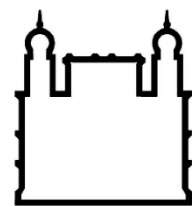




UFBA

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



FIOCRUZ

Curso de pós-graduação em patologia Humana e Experimental

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS B E PLASMOCITOSE NO CURSO DA
DESORGANIZAÇÃO ESPLÊNICA NA LEISHMANIOSE VISCERAL: UM ESTUDO
EXPERIMENTAL EM HAMSTERS**

REGINALDO BRITO DOS SANTOS JUNIOR

**Salvador - BA
2022**

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

Curso de pós-graduação em patologia Humana e Experimental

**DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS B E PLASMOCITOSE NO CURSO DA
DESORGANIZAÇÃO ESPLÊNICA NA LEISHMANIOSE VISCERAL: UM ESTUDO
EXPERIMENTAL EM HAMSTERS**

REGINALDO BRITO DOS SANTOS JUNIOR

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação
em Patologia humana e Experimental para obtenção
do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Washington LC dos-Santos
Coorientadora: Profa. Dra. Caroline VB de Melo

**Salvador - BA
2022**

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

S237d Santos Junior, Reginaldo Brito dos.

Diferenciação de células B e plasmocitose no curso da desorganização esplênica na leishmaniose visceral: um estudo experimental em hamsters/ Reginaldo Brito dos Santos Junior. – Salvador, 2022.

103 f.: il.: 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Washington LC dos-Santos

Coorientador(a): Dra. Caroline VB de Melo

Dissertação (Mestrado em Patologia Humana e Experimental) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

1. Plasmócitos. 2. Expressão gênica. 3. DLK1. 4. Imuno-histoquímica. I. Título.

CDU 616.993.161

"DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS B E PLASMOCITOSE NO CURSO DA DESORGANIZAÇÃO ESPLÊNICA NA LEISHMANIOSE VISCERAL: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM HAMSTERS".

Reginaldo Brito dos Santos Junior

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 24 de maio de 2022.

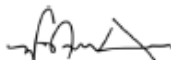
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Wagner Luiz Tafuri
Professor
UFMG



Dra. Cláudia Ida Brodskyn
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ



Dr. Washington Luis Conrado dos Santos
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

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

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – **CNPq**.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – **FAPESB**.

À **CAPES** pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Patologia Humana.

Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina- UFBA.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus familiares, em especial meus pais, **Reginaldo e Michelle**, por todo apoio neste período;

Às orientações e ensinamentos de **Dr. Washington**, que foram essenciais para minha formação acadêmica e carreira científica, além das boas risadas proporcionadas e histórias interessantes contadas nas horas do café;

À **Carol** (Dra Caroline) também pela orientação e dedicação ao meu trabalho, além da amizade que construímos. Como carinhosamente foi apelidada, minha mãe científica, que não poderia ser mais bem aplicado neste ano tão especial para ela;

Aos meus queridos amigos, **Bianca, Jonathan, Erina e Kalene**, que foram essenciais no desenvolvimento do trabalho, pelos sermões quando necessários e principalmente pelo apoio nos momentos de dificuldades durante este período;

A todos do grupo **WLCS** e do **LAPEM** pelos momentos de companheirismo;

À **biblioteca** e sua equipe pela correção e suporte;

Ao **Instituto Gonçalo Moniz** e seus funcionários, pelas ajudas e suporte, sempre de forma cordial e solícita;

Aos **animais** que tornaram este trabalho possível.

OBRIGADO!

SANTOS JUNIOR, Reginaldo Brito dos. **Diferenciação de células B e plasmocitose no curso da desorganização esplênica na leishmaniose visceral**: um estudo experimental em hamsters. 2022. 103 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

