, tatuquiras, birigui, dentre outros. Estes insetos são pequenos e têm como características a coloração amarelada ou de cor palha e, em posição de repouso, suas asas permanecem eretas e semiabertas.

O ciclo biológico do vetor ocorre no ambiente terrestre e passa por quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto (forma alada). Eles costumam se abrigar em locais úmidos, sombreados e ricos em matéria orgânica (folhas, frutos, fezes de animais e outros entulhos que favoreçam a umidade do solo). A evolução do ovo à fase adulta ocorre em aproximadamente 30 dias. As formas adultas abrigam-se nos mesmos locais dos criadouros e em anexos domiciliares, principalmente em abrigos de animais domésticos. Somente as fêmeas se alimentam de sangue para que hajam desenvolvimento dos ovos, o que justifica o fato de sugarem uma ampla variedade de animais vertebrados.

Em todo o continente americano, o principal vetor é a *Lutzomyia longipalpis* (DESJEUX, 2001), enquanto que na Europa, Ásia e África os insetos transmissores pertencem ao gênero *Phlebotomus*, mas as espécies variam de uma região para outra (DESCOTEAUX et al., 1999). A fêmea infectada, ao fazer o repasto sanguíneo - sugar o sangue do vertebrado para se alimentar, regurgita parasitas *Leishmania* na sua forma infectante, a promastigota metacíclica, na pele do indivíduo.

Após serem injetadas na derme do hospedeiro, as formas promastigotas (flageladas) da *Leishmania* são englobadas por fagócitos mono e polimorfonucleares, onde se transformam em amastigotas (aflageladas) que irão se proliferar e infectar células vizinhas (BITTENCOURT; BARRAL-NETTO, 1995; DESCOTEAUX et al., 1999; ASHFORD, 2000;) e, via corrente sanguínea, se disseminam para outros órgãos. Durante o desenvolvimento da LV, os parasitas *Leishmania donovani* ou *Leishmania*

infantum e, mais raramente, outras espécies de *Leishmania* (BARRAL et al., 1986) invadem células do sistema fagocítico mononuclear.

A LV pode ser disseminada através de padrões que incluem as formas antroponótica ou antrozoonótica. A forma antroponótica, cuja transmissão é de humano para humano, é causada pela *Leishmania donovani*. A forma antrozoonótica, que inclui no ciclo de transmissão outros mamíferos como o cão, é causada pela *Leishmania infantum* (SILVEIRA et al., 1982; TRAVI et al., 1998).

A LV normalmente apresenta um período de incubação entre 10 dias e 24 meses, com média, de 2 a 6 meses e pode ter evolução aguda, subaguda ou crônica, entretanto, parte dos indivíduos infectados permanece completamente assintomática (BADARO et al., 1986; BITTENCOURT; BARRAL-NETTO, 1995).

As manifestações clínicas clássicas da LV são febre, caquexia, adinamia, hepatoesplenomegalia, pancitopenia - com anemia e trombocitopenia, e leucopenia com neutropenia, eosinopenia, e relativas linfocitose e monocitose; hipergamaglobulinemia com ativação policlonal de células B com hipoalbuminemia (BADARO et al., 1986; HERWALDT, 1999; COLLIN et al., 2004). Os sintomas podem durar semanas ou meses, tempo este em que os pacientes podem morrer por coinfeções bacterianas, como pneumonia, diarreia ou tuberculose; e também hemorragias ou anemia grave (CHAPPUIS et al., 2007).

Em alguns pacientes, pode ocorrer doença cutânea após a recuperação da LV, uma forma de dermatite denominada Leishmaniose Dérmica Pós Kalazar (PKDL) que se apresenta como lesões cutâneas maculares, papulares e/ou nodulares disseminadas, que contém macrófagos parasitados. (BITTENCOURT; BARRAL-NETTO; DOERR, 1995).

1.1.3 Patogenia da LV

A LV determina uma infecção disseminada do sistema linforreticular do organismo do hospedeiro, o que provoca marcada ineficiência de seu sistema imune. Para uma evolução favorável, com a cura da LV, é indispensável a estreita interação entre a ação das drogas antileishmania, dizimando os parasitas, e a impulsão adequada do sistema imune do hospedeiro.

A LV apresenta amplo espectro clínico e pode acometer vários órgãos, principalmente medula óssea, linfonodos, fígado e baço e, menos frequentemente,

intestinos, pulmão e rim. (STEVERDING et al., 2017; HENN et al., 2018). O baço encontra-se com parasitismo durante todo o curso da doença e apresenta alterações arquiteturais associadas aos estádios clínicos. (SANTANA et al., 2008, LIMA et al., 2014, SILVA et al., 2014; Souza, 2019).

Com a evolução da doença, que pode adquirir caráter progressivo, como na Leishmaniose Crônica, os compartimentos esplênicos sofrem proeminentes deformações arquiteturais que inviabilizam uma resposta imune adequada, com ineficiência na geração de folículos linfoides secundários e na manutenção da zona marginal. Há produção anormal de citocinas e alteração da celularidade normal do baço, com consequente incapacidade na função esplênica de vigilância contra infecções (ABDALLA; EL HASSAN, 1983; VERESS et al., 1977; DE LIMA et al., 2006; SANTANA et al., 2008).

Há dados na literatura que sugerem que a leucopenia, com redução do número de neutrófilos, a ativação policlonal ineficaz da resposta imune humoral e a supressão da resposta celular efetora, inata ou adquirida, estejam implicadas na progressão da doença (DE LUNA et al., 1999; SILVA et al., 2016).

Em estudo anterior do nosso grupo, observamos uma desestruturação do tecido linfóide esplênico em cães, associada à presença de marcadores de susceptibilidade à leishmaniose visceral e doença de caráter mais grave. Neste mesmo estudo, foi observado que a frequência de plasmócitos está aumentada nos baços de cães naturalmente infectados com *Leishmania*. Em trabalhos recentes do grupo, detectou-se que em animais com infecção por *Leishmania*, a desorganização arquitetural do baço está associada, mais frequentemente, a sinais clínicos e laboratoriais mais graves da doença (SANTANA et al., 2008; LIMA et al., 2013).

Um dos principais problemas associados à LV são as infecções bacterianas e sangramentos, que podem levar ao óbito. A resposta do hospedeiro, nesses casos, é ineficiente, o que facilita as coinfeções, mas ainda são necessários estudos mais detalhados e esclarecedores sobre as vias que levam a esta resposta.

Estudos mostram que na Leishmaniose Visceral Canina (LVC), que apresenta muitos aspectos semelhantes à LV humana, o curso da doença é determinado por uma interação complexa entre o parasita e o sistema imunológico do hospedeiro. (LIMA, 2013). Uma resposta celular mista relacionada à infecção já foi demonstrada em vários estudos, dentre eles, experimentos em diferentes condições. A resposta imune na LV é órgão-específica, os parasitas são viscerotrópicos e o baço é um importante

alvo. No baço, a produção de citocinas Th1, como IFN- γ , IL-12 e TNF, aumentam durante todo o curso da doença. A predominância de citocinas Th2/regulatórias, como IL-4, IL-10 e TGF- β 1, determina maior carga parasitária e persistência, com consequente progressão da doença.

No trabalho de Moreira e colaboradores (2017), identificou-se associação entre a alta carga parasitária nos órgãos linfoides e maior número de linfócitos apoptóticos, que não são capazes de promover a morte dos parasitas, com persistência da infecção, em tecidos caninos. Também há correlação entre alta percentagem de apoptose de células T e a desorganização estrutural da polpa branca, como mostrado em estudo experimental com cães, o que pode culminar em uma resposta imune mediada por células ineficientes.

A progressão da doença está associada a uma infinidade de fatores que incluem a atuação de citocinas supressoras, exaustão de células T específicas, deformidade arquitetural da PB e da PV do baço, além de alterações na resposta humoral. Citocinas importantes, como a IL-10, uma das principais citocinas supressoras envolvidas na patogênese da LV, bem como o IFN- γ que, impulsionado por IL-12, se associa à cura da doença, podem servir de alvos terapêuticos. (BHATTACHARYA, 2012).

1.1.4 Coinfecção LV e HIV

Em pessoas imunossuprimidas, incluindo doentes com HIV/AIDS, a LV tem representado uma importante infecção oportunista com vertiginoso crescimento no número de casos (ALVAR et al., 1997; DAVIDSON, 1999; DESJEUX et al., 2003). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a LV humana tem ocorrido de forma mais acentuada, desde o início da década de 90, principalmente nos países mediterrâneos, pela coinfecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). A incidência de casos de LV relatados praticamente duplicou entre 1987 e 2004, com distribuição mundial, incidindo em 35 países.

Condições de coinfeções que causam imunossupressão podem determinar progressão da LV para a forma grave da enfermidade, visto que a resposta imune celular efetiva contra o parasita está comprometida (BITTENCOURT; BARRAL-NETTO, 1995). A coinfecção LV-HIV é um fenômeno grave que pode levar à morte, embora a

terapia antirretroviral para HIV tenha determinado redução do número desses casos de coinfeção e melhorado as taxas de sobrevivência. (ORYAN, 2016)

No Brasil, o número de indivíduos coinfectados, LV-HIV, tem aumentado muito, com relato de 1602 casos entre 2007 e 2013. Nestes pacientes, a LV é oriunda de uma infecção latente reativada, o que ocorre pela imunossupressão progressiva, até que o parasita supera a capacidade de defesa do sistema imunológico do hospedeiro (HENN et al., 2018). As manifestações clínicas mais características da LV, podem não ser reconhecidas nos indivíduos imunossuprimidos, pois podem ser parecidas com os sintomas de não infectados por LV; nos coinfectados, predominam sintomas não clássicos da LV como fraqueza, tosse, diarreia, desnutrição, maior perda de peso e maior frequência de sintomas gastrointestinais.

Nesses indivíduos imunocomprometidos, a LV mostra uma tendência a acometer órgãos e sistemas não comumente afetados (HENN et al., 2018) com amastigotas em locais incomuns como pulmões, pleura, pericárdio, pele, mucosa oral, e trato gastrointestinal. É presumível que diferentes apresentações nos sinais e sintomas dificultem a inclusão da LV no diagnóstico diferencial, o que pode concorrer para o atraso no diagnóstico e no tratamento, e, provavelmente, determinar maior gravidade da doença e a resultados mais desfavoráveis.

Tanto a LV como o HIV atingem células dendríticas e macrófagos, o que significa uma resposta imune sinérgica danosa para o paciente coinfectado (WOLDAY et al., 1999; OLIVIER et al., 2003). Na literatura, tem-se que tanto a leishmania pode potencializar a transcrição do HIV como o HIV pode prejudicar a fagocitose de parasitas pelos macrófagos, por ativar o receptor de lipoproteína de baixa densidade na superfície do parasita (SINHA et al., 2006; MEDRANO et al., 2013). Na coinfeção, o número de células T CD4 apresenta-se reduzido em significativa parte dos pacientes, cerca de 42% de uma série estudada (ALVAR et al., 1997).

O controle da LV com Antimoniais e Anfotericina tem se mostrado efetivo na maioria dos casos (HERWALDT, 1999), entretanto, a doença mantém um percentual de letalidade (MS, 2017). As principais ferramentas de controle da LV no Brasil estão centradas na identificação e eliminação dos reservatórios, principalmente o cão, aplicação de inseticidas para eliminação do inseto vetor e no diagnóstico e tratamento adequado dos casos registrados (ASHFORD, 1996).

1.1. 5 Tratamento cirúrgico da LV grave – Esplenectomia

Há dados da literatura que mostram que a esplenectomia como forma de terapêutica nos casos de LV resistente a tratamento clínico, é uma prática realizada desde o final do século 19, antes da descoberta dos sais de antimônio, introduzidos em 1915. Embora cercada por controvérsias, a esplenectomia passou a ser realizada com maior frequência entre 1930 e 1935, com resultados satisfatórios em série de casos do mediterrâneo. Entre as décadas de 30 e 40, foram relatados cerca de 30 casos na Espanha e em Portugal. A esplenectomia promove a melhora clínica, há redução do parasitismo e eliminação do hiperesplenismo, que causa alterações hematológicas importantes. (TROYA et al., 2006).

Dutra et al, em 2011, publicou relato de caso de esplenectomia como alternativa de tratamento em caso de LV em garoto de 12 anos, resistente a tratamento clínico, com resultados satisfatórios e cura da doença.

Em relato de caso, Dos-Santos e colaboradores (2014), do nosso grupo, mostra que um paciente com LV foi esplenectomizado por não responder ao tratamento clínico e evoluiu com melhora significativa. Neste mesmo trabalho, comparou o baço do paciente com LV com outros dois baços sem a doença, e foram detectadas alterações na relação CD4/CD8, bem como evidências de que o FoxP3 e a IL-17 se associam à cronicidade da doença.

Na coinfeção LV-HIV, mesmo nos pacientes que aderem ao tratamento indicado para Leishmaniose, normalmente há muitas recidivas, associadas à pancitopenia grave, aumento da carga parasitária e redução do número de células CD4, mesmo nos casos de carga viral indetectável (ALVAR et al., 1997; BERMAN et al., 1999; BERMAN et al., 2002; BERMAN et al., 2003).

Com a terapia antirretroviral (TARV), alguns pacientes coinfetados respondem com redução da frequência de recaídas e melhora do estado imunológico com controle da infecção. Entretanto, outros indivíduos coinfetados não respondem bem à terapia medicamentosa e apresentam infecção persistente com pancitopenia crítica que favorece sangramentos e infecções oportunistas. (PANARELLO et al., 2003; SOUSA et al., 2011).

Alguns estudos mostram que, nesses casos de LV não responsivos à terapêutica farmacológica, a esplenectomia é de extrema importância no curso da doença (BARUA et al., 1971; GÓRGOLAS et al., 2007; DUTRA et al., 2012). Em

coinfetados, LV-HIV, há uma melhora clínica evidente após a esplenectomia, por provável redução da carga viral contida nos linfócitos do baço e redução da carga parasitária. Há aumento de linfócitos T CD4 e menor incidência de evolução para a síndrome da imunodeficiência humana (AIDS), após a esplenectomia (TROYA et al., 2006; BERNARD et al., 1998; HANSEN et al., 2001; SUMARAJU et al., 2001).

1.2 BAÇO

1.2.1 Histórico dos Estudos sobre o Baço, Embriogênese e Alterações não Infecciosas Adquiridas

Historicamente, o baço humano atrai a atenção de poetas como um produtor de melancolia. Galeno (131-201 dC) referiu-se ao baço humano como um órgão enigmático, uma noção que persistiu por um longo tempo. Ao longo da história, alguns estudiosos muito contribuíram para que chegássemos ao conhecimento do baço como o que temos hoje, embora muitos estudos ainda se fazem necessários, para completo entendimento da estrutura e das funções esplênicas. Dentre os estudiosos destacam-se Malpighi, que diferenciou a PB e a PV, no século XVII. Billroth, em 1857, publicou um dos primeiros estudos sobre a histologia do baço humano. Nieuwenhuis, Ford, e Keuning, na década de 1970, estudaram a função imunológica no baço de ratos. Veerman, na mesma década, fez uma descrição detalhada da polpa branca do baço de rato. Weiss detalhou a histoarquitetura do órgão por microscopia eletrônica, na década de 1970, e ainda fez um resumo completo da organização dos compartimentos e funções do baço, em 1988.

O baço faz parte do sistema imunitário que se desenvolve durante o crescimento do embrião/feto, e que continua após o nascimento. A maturação funcional esplênica é exibida pela morfologia: até o nascimento, a polpa branca esplênica não contém folículos e zonas marginais. Há células B imaturas em grupos e células T distribuídas difusamente por todo o órgão. O número de células aumenta de acordo com o desenvolvimento do feto e, a partir do fim do segundo trimestre, áreas de células B e T podem ser reconhecidas e, na décima segunda semana de gestação, a fagocitose já pode ser demonstrada. (JUNQUEIRA et al., 2013).

1.2.2 Estrutura e Funções Esplênicas

O baço é um órgão intraperitoneal, considerado o maior acúmulo linfóide do organismo e está normalmente localizado na parte superior esquerda da cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma (MEBIUS et al., 2005) – no hipocôndrio esquerdo. É o maior filtro de sangue do corpo, já que é o único órgão linfóide interposto na circulação sanguínea (KRAAL, 1992; STEINIGER et al., 2000) e o principal responsável pela eliminação de partículas e microrganismos presentes no sangue.

É irrigado pela artéria esplênica (ou lineal), que se origina do tronco celíaco e que, no hilo esplênico, divide-se em alguns ramos, geralmente de 4 a 6, com um aspecto arboriforme. O fluxo venoso também é constituído por alguns ramos vasculares que se juntam no ligamento lineorrenal para formar a veia Esplênica, que desemboca na veia Porta. O baço é um órgão maciço que pesa entre 150g a 250 g e mede em torno de 10,0 x 6,0 cm. Possui imensa capacidade de reação e pode alcançar mais de 1 kg sob diferentes estímulos e condições. Na senescência, pode haver expressiva diminuição de seu volume, chegando a pesar menos que 50 g.