RESUMO

Introdução: A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa causada pela *Leishmania infantum*, em que há o comprometimento de órgãos internos. No baço a infecção é crônica e progressiva. Além disso, na LV grave ocorre a desorganização dos compartimentos esplênicos, a diminuição do número de células B (LyB) na polpa branca (PB) e plasmocitose na polpa vermelha (PV). Os plasmócitos têm sobrevivência estendida e acumulam-se em várias doenças crônicas. Contudo, pouco se sabe sobre as funções e os mecanismos de geração e manutenção da sobrevivência dessas células. **Objetivo:** Neste trabalho, investigamos os potenciais mecanismos associados com o desenvolvimento anômalo de LyB que levam à plasmocitose no curso da LV. **Métodos:** 56 hamsters da linhagem Golden Sirius com 6 a 8 semanas de idade foram usados neste estudo: 28 foram injetados intraperitonealmente com 1×10^7 promastigotas de *L. infantum* e 28 receberam a solução diluente pela mesma via. Sete animais de cada grupo foram eutasiados 30, 60, 120 e 150 dias após a injeção (dpi). Os animais foram necropsiados e amostras dos órgãos foram fixadas em parafina para estudo histológico e avaliação da distribuição de célula B e plasmócitos por imuno-histoquímica. Para três animais de cada grupo e em cada ponto, um fragmento do baço foi colhido para avaliação transcriptômica da expressão gênica e associação entre moléculas relacionadas com o desenvolvimento de LyB, incluindo uma molécula chamada DLK1. **Resultados:** Houve aumento da PB dos animais infectados 120 dpi, enquanto, no ponto consecutivo ocorreu atrofia, após 150 dias. Afetando a região de folículo linfóide, possivelmente devido a diminuição de LyB. Também observamos redução da quimiotaxia de LyB, pela diminuição de CXCL13 e CXCL12 que ocorreu 120 e 150 dpi. Houve uma tendência a diminuição de fatores moleculares relacionados com a resposta de centro germinativo (CG), observado pela expressão gênica dos hamsters infectados. Não houve alterações na quantidade de LyB na PV dos animais infectados, mas houve progressiva plasmocitose na PV dos animais nos pontos mais tardios da doença, 120 e 150 dpi e o acúmulo dessas células na zona de células T 120 dpi, sendo que DLK1 está associada com a plasmocitose na PV. A expressão gênica dos animais infectados confirmou a diferenciação de plasmócitos 150 dpi e associou a sinalização por IL-21 e IFN- γ como as principais moléculas envolvidas. Além disso, houve o aumento de IL-6 150 dpi. **Conclusões:** Neste estudo correlacionamos alterações estruturais e celulares com a expressão molecular, para investigar os determinantes da diferenciação anômala de LyB em formas graves da LV. Os resultados deste trabalho demonstram aumento de IL-21 e INF- γ como moléculas responsáveis pelas alterações nas vias de diferenciação de LyB. Além disso, demonstramos um aumento da área de LyB da PB, que antecede a diminuição e possivelmente a desorganização do baço. É possível que essa atrofia esteja relacionada com a inibição do *homing* de LyB durante a infecção.

Palavras-chaves: Plasmócitos. Expressão gênica. DLK1. Imuno-histoquímica.

SANTOS-JUNIOR, Reginaldo Brito dos. **B cell differentiation and plasmacytosis in the course of splenic disorganization in visceral leishmaniasis: an experimental study in hamsters.** 2022. 103 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

ABSTRACT

Introduction: Visceral leishmaniasis (VL) is an infectious disease caused by *Leishmania infantum*, which internal organs are compromised. In the spleen the infection is chronic and progressive. In addition, in severe VL, there is disruption of splenic compartments, a decrease of B cells number in the white pulp (WP) and plasmacytosis in the red pulp (RP). Plasma cells have extended survival and accumulated in many chronic diseases. However, poorly is known about the functions and mechanisms of generation and maintenance of cell survival. **Objective:** In this work, we investigated the potential mechanisms associated with the abnormal development of B cells that lead to plasmacytosis during VL. **Methods:** 56 Golden Syrian hamsters with 6 to 8 weeks were used in this study: 28 were injected intraperitoneally with 1×10^7 *L. infantum* promastigotes and 28 received the diluent solution by the same route. Seven animals from each group were euthanized 30-, 60-, 120- and 150-days post-injection (dpi). The animals were necropsied and organ samples were fixed in paraffin for histological study and evaluation of B cell and plasma cell distribution by immunohistochemistry. For three animals from each group and at each point, a spleen fragment was collected for transcriptomic evaluation of gene expression and association between molecules related to B cell development, including a molecule called DLK1. **Results:** There was an increase in the WP of the infected animals at 120 dpi, while at the 150 dpi there was atrophy affecting the follicle, which might be related to a decrease in B cells. We also observed a reduction in B cell chemotaxis, due to the decrease in CXCL13 and CXCL12 that occurred at 120 and 150 dpi. We noticed a toward to decrease molecular factors related to the germinal center (GC) response, observed by the gene expression of infected hamsters. There were no changes in the amount of B cells in the RP of the infected animals, but there was progressive plasmacytosis in the RP of the animals at the later stages of the disease, 120 and 150 dpi and the accumulation of these cells in the T cell zone at 120 dpi, DLK1 was associated with the plasmacytosis in RP. The gene expression of infected animals confirmed the differentiation of plasma cells at 150 dpi and associated signaling by IL-21 and IFN- γ such the main molecules involved. In addition, there was an increase in IL-6 150 dpi. **Conclusions:** In this study we correlated structural and cellular changes with molecular expression to investigate the determinants of B cell anomaly in severe forms of VL. In this work we demonstrate an increase in IL-21 and INF- γ both responsible for changes in B cell differentiation pathways. In addition, we demonstrate an increase in the B cell area in the WP, which is followed by a decrease and disorganization. It is possible that the WP atrophy is related to the inhibition of B cell homing during infection.

Keywords: Plasma cells. Gene expression. DLK1. Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do baço de hamsters.....	27
Figura 2 - Diferenciação terminal de células B no baço.....	31
Figura 3 - Diferenciação de plasmócitos no baço	35
Figura 4 - Regulação gênica da diferenciação de plasmócitos.....	38
Figura 5 - Ilustração da abordagem experimental do projeto de origem do material experimental.....	45
Figura 6 - Desenho esquemático do delineamento metodológico	46
Figura 7 - Células positivas para DLK1 no baço de hamsters	57
Figura 8 - Distribuição de células DLK1 ⁺ no baço de hamsters	58
Figura 9 - Validação da marcação por imuno-histoquímica e dado transcriptômico	60
Figura 10 - Via de diferenciação e desenvolvimento de células B de animais infectados em 30 dpi.....	61
Figura 11 - Via de diferenciação e desenvolvimento de células B de animais infectados em 60 dpi.....	62
Figura 12 - Via de diferenciação e desenvolvimento de células B de animais infectados em 120 dpi.....	63
Figura 13 - Via de diferenciação e desenvolvimento de células B de animais infectados em 150 dpi.....	64
Figura 14 - Perfil transcricional da diferenciação e regulação de plasmócitos nos animais infectados.....	65
Figura 15 - Proporção de células B na polpa branca do baço de hamsters.....	67
Figura 16 - Distribuição de células B na polpa vermelha do baço de hamsters.....	68
Figura 17 - Marcação de células CD138 ⁺ no baço de hamsters.....	69
Figura 18 - Proporção de plasmócitos na polpa branca no baço de hamsters.....	71
Figura 19 - Análise da disproteinemia.....	72
Figura 20 - Diferenciação de amastigotas de <i>L. infantum</i>	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de moléculas avaliadas pela expressão transcriptômica.....	48
Tabela 2 - AC imunohistoquímica.....	51
Tabela 3 - Classificação histológica do baço.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

abAms	Antígeno biotilado amastigota
abPro	Antígeno biotilado amastigota
AC	Anticorpo
APRIL	<i>Proliferation-inducing ligand</i>
ArtC	Arteriola central
BAFF	<i>B-cell activating factor</i>
BCL-6	<i>B-cell lymphoma-6</i>
BCR	<i>B cell receptor</i>
BLIMP1	<i>B-lymphocyte-induced maturation protein 1</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CCL	C-C Ligante
CCR	C-C Receptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDKN	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor</i>
CG	Centro germinativo
CR2	<i>Complemente receptor type 2</i>
CXCL	C-X-C Ligante
CXCR	C-X-C Receptor
DCs	<i>Dendritic cells</i>
DLK1	<i>Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1</i> – proteína
Dlk1	<i>Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1</i> – gene
DLK1	<i>Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1</i> – transcrito
DLL1	<i>Delta Like Canonical Notch Ligand 1</i>
DP	Desvio padrão
dpi	Dias após injeção
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
FC	<i>Fold change</i>
FDCs	<i>Follicular dendritic cells</i>
FDR	<i>False Discovery Ratio</i>
FFPE	<i>Formalin-fixed, paraffin-embedded</i>
FL	Folículo linfoide

FO	Follicular
FT	Fatores de transcrição
H&E	Hematoxilina e Eosina
HBSS^{+Ca/Mg}	Hanks' Balanced Salt Solution com cálcio e magnésio
HBSS^{-Ca/Mg}	Hanks' Balanced Salt Solution sem cálcio e magnésio
HIF-1a	<i>Hipoxia-inducible factor</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HRP	Horseradish Peroxidase
I.P.	Intraperitoneal
Ig	Imunoglobulina
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
iMos	<i>Inflammatory monocytes</i>
INF-γ	Interferon gama
IPA	<i>Igenuity Pathway Analysis</i>
IRF	<i>Interferon-regulatory factor</i>
LV	Leishmaniose visceral
LyB	Célula/linfócito B
LyT	Célula/linfócito T
M	Manto
M1	Macrófago inflamatório
M2	Macrófago anti-inflamatório
MCL1	<i>Myeloid cell leukaemia 1</i>
miRNA	Micro RNA
MITF	<i>Microphthalmia-associated transcription factor</i>
MΦ	Macrófagos
MTA3	<i>Metastasis-associated 1 family, member 3</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
PALS	Bainha linfoide periarteriolar
PAX5	<i>Paired box protein 5</i>
PB	Polpa branca
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>