É um órgão parenquimatoso, envolto em cápsula fibrosa delgada, e geralmente acinzentada e opaca. Aos cortes, apresenta parênquima vinhoso, a polpa vermelha, permeada por pontos esbranquiçados, a polpa branca (JUNQUEIRA et al., 2013).

São quatro as funções principais do baço: resposta imunitária, filtração dos elementos indesejados no sangue, reservatório sanguíneo e produção de células linfó-hematopoiéticas. Diariamente, cerca de 1 % do total das hemácias é destruído pelo baço, que retira da circulação leucócitos e eritrócitos lesados ou com alterações morfológicas. Normalmente, apenas 40 a 50 ml de sangue ficam reservados no baço, mas nas esplenomegalias esse volume pode aumentar muito. Em algumas condições, pode haver sequestro de células pelo baço; quando sua função está aumentada, denomina-se hiperesplenismo que significa aumento do volume do órgão associado ao aumento de sua capacidade de reter e armazenar células sanguíneas, o que leva à redução no número de eritrócitos, de leucócitos e de plaquetas circulantes, causando anemia, leucopenia e trombocitopenia (JUNQUEIRA et al., 2013).

O baço tem uma estrutura histológica muito peculiar, com quatro compartimentos principais: árvore vascular, polpa vermelha, polpa branca e zona marginal. A árvore vascular se origina das ramificações da artéria esplênica que

penetra no hilo do órgão, onde há um complexo arteriovenolinfático envolto por fibras colágenas. Existem, também, septos que partem da cápsula, mas não contêm vasos no seu interior, e são curtos e incompletos. À medida que as ramificações arteriais se subdividem em ramos menores e adquirem o tipo arteriolar, deixam de ser acompanhadas pela árvore venosa e passam a ser envoltas em tecido linfóide constituída por linfócitos T e referida como Bainha Periarteriolar de linfócitos T (Periarteriolar Lymphocytes Sheet - PALS) (JUNQUEIRA, 1995).

A polpa vermelha (PV) constitui cerca de três quartos de todo o volume do baço e é composta pelos capilares e pela rede sinusoidal, entre os quais existe uma trama de fibras reticulares bem desenvolvida, os cordões esplênicos ou cordões de Billroth, que são contínuos e de espessura variável, conforme seja a distensão dos sinusoides. Esses cordões são formados por uma rede frouxa de células reticulares e fibras reticulares de colágeno do tipo III, além de outras células, como macrófagos, linfócitos T e B, plasmócitos, monócitos, granulócitos e plaquetas. (VAN ROOIJEN et al., 1988, JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A PV serve de alojamento para os plasmoblastos e plasmócitos e esses são responsáveis por uma produção de anticorpos extrafolículos que proporciona uma rápida entrada de anticorpos na corrente sanguínea (HARGREAVES et al., 2001). A PV é prioritariamente relacionada à filtração do sangue com remoção de eritrócitos velhos - hemocaterese, com fagocitose dos eritrócitos e reciclagem de ferro, reduzindo sua disponibilidade para patógenos circulantes. A PV funciona, também, como via de saída para a maioria das células linfóides recirculantes (MEBIUS et al., 2005). O baço é o local de diferenciação e de retorno de macrófagos inflamatórios, monócitos, granulócitos, células dendríticas, células natural killer e plasmócitos de vida curta (ELLYARD et al., 2005; MEBIUS et al., 2005).

1.2.3 Distribuição de Células e Citocinas Envolvidas na Resposta Imune Esplênica

A polpa branca é constituída, principalmente, por células B e T. Os linfócitos T agregam-se em torno da árvore arterial e formam uma bainha de linfócitos, a maioria deles linfócitos T, que se espessa, em áreas, formando agregados ou folículos periarteriolares (JUNQUEIRA, 1995).

Ao corte transversal, esse arranjo faz com que sejam marcados por uma arteríola excêntrica em meio a um agregado de células T - a bainha periarteriolar rica em linfócitos T CD3+ (PALS). Por vezes, esses agregados se expandem focalmente, e se distanciam para formar os folículos linfoides (FOL) que são agregados compostos predominantemente por linfócitos B, e são formados por uma zona do manto, representada por um anel de linfócitos que forma uma orla em torno do centro germinativo CG (BROZMAN,1985), a zona marginal (ZM) uma orla composta, predominantemente, por linfócitos B, alguns linfócitos T, células dendríticas e populações de macrófagos (GRAYSON et al., 2003) e que contorna a PALS e o FOL, separando-os da polpa vermelha. A figura 3 mostra as principais células presentes nos compartimentos esplênicos (VAN ROOIJEN, 1989).

A diferenciação de células T e B e as respostas imunes a antígenos transmitidos pelo sangue ocorre na PB (MEBIUS et al., 2005). Há muitos folículos primários, que são agregados nodulares de linfócitos pequenos, e se transformam em folículos secundários durante a resposta imune. Estes são agregados linfoides maiores, com CG, que são formados por linfócitos grandes, macrófagos, algumas células dendríticas, linfócitos T e corpos apoptóticos (MACLENNAN, 1994).

A ZM é formada por capilares, capilares elipsoides, leucócitos e hemácias; possui menor densidade de fibras reticulares do que a PV, e compreende cerca de 10% do volume do baço (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). É uma importante área de passagem das células que entram e saem do baço, pela corrente sanguínea, num ritmo mais lento, o que potencializa a filtração do sangue. A distribuição do sangue, ao chegar no baço, é feita via arteríolas terminais que desembocam na ZM, local em que os antígenos circulantes são captados por macrófagos da zona marginal (MZM), macrófagos metalofílicos (MMM) e células dendríticas. (AICHELE et al., 2003; MEBIUS et al., 2005).

A ZM é, também, o local de retorno para células B de memória e onde ocorrem as respostas T dependente ou independente a antígenos. (KRAAL, 1992; LOPES-CARVALHO et al., 2005). São plasmócitos produtores de IgM, IgA ou IgG com alta afinidade para antígenos. Outras células esplênicas, células B da ZM, também podem ser estimuladas pelo fator ativador de células B (BAFF) e um fator ligante indutor de proliferação (APRIL) numa resposta independente de célula T (TI), importante contra

antígenos microbianos (BERNASCONI et al., 2002; TSUJI et al., 2008; CERUTTI et al., 2011; GRANT et al., 2012, RASHMI;BANKOTI, 2012).

Quando há estímulo antigênico, as células B da zona marginal, migram para outros compartimentos esplênicos e ativam células TCD4+, e também estimulam a proliferação e produção de anticorpos específicos (ATTANAVANICH et al., 2004). A zona marginal facilita o contato entre o antígeno e células apresentadoras de antígeno, que é fundamental para a ativação de linfócitos e para que haja uma resposta imunológica específica. (ATTANAVANICH et al., 2004; SILVA, 2014).

O tráfico celular influencia na manutenção dos compartimentos esplênicos e no estabelecimento da resposta imune (BALOGH et al., 2004). Quimiocinas específicas controlam a correta organização e a manutenção da funcionalidade da polpa branca, atraem células T e B para os seus respectivos domínios, formando zonas específicas dentro da polpa branca (MEBIUS et al., 2005).

A ativação da resposta imune celular está associada à zona de células T (PALS). As células dendríticas (CDs) maduras que expressam antígenos ligados ao seu MHC migram da ZM para a PALS e apresentam os antígenos para os linfócitos T, o que representa um gatilho para o início da resposta imune adaptativa. Há, ainda, células acessórias da resposta imune na apresentação de antígenos – células não linfoides interdigitantes (IDCs), que se localizam na área central da PALS (STEINMAN et al., 1980; KAMPERDIJK et al., 1985; BREEL et al., 1987). A ativação de linfócitos pode ficar comprometida na PALS, se houver inibição de IL-12, ou da expressão de receptores para quimiocinas, porque reduz a migração de células dendríticas para a PALS (ENGWERDA et al., 2002; ATO et al., 2002).

O FOL tem um papel muito importante na resposta imune humoral. Depois que tem contato com os antígenos da ZM, as células B migram para o FOL e, após alguns dias, realizam expansão clonal, são selecionadas com receptores antigênicos de alta afinidade pelos antígenos, há apoptose de células B auto reativas e diferenciação de células B em células de memória (HARGREAVES et al., 2001). Também há, no folículo, células não linfoides que retêm o complexo antígeno-anticorpo denominadas de células dendríticas foliculares (CDFs)(KLAUS et al., 1980; SILVA, 2014).

No compartimento linfoide do baço, há extensa apoptose, principalmente nos centros germinativos dos folículos, onde pode se observar macrófagos que fagocitaram

restos de linfócitos apoptóticos. Este processo fisiológico é importante para a proteção contra doenças autoimunes. A proteção contra algumas formas de apoptose é dada pela proteína Bcl-2, que é expressa na maioria das células B e T, mas não expressa nas células B do centro germinativo, o que as torna susceptíveis à apoptose (JUNQUEIRA et.al., 2013).

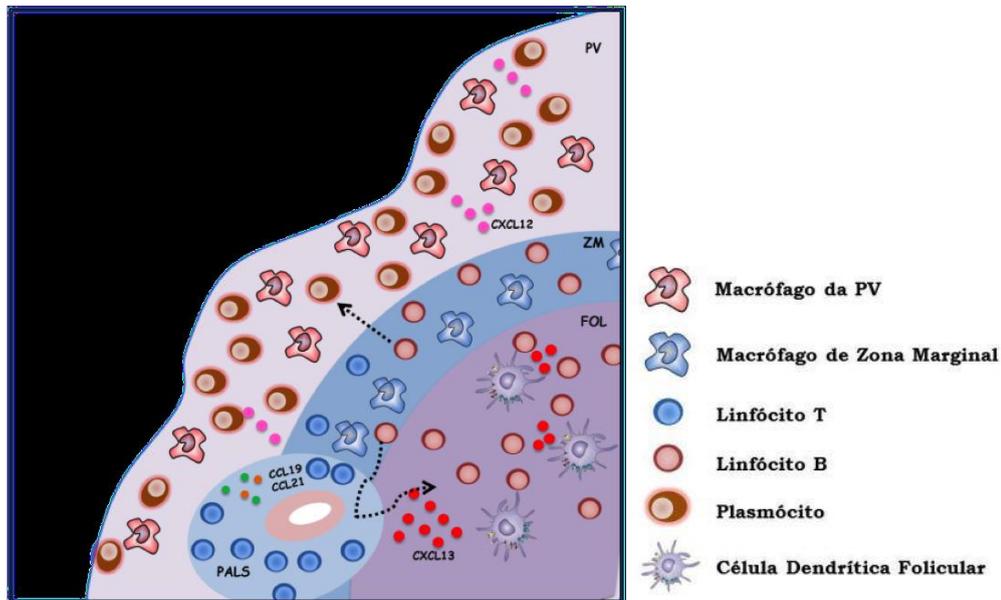


Figura 3. Desenho esquemático dos compartimentos do baço. Principais células e quimiocinas envolvidas na organização desses compartimentos.
Figura Adaptada (HERMIDA, 2018).

Durante a resposta imune T-dependente, as células B entram em contato com o antígeno na região das células T, a PALS. Tem início a diferenciação de células B em plasmócitos que saem dessa zona de células T, movimentam-se pela ZM e áreas próximas a vasos e fibras colágenas na PV e seguem, mais tardiamente, para a medula óssea. Os plasmócitos gerados pela ativação de células B no CG destinam-se, preferencialmente, para a medula óssea.

Normalmente, os plasmócitos presentes na PV, vivem poucos dias e os plasmócitos que migram para a medula óssea vivem semanas ou meses, o que mantém elevados os níveis séricos de anticorpos após a exposição ao antígeno (BENNER et al.,1981, SLIFKA et al.,1998). Há plasmócitos de vida longa que adquirem esta capacidade por serem hábeis em retornar aos locais de células estromais produtoras de moléculas críticas, como a CXCL12, que lhes confere maior sobrevivência. (FAIRFAX et al.,2008).

Alguns autores descreveram que a redução de fatores de ativação de células B pertencente à família TNF (BAFF e/ou APRIL) leva a uma diminuição do número de plasmócitos de vida longa (O'CONNOR et al., 2004; INGOLD et al., 2005; RAMANUJAM et al., 2006). Essas citocinas da superfamília TNF, BAFF e APRIL, são fundamentais para a sobrevivência, maturação e diferenciação de células B (MACKAY et al., 2003; KALLED, 2005). Chu e colaboradores (2009) mostraram que a ativação de células B leva a uma alta expressão de BAFF e APRIL em plasmócitos, e isso promove uma alça autócrina de auto sustentação que prolonga a vida de plasmócitos na medula óssea. (CHU et al., 2009).

Wols e colaboradores (2007) demonstraram que a sobrevivência de plasmócitos é determinada pelo ambiente estromal, e não é pré-programada. As células estromais da medula óssea produzem IL-6, que é derivada dessas células, e influencia na sobrevivência dos plasmócitos; isso pode ser um fator contribuinte para o fato de que, normalmente, as células estromais da medula óssea expressam mais CXCL12 do que as células estromais esplênicas.

1.2.4 Baço e LV

O baço é um órgão fundamental na defesa do organismo, eliminando e/ou limitando a ação de patógenos que circulam no sangue. A sua ausência, a asplenia, pode predispor a infecções maiores e mais frequentes (HANSEN; SINGER, 2001). Dentre as alterações na arquitetura esplênica, já foram detectadas hiperplasia e atrofia linfóide, hiperplasia de células estromais esplênicas e desorganização da polpa branca. (ABREU et al., 2001; SONNE et al., 2009; SCHNEIDER et al., 2010; DKHIL et al., 2014; DJOKIC et al., 2018).

A atrofia linfóide é representada, principalmente, por atrofia dos folículos e da zona marginal (ZM). Pode haver redução do número dos linfócitos B CD79+ na ZM e nos folículos linfóides, e redução do número de linfócitos T CD3+ nos folículos linfóides (SILVA et al., 2012). Estudos também já demonstraram redução da quantidade de linfócitos T CD4 (SILVA et al., 2018) e maior taxa de apoptose de células T quando há desorganização da PB, em cães com LV (LIMA et al., 2012). Nesse contexto, a

exaustão de células T pode estar implicada na progressão da desorganização dos compartimentos do baço.

A parasitemia, no baço, é permanente e a doença segue um curso progressivo (WILSON; STREIT, 1996; CARRIÓN et al., 2006), que determina alterações morfológicas tanto na polpa branca, com desestruturação dos compartimentos, como na polpa vermelha, com substituição da celularidade normal por plasmócitos (SILVA et al., 2016) e macrófagos infectados.

A função de filtração do baço é principalmente exercida por macrófagos esplênicos que fagocitam aproximadamente 95% dos parasitas que entram pela corrente sanguínea. Calcula-se que 50% dos parasitas inoculados é fagocitado e morto por MZM nas primeiras 24 horas.

Um dos eventos principais é a desestruturação do tecido linfóide que inicialmente é representada por hiperplasia dos folículos linfóides e aumento da população de macrófagos (VERESS et al., 1983; KEENAN et al., 1984; BAMOROVAT et al., 2014; LIMA, 2014). A hiperplasia seguida de atrofia do tecido linfóide e a desorganização dos microambientes do baço foram observadas durante a infecção por *Leishmania*, bem como por outros agentes patogênicos, já demonstradas em trabalhos anteriores, experimentais e em humanos. (VERESS et al., 1983; ENGWERDA et al., 2002; ANDRADE et al., 1989).

A relação entre a evolução da doença clínica e a desestruturação da arquitetura esplênica já foi demonstrada. Esta associação entre a desorganização do tecido linfóide do baço e susceptibilidade à doença também já foi detectada na LV Canina (LVC) por Santana et al. 2008 e outros autores. Atrofia e perda de compartimentos de células B do baço coincidiu com fases mais graves da doença. (KEENAN et al., 1984; VERESS et al., 1983; VERESS et al., 1977; TRYPHONAS et al., 1977; DOS-SANTOS, 2014; SILVA, 2014).

A desorganização do tecido linfóide é atribuída às alterações sofridas nas próprias populações celulares esplênicas – macrófagos da ZM, linfócitos T e células dendríticas foliculares, visto que tais células atuam na sinalização da migração de linfócitos B para o folículo linfóide. Já foi demonstrado, em modelos murinos e caninos de LV, que as alterações nos tecidos linfóides secundários são graduais no curso da LV, com hiperplasia seguida por atrofia da zona do manto e da zona marginal

(VERESS et al., 1977), substituição de folículos por depósitos hialinos amorfos (VERESS et al., 1983), com consequente atrofia da PB (SANTANA et al., 2008; SANTOS et al., 2016).

As alterações morfológicas podem determinar anormalidades na resposta imune, evidenciadas em estudos com LVC, quando se constatou a importância da rede da FRC, seja direcionando a migração de células T, seja modificando o comportamento destas células na zona de células T. Outros estudos de LV em cães já mostraram associação entre alta expressão de laminina e remodelação da matriz extra celular (MEC) e sugeriram que a laminina pode estar envolvida em todos os estágios da infecção, incluindo a fase de invasão dos parasitas. (SILVA et al., 2018).

Alterações imunes com diferenças em populações celulares e expressão de moléculas imunes já foram registradas na LV. As citocinas e quimiocinas são essenciais na resposta imune celular, com capacidade de prevenir a invasão de parasitas, pois participam de muitos eventos biológicos, como resposta imune inflamatória, remodelação do sistema imune e reparação dos tecidos. A LV deteriora o estado imunológico do hospedeiro, com instabilidade e desproporção de citocinas pró e anti-inflamatórias.