PBS	Phosphate-Buffered Saline
PC	Plasmócitos
PV	Polpa vermelha
RNS	<i>Reactive nitrogen species - RNS</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SBF	Soro bovino fetal
SIP	<i>Sphingosine-1-phosphate</i>
SPIB	<i>Spi-B transcription factor</i>
SLE	<i>Systemic lúpus erythematosus</i>
TA	Temperatura ambiente
TAL1	<i>T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1</i>
TBS	Tris-Buffered Saline
TD	T-dependente
Tfh	<i>T helper follicular</i>
TGF-B	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th	<i>T-helper</i>
TI	T-independente
TLR	<i>Toll like receptors</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
Tr1	<i>Type 1 regulatory T cell</i>
XBP1	<i>X-box-binding protein 1</i>
ZC	Zona clara
ZE	Zona escura
ZM	Zona marginal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 LEISHMANIOSE VISCERAL.....	16
1.1.1 Resposta imune na leishmaniose visceral	19
1.1.1.1 Células do sistema imune inato.....	20
1.1.1.2 Células T e B.....	22
1.1.2 Regulação gênica na leishmaniose visceral	23
1.1.2.1 DLK1.....	24
1.2 BAÇO.....	25
1.2.1 Estrutura e função	25
1.2.1.1 Polpa vermelha.....	25
1.2.1.2 Polpa branca.....	26
1.2.2 Baço na leishmaniose visceral	29
1.3 DIFERENCIAÇÃO DE PLASMÓCITOS NO BAÇO.....	30
1.3.1 Regulação gênica da diferenciação de plasmócitos	36
1.3.2 Plasmócitos na leishmaniose visceral	38
1.3.3 Plasmócitos nas doenças crônicas e infecciosas	39
1.4 MODELO EXPERIMENTAL DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	40
2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	41
2.1 JUSTIFICATIVA.....	42
2.2 HIPÓTESE.....	42
3 OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVO GERAL.....	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 MATERIAL DE ESTUDO.....	44
4.1.1 ANIMAIS E INFECÇÃO.....	44
4.2 DELINEAMENTO METODOLÓGICO.....	45
4.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	46
4.4 AVALIAÇÃO TRANSCRIPTÔMICA.....	46
4.4.1 Extração e seleção do RNA	47
4.4.2 Avaliação do perfil transcriptômico	47
4.5 ENRIQUECIMENTO DE VIAS E EXPRESSÃO TRANSCRIPTÔMICA.....	48

4.5.1 Rede de interações transcriptômica.....	48
4.5.2 Expressão transcriptômica	48
4.6 CULTURA L. infantum	48
4.7 BIOTINILAÇÃO PROMASTIGOTA DE L. infantum	49
4.8 DIFERENCIAÇÃO DE AMASTIGOTA DE L. infantum	49
4.8.1 Infecção e diferenciação	49
4.8.2 Isolamento de amastigota.....	50
4.9 IMUNO-HISTOQUÍMICA	50
4.9.1 Padronização imuno-histoquímica modificada	51
4.9.2 Análise das marcações.....	52
4.10 VALIDAÇÃO DLK1 – WESTERN BLOT	53
4.11 ANÁLISE BIOQUÍMICA DE SORO.....	54
4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	54
5 RESULTADOS	55
5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DOS ANIMAIS DO ESTUDO.....	55
5.2 DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS DLK1 ⁺ AO LONGO DA INFECÇÃO	56
5.3 VALIDAÇÃO DA MARCAÇÃO POR IMUNO-HISTOQUÍMICA	58
5.4 VIA DE DESENVOLVIMENTO DE CÉLULAS B	60
5.5 EXPRESSÃO TRANSCRIPTÔMICA ASSOCIADA COM DIFERENCIAÇÃO E REGULAÇÃO DE PLASMÓCITOS AO LONGO DA INFECÇÃO.....	64
5.6 PROPORÇÃO DE CÉLULAS B NO BAÇO	65
5.7 PROPORÇÃO DE PLASMÓCITOS NO BAÇO	69
5.8 DISPROTEINEMIA.....	72
5.10 ESPECIFICIDADE DE PC NO BAÇO	72
6 DISCUSSÃO	74
7 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS	82
APÊNDICE S1	88
ANEXO A	101

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma infecção parasitária, caracterizada pelo comprometimento de órgãos, como o baço, fígado e medula óssea. O Brasil é um dos países mais afetados pela doença, sendo responsável por mais de 99% dos casos que ocorrem no continente americano. Em pacientes susceptíveis a doença pode se manifestar através de alterações como hepatoesplenomegalia e hiperesplenismo, podendo levar ao óbito do paciente em decorrência de coinfeções e hemorragias (ANVERSA et al., 2018; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; DOS-SANTOS et al., 2014).

O baço um dos órgãos alvo da doença, que apresenta alterações estruturais e na celularidade associados com a gravidade da doença, como o acúmulo de plasmócitos (PC) (SANTANA et al., 2008; SILVA-O'HARE et al., 2016). A diferenciação anômala destas células no baço pode ser decorrente da ativação policlonal, caracterizada por uma inespecificidade dos anticorpos produzidos, além de um processo de imunoregulação com a produção de citocinas que inibem a resposta imune efetiva contra a infecção e favorece a sobrevivência do parasito (SILVA-BARRIOS; CHARPENTIER; STÄGER, 2018). O acúmulo de PC também é descrito em outras doenças crônicas e infecciosas, mas pouco se sabe sobre os mecanismos de geração dessas células.

Neste trabalho, investigamos os eventos moleculares associados com a diferenciação de PC de forma sequencial, através da avaliação do perfil transcriptômico do baço, e correlacionamos esses mecanismos moleculares com as alterações histopatológicas observadas na celularidade de célula B (linfócito B-LyB) e PC, pela técnica de imuno-histoquímica (IHQ).

1.1 LEISHMANIOSE VISCERAL

A leishmaniose é uma doença infecciosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*. A transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebótomos do gênero *Lutzomyia* (no novo mundo) ou *Phlebotomus* (no velho mundo), que inoculam na derme do hospedeiro as formas promastigotas. O parasito possui duas formas evolutivas: a forma flagelar chamada de promastigota, presente exclusivamente no vetor invertebrado, e a forma aflagelar amastigota, uma forma intracelular obrigatória, presente no hospedeiro vertebrado (ANVERSA et al., 2018; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). O ciclo de transmissão reinicia quando os flebótomos adquirem as formas amastigotas de células infectadas do

hospedeiro. No intestino do inseto as amastigotas se transformam em promastigota e então, migram para a probóscide do flebótomo dando continuidade ao ciclo (ANVERSA et al., 2018; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

A doença possui um amplo espectro clínico com diferentes formas de manifestação, que vai desde lesões cutâneas localizadas ou difusas pelo corpo (Leishmaniose cutânea), até uma forma disseminada, em que ocorre a visceralização da infecção e o comprometimento de órgãos internos (LV). A apresentação clínica da doença vai depender da espécie do parasito e fatores genéticos inerentes ao hospedeiro (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

A LV é endêmica em mais de 60 países, sendo que o continente americano, a região do leste africano e a Índia subcontinental são as regiões mais afetadas pela doença. Além disso, o Brasil é responsável por mais de 99% dos casos relatados na América (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). No Brasil, mesmo com as restrições impostas pela pandemia de COVID-19 foram registrados 1.933 casos da doença em 2020. Só a região Nordeste foi responsável por aproximadamente 50% dos casos (959 casos), e mesmo na disponibilidade de um tratamento houve 165 óbitos, com uma taxa de letalidade de 9,5% (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Sendo que as principais causas associadas aos óbitos são as coinfeções e sangramentos (ANVERSA et al., 2018; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

A doença é causada pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum*, sendo essa última a responsável pelos casos da doença nas Américas, que tem como principal reservatório o cão doméstico (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Uma vez inoculado na derme do hospedeiro o parasito é fagocitado por células, principalmente os macrófagos (MΦ) e células dendríticas (*dendritic cells* - DCs), que migram para órgãos como medula óssea, fígado e baço, os principais órgãos afetados pela doença (BRASIL; ANVERSA et al., 2018; KUMAR; NYLÉN, 2012; VOLPEDO et al., 2021). Os sintomas mais comuns são: febre persistente, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia e caquexia, em decorrência do comprometimento dos órgãos alvo da infecção (BRASIL; ANVERSA et al., 2018; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

A apresentação clínica da doença também vai depender da fase de infecção, que varia entre uma fase inicial chamada de fase “aguda”, com início da sintomatologia, incluindo principalmente febre, palidez cutâneo-mucosa, muitas vezes histórico de tosse e diarreia, além de hepatoesplenomegalia. Alguns pacientes apresentam um quadro clínico discreto neste período, caracterizando a forma oligosintomática, de curta duração que normalmente evolui para a cura espontânea. Há também um período de estado da doença (fase de sintomas mais

característicos), com febre irregular, palidez, aumento da hepatoesplenomegalia e emagrecimento progressivo, apresentado de forma “arrastado” com mais de dois meses de evolução. E o período final, em que a doença evolui progressivamente com febre contínua e uma piora do estado geral, caracterizado por desnutrição, anasarca e hemorragias, podendo evoluir para o óbito (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A forma clássica de diagnóstico da LV é pela detecção das formas amastigotas nos tecidos, através de microscopia ótica ou cultura. Sendo que o poder de detecção do parasito em lâmina histológica vai depender do órgão utilizado no exame (BRASIL; ANVERSA et al., 2018; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). O baço é o órgão com maior taxa de sensibilidade no teste, com 90%, seguido de medula óssea (50-80%) e fígado/linfonodos (45%). Portanto, o aspirado esplênico é considerado padrão ouro para o diagnóstico da LV. No entanto, neste procedimento há um grande risco de hemorragia em decorrência da coleta, sendo uma limitação para utilização do teste (BRASIL; ANVERSA et al., 2018; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). O sangue possui baixa sensibilidade, exceto para pacientes coinfectados com o vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus – HIV*) devido ao alto parasitismo (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