A ineficiente resposta de células T CD4+/CD8+ está vinculada à progressão da doença. Outras células com papel igualmente importante, além das que atuam na resposta imune adaptativa, são as da resposta imune inata, como as células dendríticas (CDs), macrófagos, neutrófilos e eosinófilos que regulam a entrada inicial de parasitas e também atuam liberando citocinas que controlam a proliferação do parasita. (BHATTACHARYA et al., 2012). Segundo trabalho de Rodrigues et al., na LV há marcada perda de resposta das células T e ausência de produção de IFN- γ - Leishmania específico pelas células mononucleares do sangue periférico. No entanto, nos tecidos e plasma de pacientes com LV, as expressões de IFN- γ e TNF- α são reguladas positivamente. (RODRÍGUEZ-CORTÉS, 2016).

Engwerda e outros (2014) também afirmam que as maiores lesões se apresentam no baço em consequência da perda de populações celulares específicas, bem como por alterações no microambiente esplênico, o que provoca a incapacidade em desenvolver respostas imunes. A infecção persistente pode resultar de falhas na ativação da resposta imune celular, consequentes à desorganização arquitetural do baço e de um ambiente com forte expressão de citocinas Th2. Há a incapacidade de macrófagos esplênicos em recrutar linfócitos T citotóxicos (CD8), células NK e de

efetivar suas ações leishmanicidas. Isso poderia explicar a maior carga parasitária encontrada no baço. Na figura 4 é mostrada a sequência de eventos na desorganização do baço. (MOREIRA et al., 2018; HERMIDA, 2018).

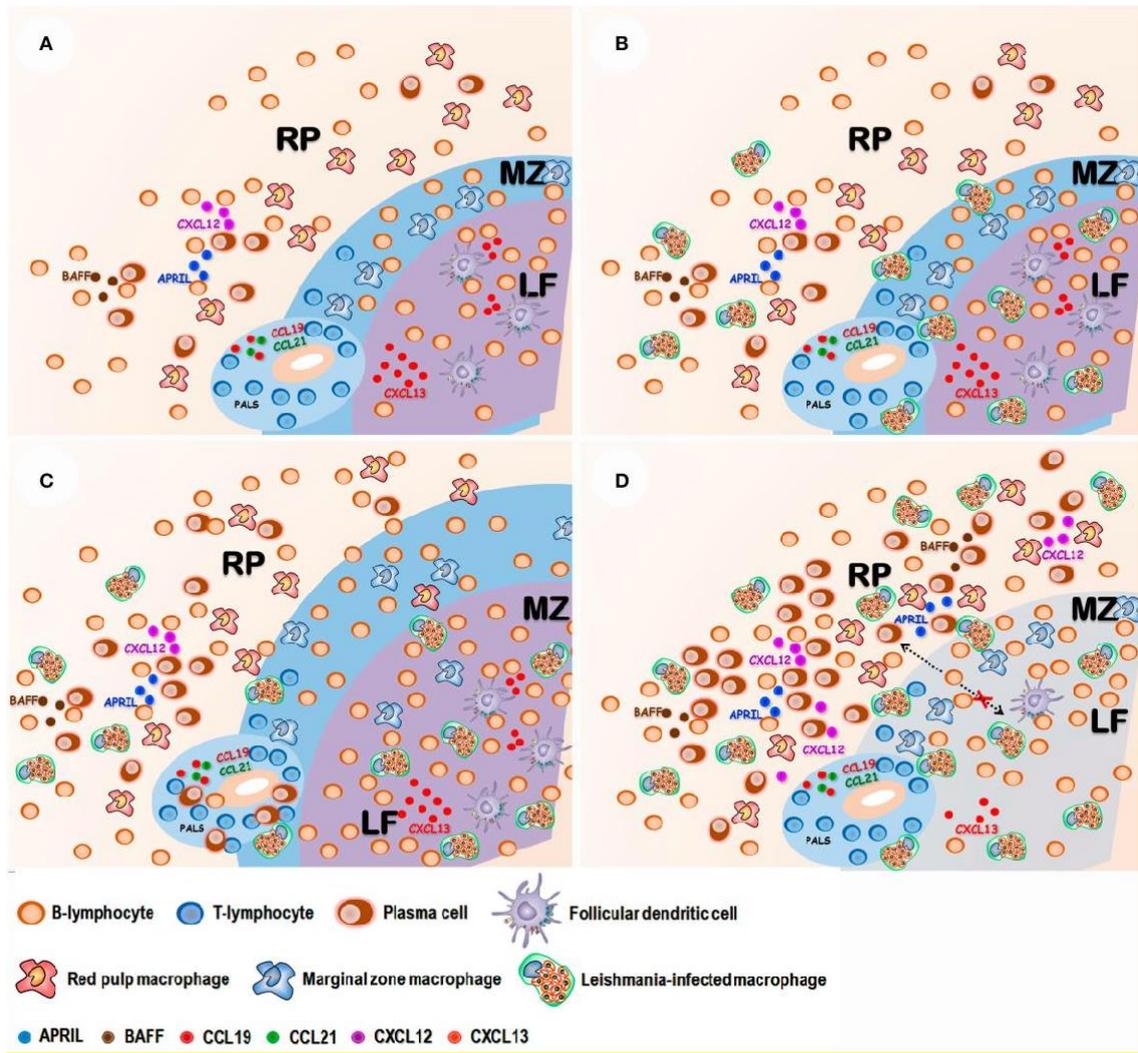


Figura 4. Sequência de eventos proposta na desorganização do baço.

(A) Baço normal com compartimentos de polpa branca e vermelha bem definidos: polpa vermelha (RP) com uma população mista de leucócitos com linfócitos, macrófagos e alguns plasmócitos. Zona marginal (MZ) contendo linfócitos e macrófagos. Folículo linfóide (LF) contendo linfócitos e células dendríticas foliculares. Bainha de linfócitos periarteriolas (PALS) contendo principalmente linfócitos. A integridade dos compartimentos do baço é dependente de quimiocinas como CCL19 e CCL21 (PALS), CXCL13 (LF). (B) Após a infecção por *Leishmania*, macrófagos contendo amastigotas são observados nos diferentes compartimentos do baço. (C) A estimulação antigênica e a ativação das células B policlonais levam à hiperplasia da polpa branca e ao acúmulo de células plasmáticas na PV. (D) A apoptose das células dendríticas dos linfócitos T e foliculares leva a uma redução da expressão da quimiocina CXCL13 e a desorganização da polpa branca. Alterações inflamatórias da polpa vermelha aumentam o fator de ativação das células B (BAFF), a expressão do ligante indutor de proliferação (APRIL) e da quimiocina CXCL-12, favorecendo o homing e a sobrevivência das células plasmáticas (HERMIDA, 2018).

Em estudos com camundongos, observou-se que Células Dendríticas (CDs) maduras estão presentes na PALS e secretam IL-12 que promove resposta protetora de células T. Também em estudos com camundongos infectados com *L. donovani*, foram detectadas células T CD4 esplênicas específicas do parasita, ativadas, já no primeiro dia após infecção e, nas primeiras semanas, o aumento no número dessas células é muito grande, o que contribui para a esplenomegalia inicialmente (RODRIGUES et al., 2016).

A LV é conhecida por ter uma resposta imune mista, Th1/Th2 e hoje já se sabe que as células T se diferenciam em subpopulações, como células T CD4, CD8 e células T Natural Killer (NK), que podem, estar envolvidas na imunologia da LV (BHATTACHARYA et al., 2012).Reina e colaboradores (2018) argumentam que a manutenção da infecção em determinados órgãos, como o baço, possa resultar, em parte, de uma subpopulação de células CD4 atuarem como células T regulatórias (Reina et al.,2018).

Após a infecção, há uma enorme proliferação de células T CD8, podendo atingir um número até 10 vezes maior, em 2 meses. Estas células são ativadas pela IL-12 e INF tipo 1, e regulam positivamente a T-bet e a Eomesodermin (Eomes), com consequente produção de citocinas tipo 1, como IFN γ e TNF, além de granzimas e perforinas, moléculas citotóxicas. As células T CD8 promovem a lise de macrófagos infectados, quando ativas, porque reconhecem os antígenos estranhos presentes na superfície destas células. A perforina destrói a célula alvo e induz diretamente a fase efetora de apoptose. Marques e colaboradores (2018) observaram que o fígado e o baço de cães infectados com LV apresentaram apoptose linfóide significativa e sugerem que esta contribui para a sobrevivência do parasita nesses órgãos, devido à ativação deficiente da imunidade celular (RODRIGUES et al., 2016; MARQUES et al., 2018).

As células B são, sabidamente, produtoras de anticorpos e, podem, também, produzir citocinas e apresentam subconjuntos na dependência das citocinas que liberam. Um subconjunto destas células são as B reguladoras (Breg) que estão associadas à imunossupressão, na LV. Atuam restringindo o excesso de resposta inflamatória e podem facilitar a sobrevivência de patógenos, particularmente nos estágios iniciais da infecção. Assim, subsequentemente, podem causar maior gravidade da doença, inibindo a ativação inflamatória de células T e macrófagos,

principalmente pela produção de IL-10, por macrófagos, que é uma importante citocina supressora que inibe a IL17, com exacerbação da doença. As células Bregs oferecem proteção contra a resposta hiperinflamatória nas infecções parasitárias e também promovem a inibição de células CD4 ativadas e o recrutamento de células Treg (MAURI et al., 2012; RASHMI, 2012; DAI et al., 2017).

A população de células Th17 atua de várias formas durante a leishmaniose visceral e pode ser fundamental para uma resposta imune eficiente envolvendo as células NK, bem como células TCD4, TCD8 e T reguladoras (Treg). A interleucina 17 (IL-17), um subconjunto de Th17, age na estimulação do recrutamento, migração e ativação de neutrófilos. (BHATTACHARYA et al., 2012). Já foi descrito que a redução de IL-17, por redução de seus receptores, está associada tanto à menor produção de INFg quanto ao menor número de células T CD4 esplênicas secretoras de INFg. A IL-17A e o INFg agem em sinergismo estimulando a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos infectados.

As células do grupo Th17 são induzidas pelas citocinas IL-6, IL-23 e TGFβ que ativam o transdutor de sinal e o ativador da via de transcrição (STAT) 3. Tais células produzem as interleucinas IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 e atuam no desenvolvimento de neutrófilos, como já referido neste trabalho (BHATTACHARYA et al., 2012).

Estudos em LV humana sugeriram que estas citocinas Th17 junto com as citocinas Th1 são complementares na resposta imune; a IL-21 está envolvida na expansão das células T produtoras de IL-10, facilitando as doenças. Estudos mostram que as células Th17 não exercem apenas um papel puramente protetor/pró- inflamatório, já que a IL-27, que atua de forma supressora nos subconjuntos Th1, Th2 e Th17, tem sido implicada na produção de IL-10 a partir de células Tr1 e na inibição de células T efetoras (BHATTACHARYA et al., 2012; De LIMA, et al., 2006).

Outra citocina importante, a IL-10, é encontrada em células esplênicas, linfonodos, medula óssea e sangue de pacientes com LV. Esta citocina pode ser produzida por vários tipos de células como T CD4, T CD8, células B, células NK, macrófagos e CDs. A IL-10 é capaz de desativar os mecanismos leishmanicidas de macrófagos, reduzir a expressão de moléculas co-estimuladoras e a expressão de MHC e, ainda, reduzir a secreção de IFNg por células T e inibir a migração das CDs para as zonas de células T (BHATTACHARYA et al., 2012; De LIMA, et al., 2006).

Há evidências de que a IL-10 também possa ser produzida por células T helper 1 (Th1) secretoras de interferon gama (INF IFNg) na LV crônica. Em estudo em camundongos, observaram-se células T CD4 esplênicas INFg+IL-10+, em pequena percentagem do total de células esplênicas T CD4, ou seja, células duplo-produtoras. Estudos mostraram que IL-21, derivada de células T, e IL-27, derivada de células mieloides, induzem a produção de IL-10 em células T CD4. As CDs infectadas são apontadas como promotoras da mudança regulatória das células T CD4.

O ambiente supressor pode ser continuamente alimentado via sinalização de IL-10, com maior secreção de IL-10 e de IL-27 por macrófagos infectados. A expressão de IL-10 por células Th1 é um evento que parece controlar o excesso de ativação que pode ser deletério para o paciente com LV. A produção de IL-10 pelas CDs limita a IL-12, com conseqüente retardo na expansão e na função das células T CD8, autenticando o papel supressor das CDs e da IL-10 na LV. (RODRIGUES et al., (2016).

Estudos já mostraram que as CDs esplênicas produzem, logo após a infecção, citocinas da família IL-12, como a IL-23p19 que pode se associar à IL-12p40 e formar a IL-23 ativa, em conjunto com outras citocinas contidas no tecido esplênico com LV, como o TGF-b, IL-6 ou IL-1b. A IL-23 induz a diferenciação de células T CD4 virgens em células Th17, ou seja, células T CD4 regulatórias. A célula Treg também é fundamental nesta resposta, conforme mostram estudos com o subgrupo Th17 responsável por diversas ações na resposta imune durante a LV. As células Treg têm sido apontadas como secretoras de IL-10 e também envolvidas tanto na progressão da LV como na patogênese da leishmaniose dérmica pós-kalazar (PKDL).

A PKDL é determinada pela resposta imune a parasitas na pele que provavelmente persistiram no episódio anterior de LV, e tem uma posição intermediária com uma dissociação da resposta imune entre a pele e as vísceras, com um tipo de resposta Th2 e Th1, respectivamente. Vários fatores de risco para a PKDL podem influenciar isso, como tratamento incompleto e inadequado da LV, resistência ao parasita e fatores genéticos. Trabalhos evidenciam o aumento de células Treg no local da infecção e sua correlação com os níveis de IL-10 e a carga parasitária (BHATTACHARYA et al., 2012; RASHMI et al., 2012; ZIJLSTRA et al., 2016).

A IL10 é referida como a principal citocina responsável pelas alterações esplênicas que ocorrem na LV crônica. Em estudos sobre a PKDL, pode se constatar

que há maior expressão de IL10 e IL4, além de posterior aumento de secreção de IFN γ ativado pela IL10. A IL12, influencia a produção de IFN γ e sua menor expressão foi associada à perda da resposta linfoproliferativa que é entendida como uma falha na resposta ao antígeno de Leishmania. O IFN γ , por vezes, pode também ter um papel inverso, e potencializar a doença. (BHATTACHARYA et al., 2012; RODRIGUES et al., 2016).

A interleucina 6 (IL6) é uma citocina geralmente considerada pró-inflamatória atuando na resposta ativa durante a LV e a PKDL, mas está relacionada tanto à diferenciação em resposta Th2 como resposta Th1 e, ainda, com diferenciação em células Th17, promovendo um equilíbrio das repostas de células T. (BHATTACHARYA et al., 2012). No entanto, também possui atividade supressora inflamatória e prejudica a ativação de macrófagos por inibir sua capacidade de produção de TNF- α e IL-1. Já foi demonstrada que a produção de IL-6 está associada à progressão da LV, ativação policlonal de células B e hipergamaglobulinemia, além de aumento dos níveis de IFN γ circulante (ANDARGIE et al., 2015; De LIMA, et al., 2006).

O fator de crescimento transformador beta (TGF β) e o fator de necrose tumoral de citocina alfa (TNF α) também estão envolvidos na patologia da LV (SAHA et al.; BHATTACHARYA et al., 2012). Macrófagos infectados produzem TGF- β que está associado à inibição da produção de IFN- γ e inibição da ativação de macrófagos, ou seja, facilitador da progressão da doença e também é apontado como regulador da resposta de células T patógeno-específicas e a tendência destas à apoptose, nas infecções crônicas.

O TNF α e seu receptor TNFR também estão associados à PKDL e à doença renal crônica em pacientes com LV. Esta citocina causa alterações na ZM esplênica, o que altera o tráfico celular, com prejuízo das funções de células T e de CDs. As CDs, com a migração prejudicada, passam a expressar mais moléculas inibitórias e apresentam defeitos nos estágios posteriores da infecção. (RASHMIJ, 2012; BHATTACHARYA et al., 2012).

Na coinfeção LV/HIV, ambas as infecções se potencializam entre si, com evidente facilitação de outras infecções oportunistas. É estimado um aumento de 100 a 2320 vezes no risco de desenvolver LV nos portadores de HIV, bem como de estimular o desenvolvimento de leishmaniose recidivante e resistente a medicamentos em áreas

endêmicas (ANDARGIE, 2015). Há o envolvimento de diferentes células T, com maiores níveis de CXCR4, que é um co-receptor do HIV, e menor contagem de células T. A menor expressão de células TCD8+CD18+CD45RO+ está associada à LV aguda e as células T NK que desempenham um papel regulador na resposta imune à LV, produzem IFNg. (LINDOSO et al., 2018).

O HIV e a *Leishmania* infectam e se multiplicam em macrófagos e células dendríticas, causando uma resposta imune muito deficiente. Já se demonstrou que a infecção por *L. infantum* induz à maior secreção de várias citocinas, dentre elas a IL-1 α , IL-2, IL-6, IL-10 e TNF- α , nessas células, e o aumento na replicação do HIV-1 se deve à IL-6 e ao TNF α , associado a aumento da viremia e redução de células T CD4. O HIV provoca alterações na resposta de macrófagos e CDs, com maior produção de citocinas imunomoduladoras, como o TGF β , o que pode explicar o aumento da replicação da *Leishmania*. Também altera a resposta de células T com redução da produção de IFNg frente ao antígeno de *Leishmania* (ANDARGIE, 2015).

Também já se detectou a imunossenescência, ou seja, a exaustão da resposta imune, com células CD4 e CD8 senescentes, com funções ineficientes e, por isso, incapazes de debelar a infecção. A superestimulação crônica, LV-HIV, induz aceleração da progressão do HIV para AIDS, e maior esgotamento das células envolvidas na resposta imune. Mesmo com tratamento adequado, os coinfectados apresentam aumento do número de linfócitos CD38+CD8+, que indica ativação celular, e também aumento de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL6 e IL17, entre outras.

Observou-se, ainda, que os pacientes coinfectados apresentam aumento de moléculas inibidoras na superfície das células T CD4, o que leva a um desequilíbrio entre as células Treg e a ativação imune, e persistência de uma carga parasitária residual, mesmo com o sucesso do tratamento contra a leishmaniose. Desse modo, os pacientes coinfectados, como já citado aqui, apresentam, muitas vezes, sinais e sintomas incomuns que podem levar ao atraso no diagnóstico de LV, com conseqüente maior gravidade, o que determina maior letalidade e mais recidivas do que nos pacientes não HIV (LINDOSO et al., 2018).

Nas infecções crônicas há a exaustão de células T, que significa uma grande depleção funcional destas células, conseqüente à resposta imune ineficaz, a longo prazo, e aumento da carga de patógenos. Na exaustão, um dos primeiros fenômenos é

a extinção da produção de fatores efetores, como a IL-2, e o TNF- α , mas a produção de IFN- γ e alguma atividade de citotoxicidade, mais resistentes à inativação, permanecem. Células T severamente exauridas podem sofrer deleção por apoptose, que pode resultar de muitas alterações incluindo a expressão de elementos pró e anti- apoptóticos e ausência de resposta a citocinas reguladoras de células T.

Exaustão é um processo gradual e progressivo, que se deve a vários mecanismos que regulam as atividades celulares, expressão de moléculas de adesão, de receptores, e suscetibilidade à apoptose. Variações na intensidade da ativação antigênica, tempo de exposição ao antígeno, disponibilidade de células T CD4, expressão de citocinas e ação de receptores, bem como os níveis localizados de antígeno viral e a compartimentalização das células T podem determinar diferentes graus de exaustão. A figura 5 mostra o esgotamento de células T e a cinética das moléculas envolvidas (YI, J. S. et al.,2010).

As células TCD4, durante a resposta inflamatória, atuam de diversas formas: ativam células dendríticas, secretam quimiocinas e citocinas que orientam células T naive aos órgãos linfoides secundários e células T ativadas para o local da infecção. Estas citocinas, como a IL-2 e a IL-21,estimulam diretamente as células TCD8, e, por isso, qualquer anormalidade nas células TCD4, como exaustão funcional e/ou deleção, que ocorrem em algumas infecções como o HIV-1, irá resultar em ineficiência das células TCD8, como a interrupção na produção de citocinas e respostas ineficientes (YI, J. S. et al., 2010).

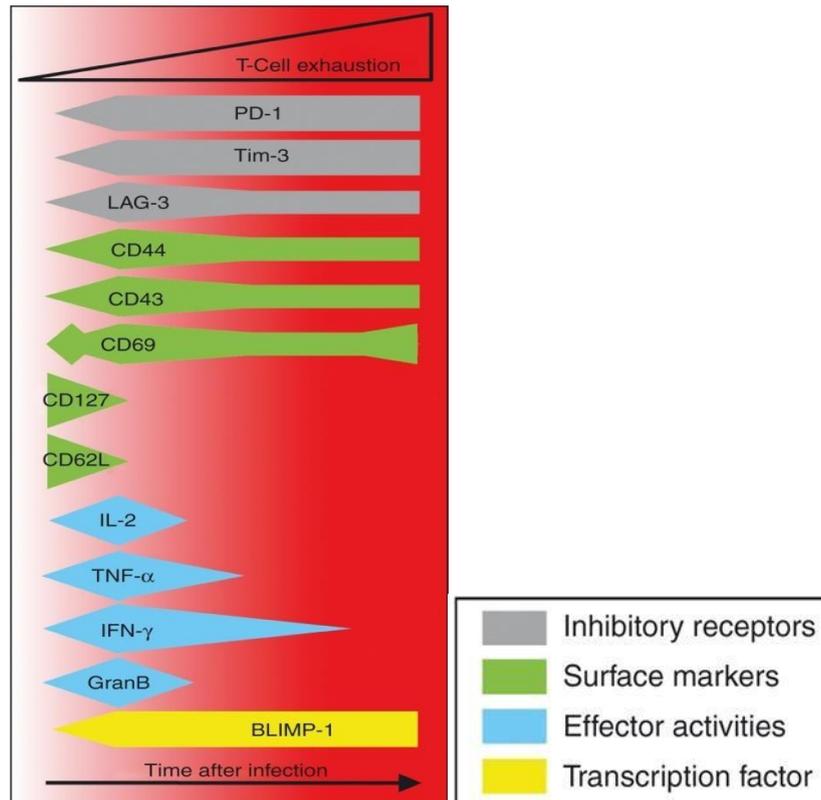


Figura 5. Esgotamento de células T: características, causas e conversão.

Conforme aumenta a exaustão das células T, mais alterações fenotípicas e funcionais ocorrem. As células T exauridas expressam matrizes de moléculas inibidoras e padrões distintos de receptores de citocinas, fatores de transcrição de moléculas efetoras, que distinguem essas células das efetoras convencionais, de memória e T. Estas alterações aqui representadas são apenas um pequeno subconjunto das alterações gerais que se manifestam quando o estado de exaustão se desenvolve. Figura Adaptada (YI, J. S. et al., 2010).

Apesar de enormes avanços no entendimento da estrutura e funções esplênicas, com brilhantes descobertas sobre suas populações celulares e as muitas moléculas envolvidas nas respostas imunes, como na LV, muito ainda se tem a pesquisar e experimentar para que se possa chegar a definições mais precisas e objetivas para se alcançar níveis mais altos em direção à prevenção e cura de muitas doenças que têm o baço como o órgão chave em sua patogênese.

2 JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose Visceral é uma doença que tem alta taxa de morbidade e mortalidade, com alguns casos de não resposta ao tratamento clínico convencional. No Brasil, o número de casos da doença é crescente e a taxa de óbitos chega a 8,8%, mesmo com tratamento.

Este estudo analisa e compara os padrões de citocinas em baços humanos de portadores de LV grave e baços de indivíduos sem LV, detectando as principais diferenças e semelhanças de forma a identificar dados relevantes sobre as alterações das populações celulares e de citocinas que ocorrem no baço com LV, em humanos com formas graves da doença.

Supomos que a desestruturação da polpa branca esplênica está associada com a redistribuição de populações celulares imunocompetentes do baço e, conseqüentemente, à resposta ineficiente a infecções bacterianas e o estabelecimento de inflamação crônica, observados na LV grave, como as já descritas em modelos experimentais com murinos e caninos.

Raros são os estudos sobre tais alterações em baços humanos com LV, especialmente na LV grave, como este onde analisamos algumas populações celulares, com detecção de plasmocitose, hiperplasia e atrofia de polpa branca (PB), e, também, analisamos citocinas cujos resultados podem levar a maiores conhecimentos sobre a resposta imune esplênica.

Deste modo, o presente trabalho visa contribuir para um melhor entendimento das etapas de evolução da doença, avaliar as interações entre o hospedeiro e o parasita e detectar quais são as efetivas respostas celulares frente à infecção em humanos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar se as alterações de fenótipos dos leucócitos e expressão de citocinas presentes em baços humanos com formas graves de LV são relevantes como as que ocorrem em cães, já descritos em trabalhos anteriores.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Definir as alterações estruturais dos compartimentos do baço de pacientes com formas graves de LV;
- ii. Examinar a distribuição de populações celulares entre baços de pacientes sem LV e baços com LV grave;
- iii. Examinar a expressão de citocinas dos baços de pacientes sem LV e com LV grave.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO EM ESTUDO

Este é um estudo de corte transversal, com uma população de conveniência, composta por pacientes com LV persistente ou recidivante, coinfetados ou não com HIV, em tratamento no IDTNP, entre 2008 a 2016, que foram esplenectomizados e aceitaram participar do estudo; e pacientes esplenectomizados após trauma ou após cirurgia de pancreatemia parcial, para o grupo de casos controle.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO NO ESTUDO

Este é um estudo baseado em 10 amostras de baços humanos coletados de esplenectomias realizadas entre 2012 e 2016. Três baços oriundos do Hospital Aliança, Salvador, Bahia, produtos de esplenectomias, duas delas em pacientes pós trauma e uma delas em virtude da técnica cirúrgica, por pancreatemia parcial devida a lesão benigna. Estes três baços serviram como casos-controle.

Outros sete baços foram obtidos do Instituto de Doenças Tropicais Nathan Portela (IDTNP), Teresina, Piauí, e resultaram de esplenectomias em portadores de Leishmaniose Visceral (LV) grave, não responsiva a tratamento clínico convencional. Destes sete baços de portadores de LV, seis são de coinfetados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV).

4.3 DIAGNÓSTICO DE LV

Para o diagnóstico de LV foram observados sinais e sintomas da doença associados a, pelo menos, um teste laboratorial, conforme segue: 1. Demonstração direta do parasita em esfregaço de material de punção aspirativa da medula óssea corado com corante de Giemsa e observado em microscópio ótico no aumento de 1000x; 2. Cultura do material obtido de punção da medula óssea semeado em meio de cultura bifásico de Novy-Mac Neal-Nicole–NNN.

Para a identificação de formas promastigotas no sobrenadante do meio de cultura, foram feitas análises após 2, 3, 7, 14, 21 e 28 dias da semeadura. Foram consideradas negativas as culturas que não apresentaram formas promastigotas após 28 dias. Foram considerados com LV Crônica os indivíduos que apresentaram mais de 6 meses de sinais e sintomas da doença após o término do tratamento específico inicial (anfotericina B lipossomal por 14 dias na dose de 3mg/kg/dia, ou de medicação alternativa) e tiveram a presença de parasitas na medula óssea. Estes procedimentos foram realizados no IDTNP, em Teresina, Piauí.

4.4 DIAGNÓSTICO DE HIV

Para detecção da presença de HIV foram considerados portadores do vírus os pacientes com 2 testes ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) positivos e teste rápido positivo para HIV1/2 (Alere, Livermore, CA, USA) realizado em amostra de sangue obtidas por punção da polpa digital. Estes procedimentos foram realizados no IDTNP, em Teresina, Piauí.

4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA.

4.5.1 Caracterização da Amostra

Foram estudados 7 baços obtidos de esplenectomias de portadores de LV grave, 2 baços de esplenectomias pós-trauma e 1 baço de esplenectomia devida a técnica cirúrgica em pancreatectomia parcial por neoplasia cística benigna. Estes últimos 3 baços referidos, serviram como grupo controle, sem LV.

4.5.2 Preparo das Amostras

Segmentos de baço foram fixados em formalina ácida a 10%, depois foram selecionadas 1 ou 2 secções de cada um, com cerca de 1cm² de área e 0,3 cm de espessura. Estas secções foram processadas com banhos em álcool, xilol e parafina, emblocados em parafina, cortados com 4,0 µm de espessura, colocados em lâminas de vidro (para microscopia), reservadas em estufa por cerca de duas horas a

58°C. Depois foram coradas com hematoxilina e eosina e montadas recobertas com bálsamo do Canadá e com lamínula de vidro, para serem observadas ao microscópio óptico convencional.

4.5.3 Análise Histológica

Plasmócitos, porcentagem de PB - a análise foi focada nas alterações do tecido linfoide esplênico, a polpa branca (PB), e na contagem de plasmócitos da polpa vermelha (PV), realizada por dois patologistas (WLCS e SSM).

4.5.4 Classificação dos Tipos de Baço

Para definição das alterações da PB esplênica, foi utilizada a classificação em três tipos de acordo com a organização histoarquitetural do baço, baseada em critérios definidos por Santana et al. (2008), assim descritos: baço tipo 1 – bem organizado, com boa definição das regiões da PB: centro germinativo (CG), zona do manto, zona marginal (ZM) e bainha periarteriolar (PALS); baço tipo 2 – pouco desorganizado, com apagamento dos limites entre as regiões da PB; baço tipo 3 – moderadamente ou muito desorganizado, com pouca ou nenhuma definição dos limites e/ou regiões da PB.

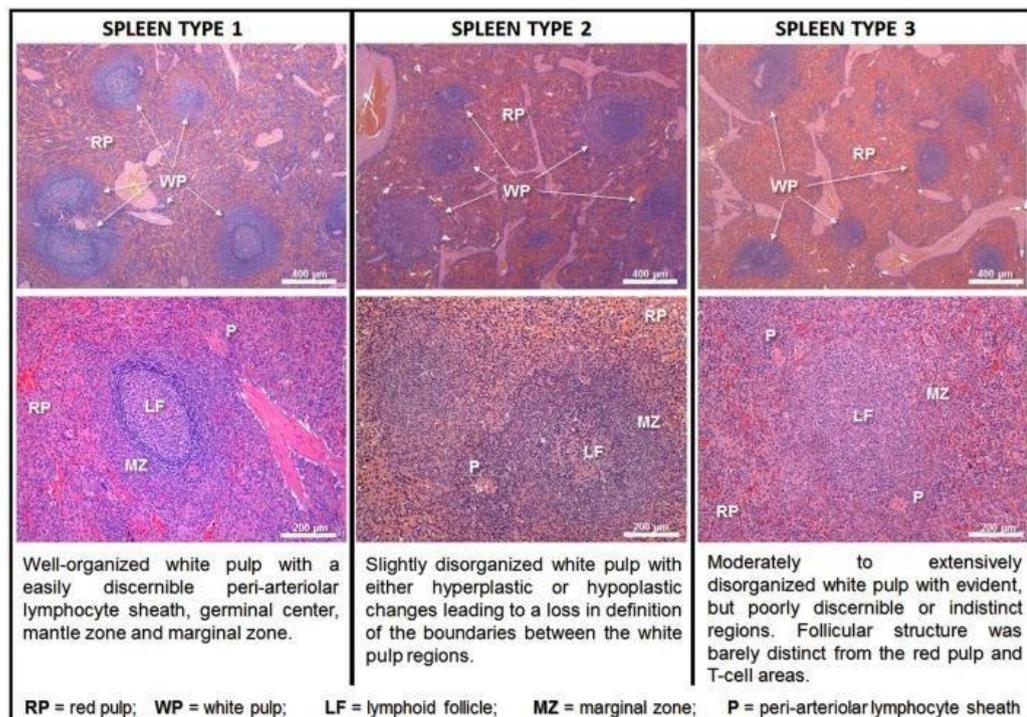


Figura 6. Tipos de Baço

Figura Adaptada (HERMIDA et al., 2018)

4.6 IMUNOHISTOQUÍMICA

4.6.1 Captura das Imagens Obtidas das Lâminas com Secções de Baço

Imagens das secções de baços tratados com os diferentes anticorpos foram capturadas em uma resolução de 1.280 x 1.024 pixels usando um sistema de câmera de vídeo digital Evolution LC (Media Cybernetics, Estados Unidos), acoplado a um microscópio óptico (CX41, Olympus, Japão). A contagem das células marcadas (positivas) e o valor de cada área selecionada (dez áreas /campos da lâmina com cada anticorpo) foram adquiridos com o software Image Pro Plus versão 7.0 (Media Cybernetics, Estados Unidos).

4.6.2 Imunofenotipagem de Células e Mensuração da Expressão de Citocinas e outras Moléculas nas Amostras de Baço

Foram colocados cortes de baço com 4µm de espessura, em lâminas tratadas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, Estados Unidos); estas secções foram desparafinizadas com xileno, reidratadas com concentrações decrescentes de etanol e lavadas com hidróxido de amônio a 10% e etanol a 70% por 15 minutos, para remoção do pigmento de formaldeído. Para bloqueio da peroxidase endógena, as secções de tecido esplênico foram tratadas com peróxido de hidrogênio a 0,5% em metanol, por 30 minutos. A etapa seguinte foi a recuperação antigênica com 0,1% de tripsina durante 30 minutos. Para bloqueio de reações inespecíficas, as lâminas foram incubadas com soro de coelho a 5%, por 30 minutos, diluído em PBS (solução salina tamponada com fosfato com NaCl 15 mM e fosfato de sódio 10 mM, pH 7,2). Durante 30 minutos, as lâminas foram mantidas incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos.