A outra forma de diagnóstico é com a utilização de testes sorológicos, como ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA*), imunofluorescência e aglutinação direta ou por técnicas de biologia molecular, o *western blot* ou reação em cadeia da polimerase (PCR). Este último também é útil na identificação da espécie responsável pela infecção. Além disso, há os testes imunocromatográficos como o teste rápido com antígeno recombinante K39, sendo esse, o teste mais usado e recomendado pelo ministério da saúde no Brasil, com uma taxa de sensibilidade entre 86-100% e 82-100% de especificidade (BRASIL; ANVERSA et al., 2018; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

No Brasil, para o tratamento da LV o medicamento de primeira linha é o antimonial pentavalente, (Pentostam ou Glucantine) que possui uma taxa de efetividade de quase 90%, entretanto, possuem alta toxicidade para órgãos como coração, fígado e rim, e por isso, não são recomendados para pacientes com alguma disfunção nesses órgãos ou gestantes, devido efeitos teratogênicos (BRASIL; ANVERSA et al., 2018). Para o grupo de pacientes em que não é possível administrar os antimoniais pentavalentes ou nos casos de falha terapêutica, é utilizado a segunda linha de tratamento com anfotericina B e pentamidinas. A anfotericina B lipossomal possui menos efeitos colaterais e é recomendada para os grupos sensíveis aos efeitos adversos (BRASIL; ANVERSA et al., 2018). Após o tratamento, o paciente pode voltar a apresentar

sintomatologia dentro do período de 12 meses depois da cura, caracterizando um quadro de recidiva da doença (BRASI; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

1.1.1 Resposta imune na leishmaniose visceral

A maior parte dos pacientes com LV são assintomáticos e não desenvolvem a doença, caracterizados pela positividade em testes (sorológicos ou de reação cutânea), mas ausência de sintomatologia. Enquanto uma minoria desenvolve a forma ativa da doença, que se não for tratada é fatal. Ainda não está totalmente claro os fatores associados com a progressão da doença, mas já se sabe que fatores ambientais e socioeconômicos como a desnutrição que afeta o desenvolvimento da resposta imune, além da interação entre parasito e aspectos genéticos/imunológicos do hospedeiro estão relacionados (DAYAKAR et al., 2019; FALEIRO et al., 2014; KUMAR; NYLÉN, 2012).

As células mononucleares de sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cells* – PBMC) de pacientes assintomáticos ou com infecção subclínica apresentam produção de interleucina (IL) 2, IL-12 e interferon gama (INF- γ), em resposta ao estímulo com antígenos de *Leishmania*. Sendo que a neutralização de IL-12 interrompeu a proliferação e produção de INF- γ neste grupo (DAYAKAR et al., 2019; KUMAR; NYLÉN, 2012). Da mesma forma, o PBMC dos pacientes com forma ativa não são proliferantes e nem capazes de produzir o INF- γ , mesmo sob estímulo antigênico. Apenas no sangue total dos pacientes com LV estimulados com antígenos foi observado a produção do INF- γ (FALEIRO et al., 2014; KUMAR; NYLÉN, 2012).

Após a cura da LV as PBMC dos pacientes apresentam capacidade proliferativa, produção de INF- γ e do fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor* – TNF) com estímulo de antígeno. Sendo que a co-cultura das PBMC do período de antes do tratamento com a PBMC após o tratamento, demonstra um efeito supressor da proliferação das células na fase ativa da doença (DAYAKAR et al., 2019; FALEIRO et al., 2014; KUMAR; NYLÉN, 2012).

Por um tempo a resposta contra a LV foi associada com a imunidade mediada por células T (linfócitos T-LyT) auxiliaadoras do tipo (*T helper* – Th) 2, com a produção de IL- 4 e IL-13. Entretanto, foi demonstrado que também há a produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias encontradas no sangue dos casos de LV, como IL-1, IL-6, IL-8, IL-15, quimiocina C-X-C ligante (CXCL) 10, CXCL9, além das já mencionadas (IL-12, INF- γ e TNF- α). O que demonstra que a doença não é unicamente mediada pela resposta Th2 (FALEIRO et al., 2014;

KUMAR; NYLÉN, 2012; SAMANT et al., 2021). Apesar de que a resposta inflamatória Th1 possui um efeito protetor na infecção por *Leishmania*, enquanto a resposta anti-inflamatória Th2 vai ser permissiva à infecção, mediada pela produção de IL-4, IL-10 e fator de crescimento transformante beta (*transforming growth factor beta* - TGF- β) (DAYAKAR et al., 2019; SAMANT et al., 2021).