Para controle negativo, as secções de baço foram tratadas com tampão ou com imunoglobulina do mesmo isotipo de uma especificidade diferente a partir do anticorpo testado. Na etapa seguinte, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas durante 30 minutos com anticorpo conjugado com peroxidase anti-cabra de coelho (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO United States). Após as reações de peroxidase, as secções foram contra coradas com hematoxilina de Harrys. A análise da imunomarcação foi feita por microscopia ótica, sendo considerado positivo o que foi marcado na cor marrom, no citoplasma, núcleo e/ou suas respectivas membranas. Detalhes de titulação, clone e fabricante dos anticorpos utilizados foram definidos previamente e estão sumarizados na tabela 1.

Tabela 1. Relação dos anticorpos utilizados.

Marca/código	Sistema de revelação	Marca
IL1 beta	RD Systems/AF201NA	Polink/GBI
IFN gama	RD Systems/MAB285	Polink/GBI
Caspase 3	Biocare/CP229	Polink/GBI
IL4	RD Systems/AF204NA	Polink/GBI
IL6	Proteintech/21865-1	Polink/GBI
IL10	RD Systems/AF217-NA	Polink/GBI
IL17	RD Systems/AF317-NA	Polink/GBI
TGF beta	ABCAM/ab66043	Reveal/Spring
TNF alfa	Biorbyt/orb18076	Polink/GBI
Foxp3	ABCAM/ab99963	Polink/GBI
CD 3	Policlonal rabbit	Dako
CD 4	Clone 4B12	Dako

4.7 MORFOMETRIA

Todas as lâminas deste estudo foram escaneadas em Scanner de lâminas Olympus VS-100, em objetiva de 20 vezes e, para a visualização destas e separação dos campos da PB e da PV a serem estudados, foram utilizados os programas Olyvia em conjunto com o Image Pró plus 7.0 (Media Cybernetics, Estados Unidos), com ampliação da imagem a 100%.

4.7.1 Contagem de Plasmócitos

A contagem do número de plasmócitos na PV foi realizada pelos dois patologistas através da análise de 10 campos da PV, o primeiro deles sendo o de maior número de plasmócitos e 4 outros campos em torno a este primeiro campo. Outros 5 campos foram escolhidos dessa mesma maneira, totalizando 10 campos. A contagem foi feita através do programa Image Pró plus 7.0 (Media Cybernetics, Estados Unidos), bem como a soma dos valores obtidos dos dez campos, para cada um dos dez baços estudados.

4.7.2 Quantificação do Percentual de PB em Relação à PV

A quantificação do percentual da área de PB foi feita através do Programa Image Pró plus 7.0(Media Cybernetics, Estados Unidos); dos cinco campos selecionados de PB de cada amostra de baço, foi feita a soma das medidas das áreas dos 5 maiores folículos linfoides, com as respectivas PALS e ZM, e o valor obtido foi dividido pela área total de cada um dos cinco campos.

4.7.3 Contagem das Células Marcadas com Anticorpos

A contagem de células marcadas para os anticorpos discriminados, na polpa vermelha e na polpa branca, foi morfometricamente estimada utilizando o software Imagem Pro Plus versão 7.0 (Media Cybernetics, Estados Unidos).

Para a contagem das células marcadas (positivas), das lâminas tratadas com cada anticorpo, foram selecionadas cinco áreas não sobrepostas da PV – quando aplicável, escolhendo-se uma área com maior quantidade de células marcadas pelo anticorpo e outras quatro áreas adjacentes, à direita, esquerda, superior e inferiormente à primeira área; em alguns casos, com poucas células positivas para o anticorpo, procurou-se selecionar áreas com tais células presentes. Na PB, foram selecionados os cinco maiores folículos, na maioria dos casos. Em poucos casos, onde a PB se apresentava muito atrófica e/ou desorganizada e de difícil delimitação, foram selecionadas áreas com maior representação da PB.

A contagem de células positivas marcadas por anticorpos, foi contabilizada para obtenção da densidade celular em cada um dos 10 campos, 5 da polpa vermelha e 5 da polpa branca; foi feita pelo cálculo da razão entre o número de células marcadas (positivas) em cada campo e a medida da área total de cada campo, em mm².

4.7.4 Dados Clínicos dos Pacientes com LV

Os dados clínicos dos pacientes com LV foram coletados dos prontuários do IDTNP. Foram selecionados os dados mais relevantes relacionados à LV e HIV, conforme tabela 2, quer seja: Palidez/anemia, Perda de peso, Astenia, Tosse, Febre, Desnutrição, Diarréia, Esplenomegalia, Hepatomegalia, Sangramento, Icterícia, Leucopenia, Trombocitopenia, Hemograma – hemoglobina, Creatinina, Carga viral, Contagem de CD4/mm³, Bilirrubina, TGO, TGP; tempo de diagnóstico – LV, HIV, gênero, idade.

4.8 ANÁLISE E EXPRESSÃO DE RESULTADOS

A análise dos dados foi feita através dos programas GraphPad Prism 5.02 e Excel. Para expressar os resultados foram utilizados valores absolutos ou relativos (percentuais) e dados descritivos dispostos em gráficos e tabelas. Em virtude das características da amostra, com pequena representação de casos e controles, este estudo tem um caráter descritivo, para geração e confirmação de hipóteses, mas sem permitir estatística analítica.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS

Na tabela 2, estão dispostos os parâmetros clínicos e laboratoriais considerados importantes na coinfeção LV-HIV, os quais foram coletados dos pacientes portadores de LV esplenectomizados no IDTNP. Dentre os parâmetros observados, destacam-se semelhanças e diferenças entre os 7 baços analisados:

- Sexo: predomínio do sexo masculino; seis do sexo masculino e 1 feminino;
- Tempo de diagnóstico de LV: o paciente sem HIV tem o menor tempo de diagnóstico de LV; há predomínio de maior tempo de doença entre os pacientes com baços tipo 2 e tipo 3 – os que tem alterações arquiteturais;
- Tempo de diagnóstico de HIV: um dos pacientes com baço tipo 1 não é coinfestado com HIV; há predomínio de maior tempo de doença entre os pacientes com baços tipo 2 e tipo 3;
- Sintomas:
 - tosse: três dos sete pacientes apresentaram este sintoma, cada um com um tipo de baço;
 - febre: três dos sete pacientes apresentaram este sintoma, cada um com um tipo de baço;
 - diarreia: três dos sete pacientes apresentaram este sintoma, cada um com um tipo de baço;
- Sinais:
 - hepatomegalia: apenas o paciente não coinfestado não apresentou este sinal; não houve correlação direta entre o valor mensurado e a gravidade da doença, que em nosso estudo foi baseada no critério de tipos de baço, tendo em vista que maior desorganização do baço está associada à maior gravidade da LV;
 - esplenomegalia: presente em todos os pacientes, e também sem correlação direta entre o valor mensurado e a gravidade da doença, que em nosso estudo foi baseada no critério de tipos de baço, tendo em vista que maior desorganização do baço está associada a maior gravidade da LV;

- Peso do baço: não houve correlação entre o peso do baço e a gravidade da LV; o paciente sem HIV, com baço tipo 1, apresentou uma grande esplenomegalia com baço pesando 1066g, enquanto que um dos pacientes com baço tipo 3, apresentou baço com 600g;
- Carga viral: todos os pacientes coinfetados apresentavam carga viral indetectável;
- Contagem de CD4 inicial e pré-cirúrgica: a contagem inicial (da data do internamento) foi realizada em apenas 4 dos 6 pacientes coinfetados; em 2 pacientes (um com baço tipo 1 e outro com baço tipo 2), houve aumento da contagem destas células e em 2 pacientes (um com baço tipo 1 e outro com baço tipo 3) houve redução do número de células CD4;
- Contagem de CD8 inicial e pré-cirúrgica: estas contagens foram realizadas em 4 dos seis coinfetados; em 2 pacientes (um com baço tipo 1 e outro com baço tipo 3) houve aumento do número de células CD8, e em 2 pacientes (um com baço tipo 1 e outro com baço tipo 3) a contagem de células TCD8 teve redução.
- Contagem da proporção CD4/CD8 inicial e pré cirúrgica: esta mensuração foi realizada em 4 dos seis coinfetados; em 3 pacientes (dois com baço tipo 1 e um com baço tipo 2) houve aumento dessa proporção e apenas um paciente, com baço tipo 3, apresentou redução desta proporção;
- Outros achados:
 - PKDL: dois pacientes coinfetados apresentaram esta dermatite, sendo um com baço tipo 1 e um com baço tipo 3;
 - Tuberculose pulmonar: um paciente com baço tipo 1, dentre os sete pacientes (seis coinfetados) apresentou tuberculose pulmonar, que foi tratada e resolvida;
 - Óbito: dos sete pacientes, seis deles coinfetados, três tiveram êxito letal; um paciente com baço tipo 1, teve óbito por hemorragia digestiva alta, após abandono do tratamento; outro óbito ocorreu em paciente com baço tipo 2, que abandonou o tratamento e, segundo relato de familiares, evoluiu para infecção generalizada a partir de ferimento no pé; o outro óbito foi em paciente com baço tipo 3, que apresentou o maior baço dos 7 pacientes com LV (1.882g), e que foi acometido por Pneumocistose que evoluiu para insuficiência respiratória e óbito. A Pneumocistose comumente acomete pacientes com AIDS.

Tabela 2: Parâmetros clínicos dos pacientes com LV

PARÂMETROS	PACIENTES						
	BAÇO TIPO 1		BAÇO TIPO 2		BAÇO TIPO 3		
	JFA	FSF	SMGB	PCN	RNCC	FAAR	FVMM
IDADE (anos)	55	36	45	58	37	33	51
SEXO	masculino	masculino	feminino	masculino	masculino	masculino	masculino
TPO DIAG LV anos	1,7	2	2,8	7	2	5	7
TPO DIAG HIV anos	sem HIV	2	7	11 anos	10	9	8
ASTENIA	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
PERDA DE PESO	Não	5 Kg/0,5m	10kg/12m	31kg/6m	sim	15kg/24m	Sim
PALIDEZ	+/4+	2+/4+	2+/4+	3+/4+	Sim	sim	não
TOSSE	não	não	sim	sim	não	sim	não
FEBRE	não	não	sim	sim	não	sim	não
DIARREIA	não	sim	não	sim	não	sim	não
HEPATOMEGA cm	não	2	4	3	6	4	5
ESPLENOMEGA cm	12	8	4	8	8	18	7
SANGRAMENTO	não	não	sangramento nasal	não	não	hemorragia pós cirurgia	não
ICTERÍCIA	não	não	não	não	não	não	-
PESO DO BAÇO (g)	1.066 g	480g	742g	1042g	680	1882g	600g
OUTROS	-	-	TB pulmonar; surto psicót; PKDL	-	-	reabordado	PKDL
ÓBITO	não	não	Janeiro de 2017 Abandonou TTO; Óbito (SIC) por hemorragia digestiva alta	Março de 2015 Ferimento no pé que evoluiu para infecção generalizada.	não	18/05/2016 Pneumocistose com insuficiência respiratória	não
CAUSA DO ÓBITO	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 3: Parâmetros laboratoriais dos pacientes com LV

PARÂMETROS	PACIENTES									
	BAÇO TIPO 1			BAÇO TIPO 2			BAÇO TIPO 3			
	JFA	FSF	SMGB	PCN	RNCC	FAAR	FVMM			
HEMOGLOBINA(g/dl)	8,7	8,7	9,1	7,8	9,6	7,8	7,4			
HEMATÓCRITO (%)	28	28	29	23	32	25,0	23,7			
LEUCOCITOS	1090	2600	1500	1800	3100	4.840	2.540			
PLAQUETAS	155000	196000	84900	24000	247.000	203.000	93.000			
CARGA VIRAL inicial	sem HIV	indetectável	441	<50 (2006)	< 40 cópias	< 50 cópias	< 50 cópias			
CARGA VIRAL pré cirúrgica	sem HIV	não detectado	não detectado	não detectado	indetectável	< 50 cópias	não detectado			
CD4/mm³ inicial	sem HIV	106	55	54 (2004)	-	100	-			
CD4/mm³ pré-cirúrgica	sem HIV	73 céls/uL	122 céls/uL	180 céls/uL	69 céls/uL	50	93 células/uL			
CD8/mm³ inicial	sem HIV	476	284	656	-	516	-			
CD8/mm³ pré-cirúrgica	sem HIV	266	524	1443	-	344	-			
CD4/CD8 inicial	sem HIV	0,22	0,19	0,08	-	0,19	-			
CD4/CD8 pré-cirurg	sem HIV	0,27	0,23	0,12	-	0,14	-			
BILIRRUBINA DIR	0,58	0,9	0,45	0,8	-	-	-			
BILIRRUBINA INDIR	0,54	1,3	0,22	0,2	-	-	-			
TGO	18	13	24	-	-	-	-			
TGP	19	6	20	-	-	-	-			
CREATININA	1,1	1,5	1,8	-	-	-	-			

5.2 CONTAGEM DE PLASMÓCITOS NA PV

A contagem de plasmócitos em dez campos da PV dos dez baços apontou importante plasmocitose nos baços de portadores de LV, conforme demonstrado na figura 7e 8.

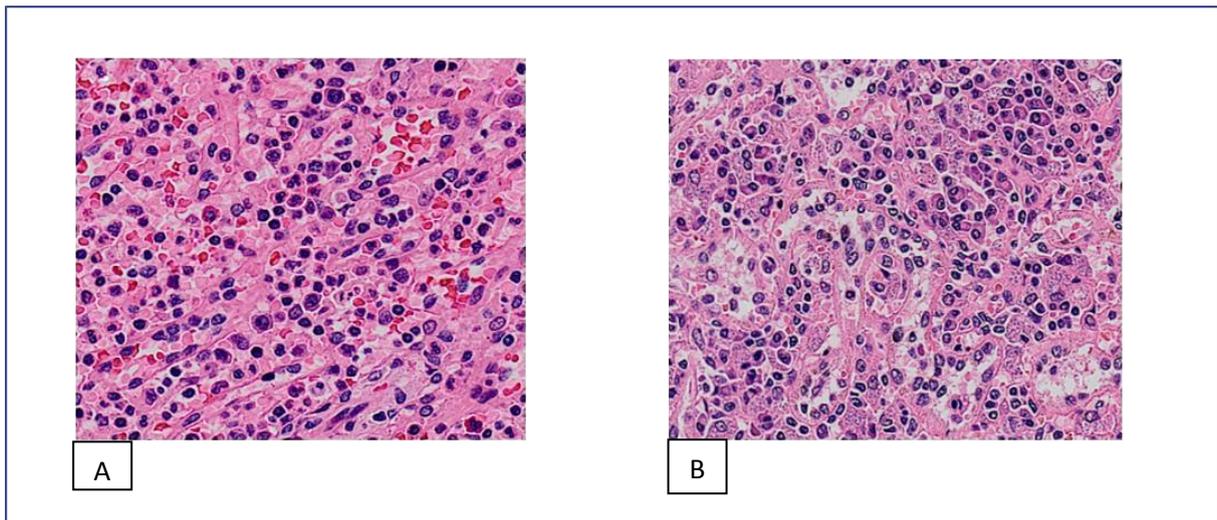


Figura 7. A - baço do grupo controle, sem LV; B - baço com LV mostra evidente plasmocitose.

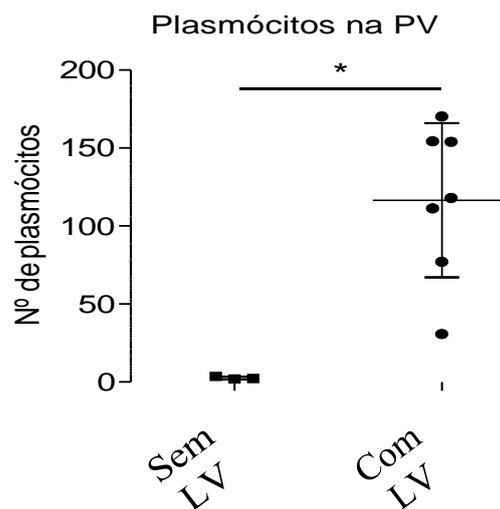


Figura 8. Contagem de plasmócitos em baços de pacientes Com e Sem LV.

A contagem de plasmócitos é substancialmente maior no grupo de baços com LV, à direita, em comparação com os baços sem LV.

No próximo gráfico (Figura 9) é demonstrada a contagem dos dez campos de PV em cada indivíduo, onde há evidente plasmocitose nos portadores de LV, em comparação com os baços de indivíduos sem LV, que são do grupo controle.