Pacientes com LV demonstram elevados níveis de IL-10 no sangue e aumento da expressão a nível tecidual (baço, medula óssea e linfonodos). Um dos principais efeitos desse aumento é a regulação da atividade de M Φ , permitindo a replicação do parasito nessas células. A IL-10 torna os M Φ não respondedores aos sinais de ativação e causa a inibição da produção do TNF- α e óxido nítrico (*nitric oxide*-NO), prejudicando a atividade microbicida deles. Estudos com o bloqueio de IL-10 demonstraram a restauração da produção de INF- γ , TNF- α e as atividades de M Φ , com redução do parasitismo. De forma similar, a produção aumentada de TGF- β que ocorre durante a LV possui efeito modulador na resposta de M Φ e capacidade de eliminação do parasito (DAYAKAR et al., 2019; FALEIRO et al., 2014; KUMAR; NYLÉN, 2012; SAMANT et al., 2021).

Células Th17 tem demonstrado um importante papel protetivo durante a LV, mediado pela liberação das citocinas IL-17 e IL-22 que agem no recrutamento de neutrófilo, aumento da expressão de mediadores inflamatórios inatos e diminuição da carga parasitária (DAYAKAR et al., 2019; FALEIRO et al., 2014; KUMAR; NYLÉN, 2012; SAMANT et al., 2021). Entretanto, também já foi observado o aumento circulante de IL-27, bem como, da expressão dessa citocina em baço de pacientes com LV, além também do aumento da expressão de IL-21. Sendo que a IL-27 possui um efeito modulador da resposta Th17 e é capaz de induzir LyT reguladores do tipo 1 (*type 1 regulatory T cell* – Tr1). A IL-21 em sinergismo induz o aumento da produção de IL-10 pela Tr1 (DAYAKAR et al., 2019; FALEIRO et al., 2014; KUMAR; NYLÉN, 2012; SAMANT et al., 2021).

1.1.1.1 Células do sistema imune inato

Os neutrófilos são as primeiras células do sistema imune inato recrutadas para o local da picada, devido a fatores do hospedeiro, do parasito e do próprio inseto. Estas células vão desempenhar sua função imune através da fagocitose da *Leishmania*, formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (*neutrophil extracellular traps* - NETs) e pela liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (*reactive oxygen species* - ROS e *reactive nitrogen species* -

RNS), seja no sítio inflamatório ou no interior dos fagolisossomos (VOLPEDO et al., 2021). Além disso, os neutrófilos possuem papel na regulação da resposta adaptativa, podendo favorecer a indução da resposta de LyT através da liberação de IL-12, INF- γ e TNF- α ou inibindo-a, pela secreção de substâncias anti-inflamatórias como IL-10, TGF- β e tromboxano A2 (VOLPEDO et al., 2021).

Assim como os neutrófilos, os monócitos são as primeiras células recrutadas após a infecção por *Leishmania*, devido a liberação de citocinas pro-inflamatórias e quimiocinas, como o receptor de quimiocina C-C (*C-C receptor* - CCR) do tipo 2, uma das moléculas envolvidas no recrutamento de monócitos inflamatórios (*inflammatory monocytes* - iMOs). O reconhecimento pelos receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors* - TLR) 2 e 4 nos iMOs em sinergismo com a sinalização mediada pela liberação de IFN- γ por neutrófilos, leva a produção de TNF- α e ativação do poder microbicida dos monócitos. A regulação da expressão de ambos TLR2 e TLR4 que ocorre em decorrência da infecção por *Leishmania*, inibem a fagocitose e o *burst* respiratório, além de promover a secreção de IL-10 e perfil anti-inflamatório dos monócitos (VOLPEDO et al., 2021).

Os iMOs podem migrar para órgãos como baço e fígado, local onde podem adquirir o fator induzível por hipóxia 1 alfa (*hypoxia-inducible factor* - HIF-1 α), induzindo um fenótipo do tipo *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) que são mais permissivas a infecção e favorecendo a cronicidade da doença. Enquanto monócitos com perfil anti-inflamatório ajudam na formação de granulomas nos dois órgãos, contribuindo para o controle da infecção pela liberação de IL-13 e IL-4 (VOLPEDO et al., 2021).

Os M Φ são os principais hospedeiros celulares da *Leishmania* e podem estar presentes no sítio de infecção devido a diferenciação de monócitos presentes no local ou serem atraídos de outros sítios para o local de infecção através de quimiocinas liberadas por neutrófilos (VOLPEDO et al., 2021).

Os iMOs normalmente se diferenciam em M Φ de perfil inflamatório (M1/via clássica). Sendo que o reconhecimento do gp63 presente na superfície da *Leishmania* pelos TLRs causam o translocamento do fator nuclear kappa B (*nuclear factor kappa B*-NF- κ B) e consequentemente a liberação de IL-12, TNF- α e a produção de espécies reativas (ROS e RNS) nos M Φ M1, atuando no controle da *Leishmania* (VOLPEDO et al., 2021). Por outro lado, os monócitos anti-inflamatórios consequentemente tendem a se diferenciar nos M Φ anti-inflamatórios (M2/via alternativa), que são produtores de IL-10 e IL-4, e causam a redução da produção do NO e inibição da ativação mediada por IFN- γ . Além disso, foi demonstrado a

capacidade de *L. infantum* em induzir a diferenciação para o perfil M2 de MΦ, bem como, um predomínio deste perfil na infecção por *L. donovani* (VOLPEDO et al., 2021).