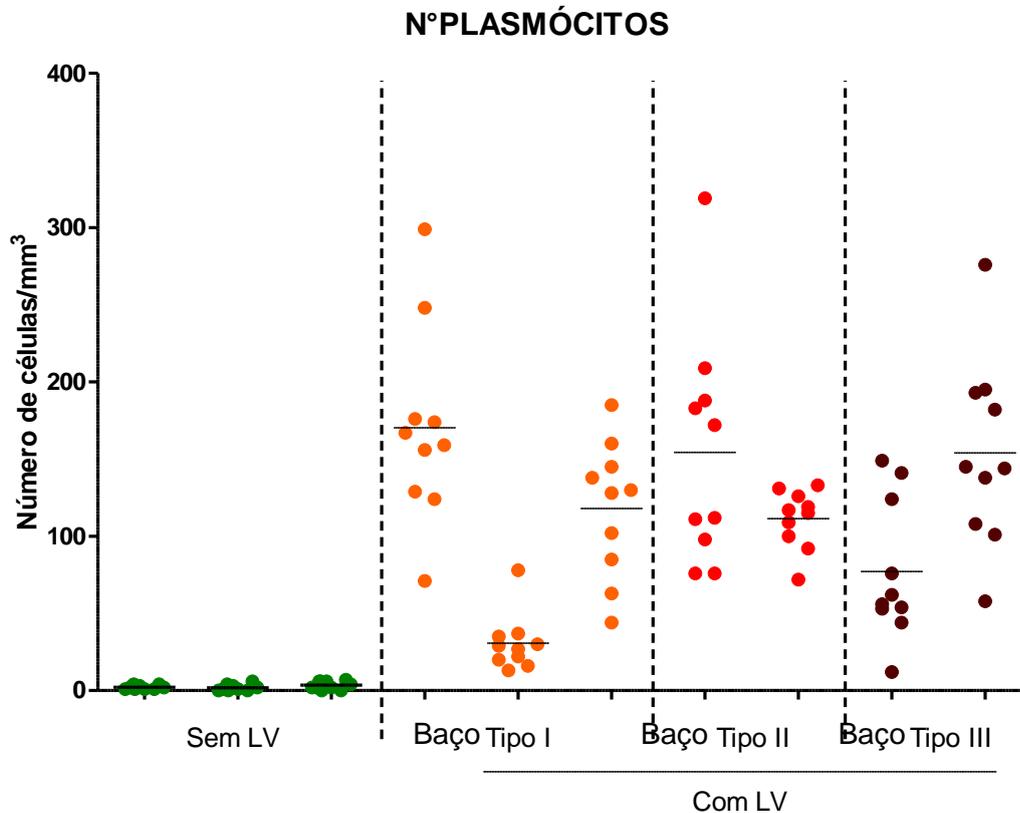


Figura 9. Contagem de Plasmócitos nos baços de cada indivíduo correspondente aos grupos formados.

Os três da esquerda representam os baços sem LV (grupo controle) e os sete à direita são dos baços com LV.

5.3 PORCENTAGEM DA ÁREA DE PB EM RELAÇÃO À ÁREA DE PV

A percentagem de PB em relação à PV teve tendência à redução nos baços de portadores de baços do tipo 2 e maior redução, ainda, nos baços tipo 3. Houve, ainda, um aparente notável aumento da percentagem de PB num dos baços do tipo 1, ou seja, baço organizado, mas com evidente hiperplasia da PB. Na figura 10 pode-se

observar a distribuição da porcentagem de PB nos dez baços estudados, além de uma tendência a atrofia nos baços com LV, em comparação com os baços sem LV.

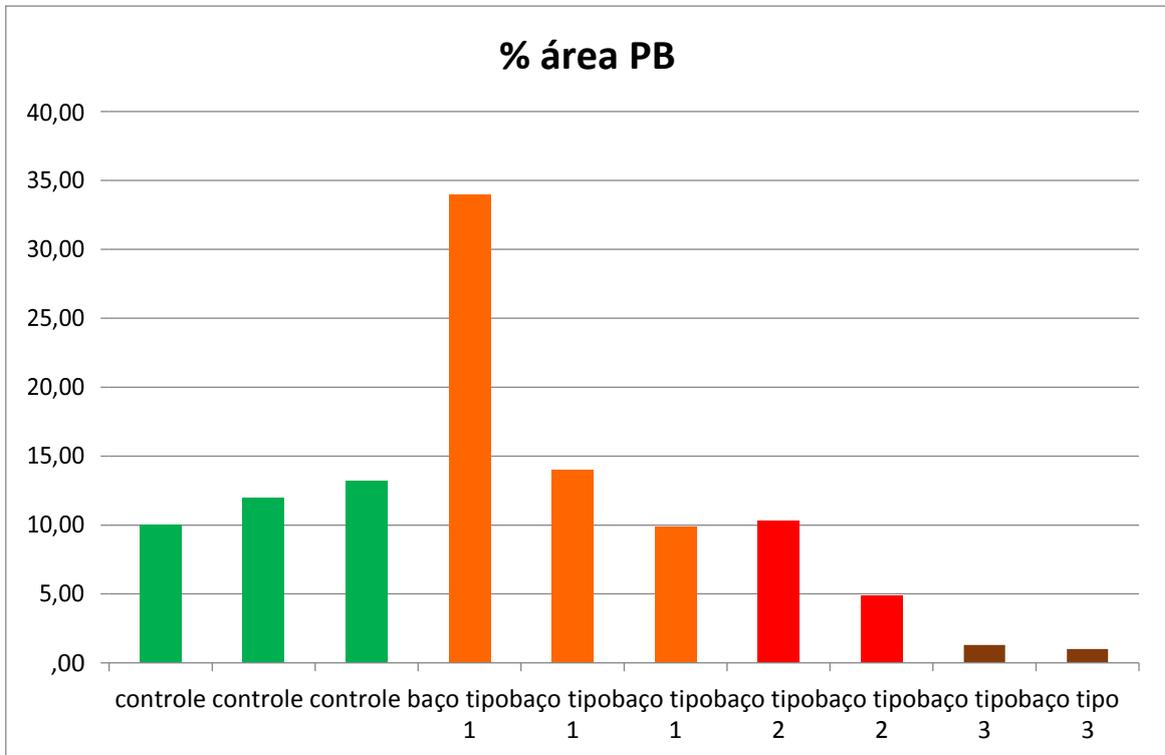


Figura 10. Percentual De PB/PV.

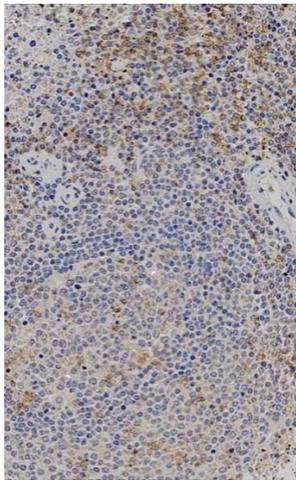
O grupo controle, sem LV, à esquerda, e o grupo de baços com LV, à direita, este com tendência à atrofia da PB na maioria dos baços.

5.4 DISTRIBUIÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES E DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS E OUTRAS MOLÉCULAS NA PB E NA PV ESPLÊNICAS

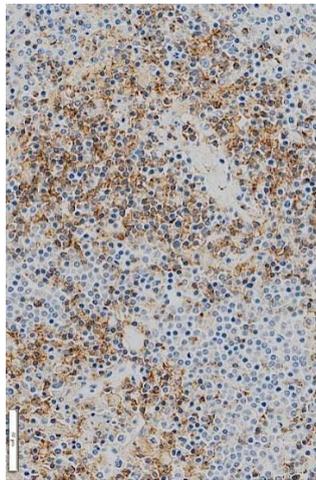
A marcação com os anticorpos já referidos na metodologia, evidenciou diferenças e similaridades nas contagens entre os grupos e, também, entre baços do mesmo grupo

5.4.1 Análise Qualitativa das Populações Celulares Esplênicas

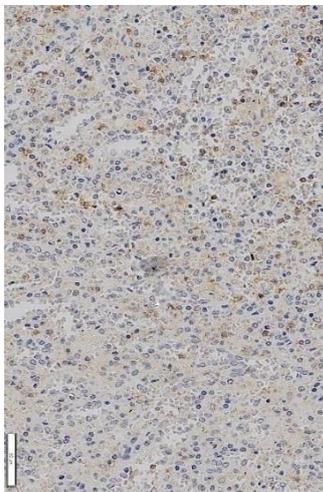
Os achados mais relevantes foram observados com os anticorpos nas marcações abaixo descritas e ilustradas nas figuras:



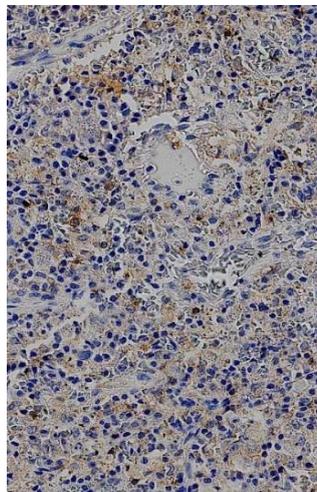
CD4 PB - sem LV



CD4 PB - com LV



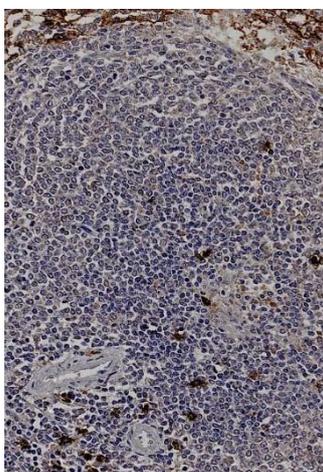
CD4 PV - sem LV



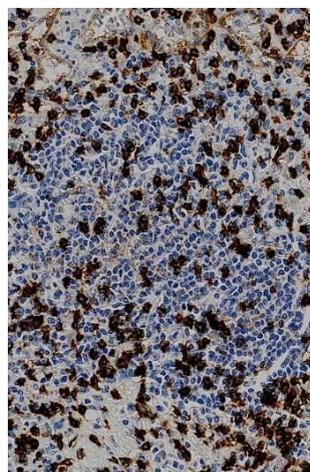
CD4 PV - com LV

Figura 11 - marcação com anticorpos anti-CD4.

Células CD4+ (linfócitos T) – algumas células marcadas no centro germinativo e zona marginal, isoladas e em pequenos grupos; escassas células na zona do manto. Raras na PV;



CD8 PB - sem LV



CD8 PB - com LV

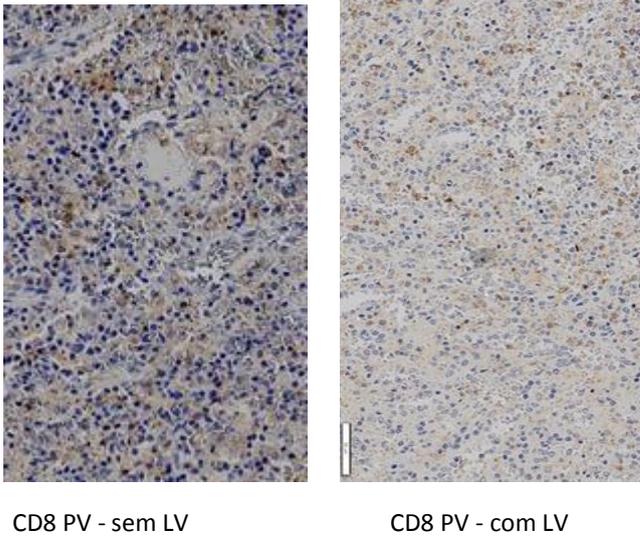
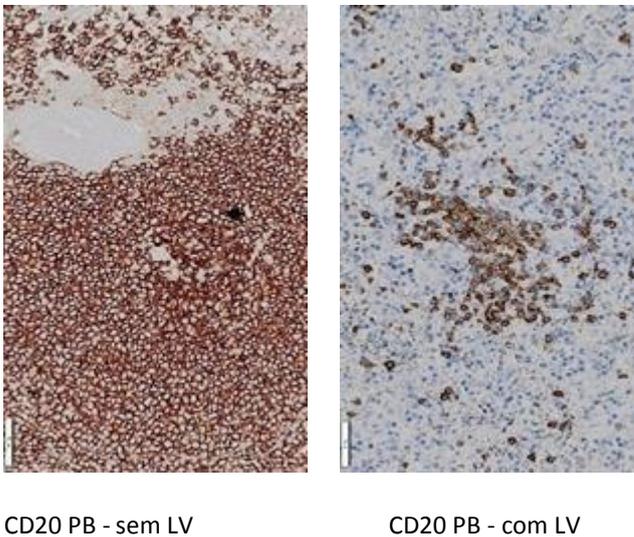


Figura 12 - marcação com anticorpos anti-CD8.

- Células CD8+ (linfócitos T) – escassas células marcadas na PALS e nos CG, menor número destas células na ZM; muitas células isoladas na PV. Este anticorpo marca, também, células endoteliais dos sinusoides esplênicos;

▪



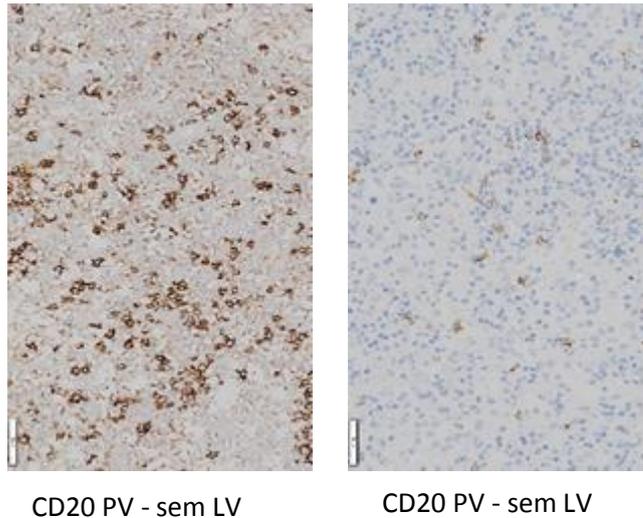


Figura 13 - marcação com anticorpos anti-CD20.

- Células CD20+ (linfócitos B) – pequenos grupos ou células isoladas, positivas, frequentes nos folículos da PB e esparsas na PV.

5.4.2 Análise Qualitativa da Expressão de Citocinas e Outras Moléculas

Em análise:

- TNF α – células isoladas, na ZM e raras no CG e PALS. Na PV, células marcadas em pequenos grupos;
- Foxp3 – células isoladas ou em pequenos grupos, predominantemente no CG, e também presentes na PALS e ZM; células em pequenos grupos na PV;
- Caspase 3 – células marcadas isoladas ou em esparsos e pequenos grupos no CG e na PV;
- IL10 – esparsas células isoladas e em pequenos grupos na ZM, PALS e PV;
- IL17 – escassas células marcadas, isoladas, na ZM da PB e na PV.

5.4.3 Análise Quantitativa das Populações Celulares Esplênicas

Na PB, ressaltam-se alterações nas populações celulares, com tendência à redução do número de células com fenótipo CD4+ e tendência ao aumento do número de células com fenótipo CD8+, nos baços tipo 3. Na PV também houve alterações nas populações celulares com tendência à redução do número de células CD4+ nos baços com LV, tipos 1, 2 e 3, enquanto que as células CD8+ apresentaram tendência a aumento do número, nos baços tipos 2 e 3. As células de fenótipo CD20+ apresentaram tendência à diminuição do percentual nos baços tipos 2 e 3.

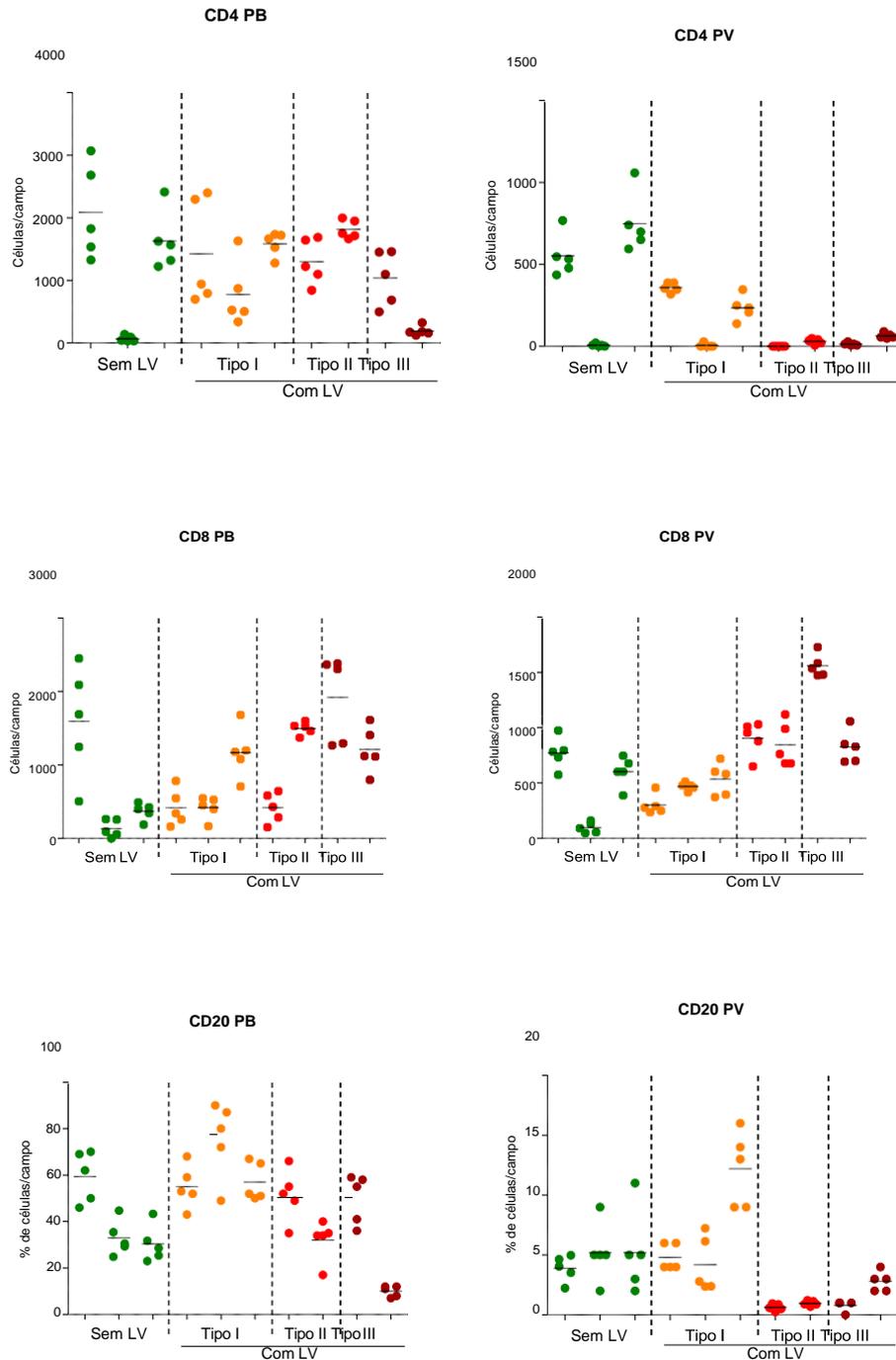


Figura 14 - gráficos com contagens de células marcadas com anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD20.

5.4.4 Análise Quantitativa da Expressão de Citocinas e Outras Moléculas

Na PB, a expressão de algumas citocinas revelou achados importantes, como a expressão da Interleucina 17 (IL-17) que se mostrou diminuída nos baços tipos 2 e 3. A tendência da expressão de Foxp3, um fator de transcrição, revelou-se maior em baços tipos 1 e 3 e menor nos baços tipo 2. Na PV, quanto à análise da expressão das citocinas, destaca-se a contagem de interleucina 10 (IL10) que tendeu à redução nos

baços com LV dos três tipos, 1, 2 e 3. E a expressão de IL-17 apresentou tendência à redução nos baços com LV, principalmente nos baços tipo 2.

As tabelas 4 e 5 mostram os números de células marcadas, e as médias, na PB e na PV, respectivamente. Para a mensuração das células marcadas com os anticorpos anti CD-20 e anti-CD-79, foi captada a porcentagem de células marcadas, de acordo com a cor, com o programa Image pró-plus 7.0. Nas demais marcações a contagem foi feita célula a célula, com o mesmo programa.

Tabela 4 - Contagem das células marcadas com anticorpos na PB esplênica.

MARC/PAC	CD3	CD4	CD8	CD20 %	CD68	CD79 %	CASPASE	FOXP3	IFN G	TGF B	TNF A	IL-1b	IL-4	IL-6	IL-10	IL-17
controle PB	946,80	329,5	199,75	62,83	18	79,0575	0	1	0,8	0	8,4	0	0	0,6	14,4	18,25
controle PB	171	9,8	19,2	32,94	71,8	37	1,4	2,8	0,6	0	5,8	0	0	2	1,4	85
controle PB	200,8	235,8	53,4	71,03	15,6	28,096	4,25	3	0	0	3	0	2,8	2,2	0	25,6
tipo 1 PB	386,4	206,2	60,2	55	54,2	63	21,6	12,6	0	9,4	7	5,2	1,4	3	4,6	7,6
tipo 1 PB	452,8	112	60,4	75,63	40,8	19,8	11,4	28,8	13,4	10,8	15,8	0	1,2	0	0	15,2
tipo 1 PB	255,6	229,4	168,8	57	37,2	56	3,8	0	28,8	0	102,8	0	0	69,4	0	29,2
tipo 2 PB	589,6	188	60,4	51,502	96,4	23,074	10	91,2	0	50,8	47,6	0	0	3,4	0	1,4
tipo 2 PB	499,4	262,6	216,2	32	61,6	56,148	10,6	0	0,6	0	28,8	0	0	33	0,8	0
tipo 3 PB	457,8	150,2	277,8	49,87	68	41,6	1	0,4	0	0	62,8	2,8	0	7,2	0	7
tipo 3 PB	356,4	27,8	174,8	10	50,8	19	1,4	177,4	77,6	133,6	146,4	1,2	3,4	6	13,8	0,8
MÉD CONTR	439,53	191,7	90,78	55,60	35,13	48,05	1,88	2,27	0,47	0,00	5,73	0,00	0,93	1,60	5,27	42,95
MÉD TIPO 1	364,93	182,53	96,47	62,54	44,07	46,27	12,27	13,80	14,07	6,73	41,87	1,73	0,87	24,13	1,53	17,33
MÉD TIPO 2	544,5	225,3	138,3	41,751	79	39,611	10,3	0	0,3	25,4	38,2	0	0	18,2	0,4	0,7
MÉD TIPO 3	407,1	89	226,3	29,935	59,4	30,3	1,2	88,9	38,8	66,8	104,6	2	1,7	6,6	6,9	3,9

Tabela 5 - Contagem das células marcadas com anticorpos na PV esplênica.

MARC/PA	CD3	CD4	CD8	CD20 %	CD68	CD79 %	CASPASE	FOXP3	IFN G	TGF B	TNF A	IL-1b	IL-4	IL-6	IL-10	IL-17
controle PB	224,8	79,8	111,6	3,886	33	5,212	0	2,2	1	0	20	0	0	14	50,4	69,4
controle PB	161,6	1	14	5,04	192	0,0074	3,6	1	0,8	0	15	0	0	1,8	14,4	144,4
controle PB	144,2	108,2	87,2	5,324	98	3,928	7,4	0,6	0	0	13,8	0	10,4	3	0	59,6
tipo 1 PB	150,2	51,8	43,6	4,8	165,2	11,6	4,6	90,2	14	33,4	78,4	0	2,2	1,4	5,4	5,4
tipo 1 PB	289,6	0,8	67,6	4,184	159,8	0,05	0,4	90,4	31,8	28,8	70,4	0	0,2	2,4	0	39,6
tipo 1 PB	191,2	34	77,2	12,2	110,6	9,2	3,6	0	41,4	0	68	0	0	70,2	0	20,2
tipo 2 PB	156,8	0	130,8	0,634	199,2	4,43	2,8	30,2	0	3,6	50,8	0	0,4	3,8	0	3,8
tipo 2 PB	150,6	4,4	122,2	0,964	66,8	2,48	8,8	0	0,6	0	29,6	0	0	13,8	0	0,4
tipo 3 PB	343,6	2	225,6	0,8	155,2	2,4	0,6	0	0	0	13	0,4	0	7,8	0	6,4
tipo 3 PB	322,6	9,2	119,4	2,8	105,4	6	1	83	53	108,4	153,2	5	4,8	1,4	19,4	1,8
MÉD CONTR	176,87	63,00	70,93	4,75	107,67	3,05	5,50	1,27	0,60	0,00	16,27	0,00	3,47	6,27	21,60	91,13
MÉD TIPO 1	210,33	28,87	62,80	7,06	145,20	6,95	2,87	60,20	36,60	14,27	57,27	39,20	0,07	24,93	0,47	21,73
MÉD TIPO 2	153,7	2,2	126,5	0,799	133	3,455	5,8	15,1	0,3	1,8	40,2	0	0,2	8,8	0	2,1
MÉD TIPO 3	333,1	5,6	172,5	1,8	130,3	4,2	0,8	41,5	26,5	54,2	83,1	2,7	2,4	4,6	9,7	4,1

As figuras 15 e 16 representam gráficos de calor (Heatmap), com expressão dos anticorpos estudados neste trabalho e que abrange a distribuição de células e citocinas e outras moléculas. No heatmap da PV, foi incluída, também, a contagem de

plasmócitos. Destacam-se anticorpos com marcações mais relevantes, na PB e na PV, tanto das populações celulares como da expressão de citocinas e outras moléculas.

Foram observadas as seguintes tendências nas expressões dos anticorpos: na PB - redução de CD4+ e aumento de CD8+ nos baços tipo 3; menor expressão de IL17 em baços tipo2 e tipo 3; menor expressão de IL10 nos baços tipo 2 e tipo3; maior expressão de FoxP3 em baços tipo 1 e tipo 3 e menor expressão de FoxP3 em baços tipo 2;aumento de TNFα nos baços com; Caspase3 mostra tendência a aumento nos baços com LV tipos 1 e 2. Na PV: redução de CD4+ nos baços com LV; aumento de CD8+ nos baços tipo 2 e tipo 3; redução do número de célulasCD20+ nos baços tipo 2 e tipo 3; menor expressão de IL10 e de IL17 nos baços com LV. A contagem de plasmócitos foi maior nos baços com LV.

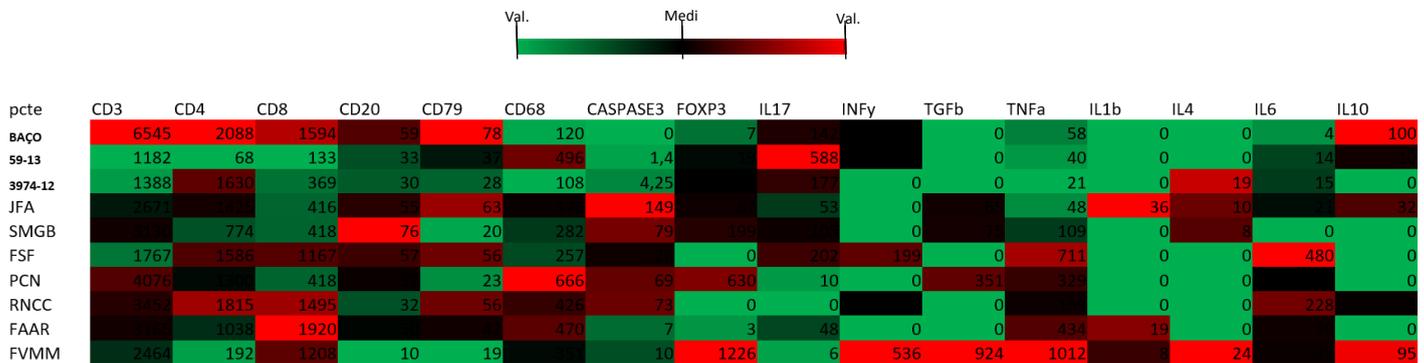


Figura 15. PB - IHQ com anticorpos de populações celulares, citocinas e outras moléculas. Redução de CD4+ e aumento de CD8+ em t3; menor expressão de IL17 em t2 e t3; maior expressão de FoxP3 em t1 e t3 e menor expressão de FoxP3 em t2; aumento de TNFα nos baços com LV (t1, t2 e t3); Caspase 3 mostra tendência a aumento nos baços com LV tipos 1 e 2. (t1, t2 e t3 = baços com LV tipos 1, 2 e 3).

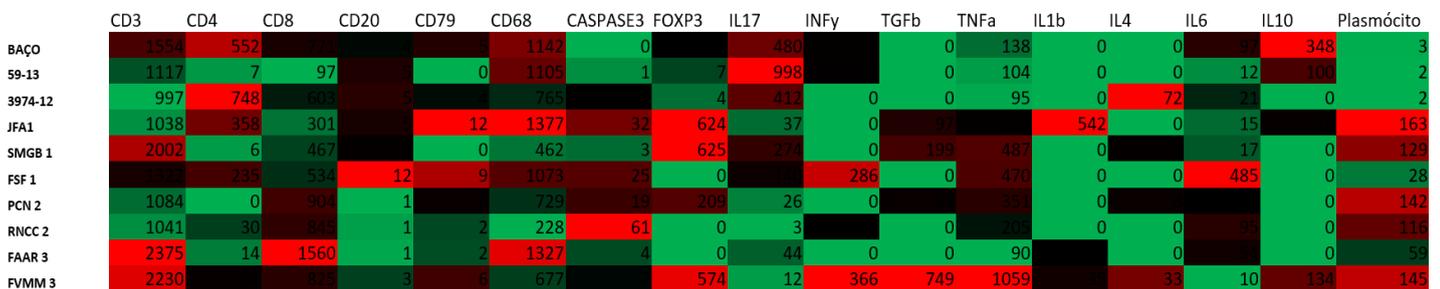


Figura 16. PV – IHQ com anticorpos de populações celulares, citocinas e outras moléculas. Redução de CD4+em t1, t2 e t3, aumento de CD8+ em t2 e t3; redução do número de células CD20+ em t2 e t3; menor expressão de IL10 e de IL17 nos baços com LV – t1, t2 e t3; (t1, t2 e t3 = baços tipos 1, 2 e 3).

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho nós observamos que os 7 pacientes com LV grave apresentam idade média de 45 anos, 6 são do gênero masculino e 1 do gênero feminino. O tempo de diagnóstico de LV foi entre 1 ano e 7 meses e 7 anos, antes da esplenectomia. Dos 7 com LV, 6 são coinfectados com HIV, todos tratados clinicamente para LV e HIV, sem boa resposta ao tratamento e, por isso mesmo, eleitos para esplenectomia.

Os 7 baços dos pacientes com LV grave apresentam, em comparação aos 3 baços do grupo controle, 3 baços com arquitetura preservada - tipo 1. Quatro deles apresentam alterações arquiteturais da PB esplênica, sendo 2 baços com leve desorganização da PB - baços tipo 2, e 2 baços com moderada a acentuada desorganização da PB - baços tipo 3. Houve tendência à hiperplasia da PB em um paciente com menor tempo de doença, e atrofia da PB nos demais pacientes, com baços tipos 2 e 3, mais acentuada quanto maior a desorganização do baço;

Também se observou tendência à plasmocitose, bem como redução de células CD4+ e de células CD20, e aumento de células CD8+. Nas marcações com anticorpos para citocinas e outras moléculas, houve tendência a aumento de FoxP3, que marca células T regulatórias, maior número de células marcadas com Caspase 3, que representa células em apoptose recente, nos baços tipo 1 e tipo 2. Presença de maior expressão de TNF α , menor expressão de IL-10 e de IL-17 e maior expressão de IL-6.

Dos pacientes com LV, obtivemos os dados clínicos em que se pode salientar que todos os 6 pacientes coinfectados apresentavam carga viral (HIV) indetectável, ou seja, considerada zerada. Diante disso, pode-se inferir que os mecanismos deletérios de resposta imune, promovidos pelo HIV, persistem, mesmo após a negatização da carga viral.

Em nossos dados, observamos, nos coinfectados, redução de linfócitos CD4, discreto aumento dos linfócitos CD8 e redução da proporção CD4/CD8. Esses achados sugerem que houve hiperestimulação antigênica prolongada e consequente exaustão da resposta imune, o que explica a gravidade, principalmente da LV,

Em relação aos dados clínicos dos pacientes com LV, detectamos que há associação positiva entre o tempo de doença e a desorganização esplênica, tendo em vista que os baços tipos 2 e 3 eram dos infectados com maior tempo e diagnóstico de

LV. A esplenomegalia, um dos sinais clássicos da LV, foi detectada em todos os 7 baços com LV. A hepatomegalia foi ausente apenas no paciente sem HIV, não coinfestado, nos demais pacientes com LV, houve hepatomegalia, e variável dentro dos grupos, sem uma correlação evidente com a gravidade da LV. Sangramento, um dos sintomas também usuais nos pacientes com LV grave, esteve presente em apenas um dos pacientes com LV, com baço tipo 1. Um paciente com baço tipo 3 apresentou sangramento apenas durante a esplenectomia. Seis dos sete pacientes com LV apresentaram palidez cutâneo mucosa, o único que não exibiu esse sinal foi um paciente com baço tipo 3. Leucopenia, outro sinal importante, também esteve presente em seis dos pacientes, com exceção de apenas um paciente com baço tipo 3, que teve contagem de leucócitos quase limítrofe mínima, mas ainda dentro da normalidade. Todos com HIV atingiram carga viral indetectável antes da esplenectomia, o que mostra boa resposta ao tratamento antirretroviral (TARV). (LINDOSO et al., 2018; SANTOS-OLIVEIRA et al., 2011; VYAS; SHAH, 2011).

A plasmocitose na PV do baço é um achado evidente em nossos resultados, com grande número destas células nos baços dos portadores de LV em diferentes estágios da doença representada pelos três diferentes tipos de baço. Dados de trabalhos, inclusive de nosso grupo, apontam a plasmocitose como um achado comum na LV, em cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* e em LV experimental em murinos, e sua associação com a desorganização do tecido linfóide. A desorganização da PB leva a uma retenção prejudicial de células B nos folículos, com liberação destas para a circulação e maior produção de plasmócitos. É importante ressaltar que, em nossos resultados, a maior contagem de plasmócitos foi observada no baço de paciente com LV sem HIV. Dos sete baços com LV, seis deles são coinfestados com HIV. Isso pode ser consequente à exaustão da resposta imune, pela hiperestimulação antigênica, que pode afetar a ativação, o trânsito e as funções celulares. (SANTANA et al., 2008; YI, J. S. et al., 2010; LIMA et al., 2014; SILVA et al., 2016).

Outro achado relevante resultou da mensuração da porcentagem de área de PB em relação à área de PV, com hiperplasia da PB em portador de LV, sem HIV, com baço tipo 1. Nos demais baços com LV, a atrofia foi crescente concomitantemente com o agravamento da doença, representada pelos três tipos de baço. Nos baços tipo3, a atrofia foi marcante (SILVA et al., 2014; SANTANA et al., 2008).

Alterações no baço, que variam desde hiperplasia até atrofia, já foram descritas em seres humanos e cães com leishmaniose visceral. A hiperplasia seguida de atrofia já foi demonstrada por alguns autores, em modelos experimentais e humanos. A atrofia e a perda de compartimentos de células B do baço coincidiu com fases mais graves da doença (SANTANA et al., 2008; LIMA et al., 2014, SILVA et al., 2014; VERESS et al., 1977).

Já foi relatado que a desorganização histoarquitetural do baço de cães com LV também está associada à fibrose com redução da expressão de quimiocinas e os respectivos receptores, o que pode contribuir para a migração deficiente de leucócitos, como linfócitos CD4+, e consequente resposta ineficiente, com aumento do parasitismo e redução dos nichos de linfócitos, principalmente nos estágios mais graves da LV, o que pode culminar em imunossupressão, como sugerido por Silva e colaboradores 2018 (VERESS et al. 1983; ENGWERDA et al., 2002; ANDRADE et al., 1989).

Nossos resultados evidenciam a redução de células CD4, já descrita em outros trabalhos anteriores com LV. Esta redução pode estar associada, também, à redução de IL-17, que também detectamos em nossos resultados, com menor produção de INF γ , ambos agem em sinergismo, para maior produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos infectados (RODRIGUES et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2014).

A redução de células CD4 foi mais acentuada nos baços tipo 3, que representam a doença LV mais grave. Esse achado é concordante com estudo de i e colaboradores (2010), onde foi detectada a redução do número de células T CD4 e consequente diminuição da proporção CD4/CD8. Esses achados podem ser justificados pela hiperestimulação infecciosa, como na coinfeção LV-HIV, o que significa dizer infecção persistente ou infecções crônicas repetidas ou, ainda, infecções com alta carga de patógeno/antígeno, já demonstrado em alguns trabalhos (YI, J. S. et al., 2010; DA SILVA, A.V.A, 2018).

Aqui no presente trabalho, seis dos sete pacientes são coinfectados e, portanto, expostos à hiperestimulação imune. Ambos os patógenos levam à imunossupressão e redução do número de linfócitos CD4+, linfócitos T auxiliares, conhecidas por sua multifuncionalidade na resposta imune, atuando direta e indiretamente na ativação de células e de seus respectivos mecanismos de defesa contra o patógeno. Apesar do número reduzido destas células, podemos presumir que o remanescente de células

TCD4 poderia ser de células T helper para TCD8, via citocinas, com ativação da proliferação destas células TCD8, sem, entretanto, aumentar sua funcionalidade (YI, J. S. et al., 2010; RODRIGUES et al., 2016). A redução na população de linfócitos, tanto linfócitos B quanto linfócitos TCD4+ também pode ser consequente à fibrose e redução da expressão de quimiocinas e receptores que ocorre nos baços desorganizados, com redução do tráfico celular e consequente perda funcional (ÁUREA et al., 2018). A resposta imune adequada para LV é fundamentalmente dependente da função otimizada das células CD4 para uma resposta imune eficaz, com eliminação dos parasitas leishmanias, como é esperado e desejado (MAURI et al., 2012).

Observou-se, ainda, que os pacientes coinfectados apresentam aumento de moléculas inibidoras na superfície das células T CD4, o que leva a um desequilíbrio entre as células Treg e a ativação imune, e persistência de uma carga parasitária residual, mesmo com o sucesso do tratamento contra a leishmaniose. A ineficiente resposta de células T CD4+/CD8+ está vinculada à progressão da doença (LINDOSO et al., 2018).

Registramos maior número de células T CD8 nos baços com LV, em nossos resultados, o que sugere que, apesar de maior número, estas células podem estar ineficientes (BANKOTI et al., 2012; JOHN S. YI et al., 2010; RODRIGUES et al., 2016). Estes achados ratificam dados de estudos já publicados que sugerem que a coinfeção LV-HIV pode explicar este aumento de células T CD8, com esgotamento de linfócitos T, mesmo com tratamento adequado, com aumento de linfócitos TCD38+CD8+, que representa ativação imune celular. (LINDOSO et al., 2012). Estas células exibem sinais de exaustão, na LV crônica, com redução dos níveis de IL-2 e IFN γ , que representa resposta ineficiente, mesmo com maior número de células T CD8 (YI, J. S. et al., 2010; RASHMI et al., 2012; LINDOSO et al., 2018).

Trabalhos in vitro já mostraram que células B de pacientes com HIV apresentam defeito na proliferação em resposta a vários estímulos. Pacientes com alta carga viral apresentaram comprometimento funcional das células B e a viremia induziu o aparecimento de uma subpopulação de células B que expressa níveis reduzidos de CD21 e que seguem uma via anormal; são secretoras de imunoglobulinas e, em parte, responsáveis pela hipergamaglobulinemia, descrita tanto na LV como no HIV. (MAURI et al., 2012).

As células B regs também podem facilitar a sobrevivência de patógenos, particularmente nos estágios iniciais da infecção, e subsequentemente causar maior gravidade da doença, inibindo a ativação inflamatória de células T e macrófagos, principalmente pela produção de IL-10. Além disso, os Bregs oferecem proteção contra a resposta hiperinflamatória nas infecções parasitárias (YI, J. S. et al., 2010; SANTANA et al, 2008; MOIR et al., 2008; LIMA et al., 2014; SILVA et al., 2016; DAI et al., 2017).

Observamos, na PV, redução de células marcadas com CD20, que representam células B. Tais células, produtoras de anticorpos, apresentam subpopulações específicas, como as células B reguladoras (Breg) cuja depleção está associada a agravamento de condições como doenças inflamatórias, autoimunes, enterite crônica, câncer e doenças infecciosas, entre outras. Este fato pode explicar o menor número de células B nos baços com LV. As células Bregs também secretam IL-10 que inibe IL17, com exacerbação da doença; produzem fator de crescimento tumoral 1 (TGF β 1) que está associado à apoptose de células T efetoras e também expressam beta2-microglobulina (MHCII) que promove o recrutamento de células T CD8 (BANKOTI et al., 2012).

Tal redução do número de linfócitos B poderia, também, ser explicada pela desorganização do tecido esplênico que é crescente com o desenrolar da doença, e que leva à fibrose e alterações na expressão de moléculas imunes, citocinas e quimiocinas, com deficiente migração de leucócitos, incluídos aí os linfócitos B, bem como redução de nichos de células B, em virtude da ineficiente ativação pelas células T, que também sofrem alterações no seu trânsito e na sua sobrevivência (MAURI et al., 2012).

Em nossos resultados, foi observado, nos baços de portadores de LV, discreto aumento dos níveis de expressão do fator de transcrição Foxp3, que marca células Treg, o que pode representar uma tentativa de regular os efeitos deletérios da inflamação exacerbada, corroborando com os dados da literatura, incluindo estudo de nosso grupo, no trabalho de Dos-Santos e outros(2014) que sugeriu um acúmulo dessas células Foxp3 durante a LV crônica. E Reina e colaboradores (2018) salientam que pode haver uma subpopulação de células TCD4 que atuam como células T regulatórias. Nossos achados também são concordantes com estudo de Pradyot Bhattacharya et al., 2012 que salientou a importância das células T reg na progressão da LV e na PKDL, e sua direta associação com os níveis de IL-10 e a carga parasitária.

Nossos achados mostram tendência à redução da expressão de IL-10 nos baços com LV, o que poderia ser explicada pela exaustão de linfócitos T, quando há estímulo à produção de fatores inibitórios, e citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e a IL-4, gerando um círculo de auto alimentação da imunossupressão. (YI, JS et al., 2010).

Os nossos resultados evidenciaram discreto aumento nos níveis de IL-6 e discreta redução de IL-17 nos baços e portadores de LV em estágios mais avançados, com baços tipos 2 e tipo 3, o que também corrobora com os achados de dos Santos et. Al, que evidenciou redução da IL-17 no baço com LV. A IL-6, que atua tanto como pró-inflamatória como imunossupressora, na dependência de vários fatores da resposta imune, pode estar aumentada nesses baços mais desorganizados como forma de equilibrar a reduzida expressão de IL-17 nesses baços e, assim, contribuir para uma resposta imune satisfatória (RODRIGUES et al., 2016).

No presente trabalho, foi observada uma tendência a aumento de apoptose, por maior expressão de Caspase 3 nos baços com LV, em relação aos baços controle, mais evidente nos baços tipos 1 e 2. Esse resultado endossa achados de outros trabalhos, como o de Silva et al., 2018, que observou associação entre a redução do número de linfócitos TCD4 e maior taxa de apoptose de células T quando há desorganização da PB. E também já foi descrita a correlação entre alta carga parasitária e mais linfócitos apoptóticos. O fato de os baços tipo 3 terem uma taxa de apoptose menor que os baços tipos 1 e 2, pode ser entendida pelo fato de que, nestes baços, a resposta imune está ainda apta a executar mecanismos para controlar o parasitismo, entretanto, com a cronicidade do estímulo antigênico, representado pela maior desorganização da PB esplênica, nos baços tipo 3, a resposta imune tende à ineficiência (BHATTACHARYA et al., 2012; YI, JS, 2010).

Em nosso trabalho, houve aumento de TNF nos infectados, mais evidente na PV. Esta citocina causa alterações na ZM esplênica, o que altera o tráfico celular, com prejuízo das funções de células T e de CDs. As CDs, com a migração prejudicada, passam a expressar mais moléculas inibitórias e apresentam defeitos nos estágios posteriores da infecção. Esse resultado ratifica estudos anteriores que demonstraram a importância do TNF α na resposta imune à LV, e seu papel anti-inflamatório, Th1, e está também envolvido na PKDL.) Os níveis de TGF β não apresentaram diferenças proeminentes entre os dois grupos, de baços sem e com LV (BANKOTI et al., 2012).

Em nossos resultados, os níveis de TGF β e de IFNg não foram definitivamente conclusivos, pois apresentaram diferenças entre os baços dentro dos grupos, com LV e entre os baços sem LV. Esse fato pode estar aliado a diferenças nos dados clínicos tanto dos portadores de LV, LV/HIV e nos controles, sem LV, como tempo das doenças, outras patologias associadas, dentre outros. Não tivemos acesso aos dados clínicos dos baços controle e não podemos descartar outras doenças agudas ou crônicas e nem avaliar o estado imunológico dos indivíduos esplenectomizados do grupo controle.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foi possível avaliar que a plasmocitose, a hiperplasia e atrofia e desorganização da PB também ocorrem nos humanos, como já detectadas na LV canina e LV experimental. Além disso, verificamos que há variações nas respostas imunes com redução de IL-10 e IL-17, que na condição de exaustão, não se apresentam como bons marcadores de gravidade da LV. Somado a isso, há também variações nas populações celulares, principalmente redução de linfócitos T CD4, e correlação positiva com a gravidade da LV.

Por fim, nossos achados têm uma importância clínica na tentativa de compreender os mecanismos moleculares e celulares envolvidos na imunopatogênese da LV e função do baço. Para tanto, há necessidade de estudos complementares que corroborem com os achados de alterações na resposta imune em baços humanos de portadores de LV.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, T. D. R. de. **Correlação entre a resposta imunológica e as manifestações clínicas na leishmaniose visceral canina**. 2013. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.
- ALVAR, J. et al. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 2, p. 298–319, 1997.
- ANDARGIE, T. E.; DIRO EJARA, E. Pro- and anti-inflammatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Journal of Cell Science & Therapy**, v. 6, n. 2, 2016.
- BANERJEE, A. et al. Role of pro-inflammatory cytokine IL-17 in Leishmania pathogenesis and in protective immunity by Leishmania vaccines. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 37–41, 2016.
- BANKOTI, R.; GUPTA, K.; LEVCHENKO, A.; STAGER, S. Marginal zone b cells regulate antigen-specific t cell responses during infection. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 8, p. 3961–3971, 2012.
- BERNARD, N. F.; CHERNOFF, D. N.; TSOUKAS, C. M. Effect of splenectomy on T-cell subsets and plasma HIV viral titers in HIV-infected patients. **Journal Human Virology**, v. 1, n. 5, p. 338-45, 1998.
- BHATTACHARYA, P.; ALI, Nahid. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 2, p. 128-134, 2013.
- CAVALCANTI, A. S. et al. Parasite load induces progressive spleen architecture breakage and impairs cytokine mrna expression in leishmania infantum-naturally infected dogs. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, 2015.
- CENINI, P. et al. Mononuclear cell subpopulations and cytokine levels in human visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 168, n. 4, p. 986–993, 1993.
- DA SILVA, A. V. A. et al. Morphophysiological changes in the splenic extracellular matrix of Leishmania infantum-naturally infected dogs is associated with alterations in lymphoid niches and the CD4+ T cell frequency in spleens. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, 2018.
- DALTON, J. E. et al. Inhibition of receptor tyrosine kinases restores immunocompetence and improves immune-dependent chemotherapy against experimental leishmaniasis in mice. **The Journal of Clinical Investigatio**, v. 120, n. 4, p. 1204-1216, 2010.
- DE LIMA, V. M. F. et al. IL-6 and TNF- α production during active canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, n. 1-2, p. 189–193, 2007.
- DOS SANTOS, P. L. et al. The severity of visceral leishmaniasis correlates with elevated levels of serum IL-6, IL-27 and sCD14. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, 2016.
- DOS-SANTOS, W. L. C. et al. A case of conventional treatment failure in visceral leishmaniasis: leukocyte distribution and cytokine expression in splenic compartments. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 491, 2014.
- DOS-SANTOS, W. L. C. et al. A case of conventional treatment failure in visceral leishmaniasis: leukocyte distribution and cytokine expression in splenic compartments. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, 2014.

- FALEIRO, R. J.; KUMAR, R.; HAFNER, L. M.; ENGWERDA, C. R. Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 2014.
- FREITAS, J.; NUNES-PINHEIRO, D. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania spp.* **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 109, p. 11-20, 2010.
- HENN, G. A. et al. Is visceral leishmaniasis the same in hiv-coinfected adults? **Brazilian Journal Infectious Disease**, v. 22, n. 2, p. 92–98, 2018.
- HERMIDA, M. et al. Histological Disorganization of Spleen Compartments and Severe Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, 2018.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica: texto e atlas. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- KAYE, P. M.; AEBISCHER, T. Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1462–1470, 2011.
- KUMAR, R. et al. Immune checkpoint targets for host-directed therapy to prevent and treat leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.
- KUMAR, R. et al. Leishmania specific CD4 t cells release IFN γ that limits parasite replication in patients with visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 8, n. 10, 2014.
- LIMA, I. S. et al. Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.
- MARQUES, N. C. et al. Immunodetection of hepatic stellate cells in dogs with visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 117, n. 6, p. 1829–1837, 2018.
- MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 8, p. 606–616, 2005.
- MOIR, S. et al. HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 18, p. 10362–10367, 2001.
- MOREIRA, P. et al. CD56 and CD3 expression in the liver and spleen of dogs with visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Pathology**, v. 1, n. 2, p. 1-4, 2017.
- MOUKAMBI, F. et al. CD4 T follicular helper cells and hiv infection: friends or enemies? **Frontiers in Immunology**, v. 8, n 135, 2017.
- OKWOR, I.; UZONNA, J. E. The immunology of Leishmania/HIV co-infection. **Immunologic Research**, v. 56, n. 1, p. 163–171, 2013.
- ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 10, p. 925–932, 2016.
- PARUL, P.; VYAS, D. Atypical presentation of visceral leishmaniasis in a HIV-positive patient from a nonendemic area. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 3, n. 2, p. 119-121, 2011.
- RODRIGUES, V. et al. Regulation of immunity during visceral leishmania infection. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, 2016.
- RODRÍGUEZ-CORTÉS, A. et al. Compartmentalized immune response in leishmaniasis: changing patterns throughout the disease. **PLOS ONE**, v. 11, n. 5, 2016.
- ROSARIO, Carla J. R. M. do. et al. Quantificação da IL-10 e do INF- γ em cães com ou sem sinais clínicos de infecção com *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 129-132, 2018.

- SANTANA, C. C. et al. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. **Parasite Immunology**, v. 30, n. 10, p. 515–524, 2008.
- SHAFIEI, R. et al. Emergence of co-infection of visceral leishmaniasis in HIV-positive patients in northeast Iran: A preliminary study. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 12, n. 2, p. 173–178, 2014.
- SILVA, J. S. et al. Low CXCL13 expression, splenic lymphoid tissue atrophy and germinal center disruption in severe canine visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 2017.
- SOUZA, T. L. de. et al. Pro-cellular exhaustion markers are associated with splenic microarchitecture disorganization and parasite load in dogs with visceral leishmaniasis. **Nature**, v. 9, p. 1-14, 2019.
- STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, 2017.
- TROYA, J., CASQUERO, A., MUÑIZ, G., FERNÁNDEZ-GUERRERO, M. L., & GÓRGOLAS, M. (2006). The role of splenectomy in HIV-infected patients with relapsing visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 134(05), 621.
- YI, J. S. et al. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. **Immunology**, v. 129, n. 4, p. 474–481, 2010.