As DCs são células apresentadoras de antígeno profissionais, que migram para tecidos linfoides secundários para realização da apresentação de antígeno aos LyT. Sendo que a sinalização por IL-12 mediada por DCs possuem um papel importante na polarização de células Th1 produtoras de IFN- γ . Entretanto, a *Leishmania* é capaz de liberar substâncias capazes de modular a produção desta citocina pelas DCs, sendo um achado em estágios crônicos da doença a presença dessas células com produção regulada de IL-12 (VOLPEDO et al., 2021).

1.1.1.2 Células T e B

Os LyT CD (*cluster of differentiation*) 4⁺ desempenham papel na proteção contra *Leishmania* principalmente pela produção das citocinas inflamatórias efetoras (TNF- α e IL-12), além da função dos LyT CD8⁺ em mediar a resposta contra o parasito pela produção de IFN- γ , granzimas e perforinas, induzindo a morte de células infectadas. Apesar de que ambos os fenótipos de LyT podem exibir um perfil de exaustão durante a LV, comprometendo a reposta imune celular mediada por essas células e facilitando a persistência e progressão da doença (KUMAR; NYLÉN, 2012; SAMANT et al., 2021).

Os LyB estão envolvidos na exacerbação da LV, favorecendo a susceptibilidade à infecção. Desde que a depleção de LyB contribui para a resistência contra o parasito. Isto ocorre principalmente pela ativação policlonal destas células, caracterizada por uma expansão inespecífica de LyB que resulta na produção de citocinas imunomoduladoras e anticorpos (AC) inespecíficos, em resposta a exposição de antígenos do parasito. A hipergamaglobulinemia, com a produção de AC de baixa especificidade contra o parasito e a produção de IL-10 são achados característicos que ocorrem na LV (KUMAR; NYLÉN, 2012; SILVA-BARRIOS; CHARPENTIER; STÄGER, 2018).

A IL-10 produzida por LyB durante a LV é capaz de suprimir a resposta Th1, contribuindo para a susceptibilidade. Além disso, os AC podem contribuir para a piora da doença pela formação de imunocomplexos (KUMAR; NYLÉN, 2012; SILVA-BARRIOS; CHARPENTIER; STÄGER, 2018).

1.1.2 Regulação gênica na leishmaniose visceral

Durante a LV ocorre a regulação na diferenciação e produção de citocinas em LyT CD4+ através da expressão diferencial de microRNAs (miRNA). O silenciamento do miRNA-21 induz o aumento de IL-12 em DCs infectadas por *L. donovani*. Além disso, já foi relatado a inibição por miRNA do gene notch 3 na leishmaniose, sendo esse gene responsável pela produção de INF- γ , favorecendo a sobrevivência do parasito (SAMANT et al., 2021).

A regulação negativa de alguns miRNA favorece a diferenciação de LyT naive para o perfil Th2 e a produção de IL-4 e IL-13 por essas células. Da mesma forma, a regulação negativa de miRNA (miRNA-93-3p e 486a-3p) que regulam STAT 5 e 6 estão associados com a indução da diferenciação do perfil Th2. Sendo que estes miRNA também estão regulados negativamente em LyT CD4+ durante a infecção, demonstrando uma regulação e indução da resposta anti-inflamatória de LyT na infecção por *Leishmania* (SAMANT et al., 2021).

Nosso grupo avaliou o perfil transcricional do baço de hamsters infectados por *L. infantum*, em que foi observado a expressão diferencial de um gene após um mês de infecção, chamado de Ligante de Notch Não Canônico Tipo Delta 1 (Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1 - Dlk1 [gene]). Houve uma inversão da expressão de DLK1 (transcrito) com maior tempo de infecção, que passou de hiperexpresso (com um mês) para hipoexpresso em estágio final da doença (cinco meses) (VILAS et al., 2021). Em outro trabalho, foi demonstrado que depleção gênica de Dlk1 leva a diminuição de LyB foliculares (FO) no baço e aumento da expressão de imunoglobulina (Ig) G1 e IgG3 (RAGHUNANDAN et al., 2008). Sendo que ambas as alterações são compartilhadas pela infecção por *Leishmania*, em que se observa atrofia folicular pela diminuição de LyB FO e hipergamaglobulinemia (SANTANA et al., 2008; SILVA et al., 2012; SILVA-BARRIOS; CHARPENTIER; STÄGER, 2018; SILVA-O'HARE et al., 2016).

O transcriptoma esplênico de animais infectados também demonstrou a hiperexpressão de genes relacionados com a regulação do tráfego de leucócitos e processo inflamatório, como o recrutamento de granulócitos e quimiotaxia de leucócitos na fase inicial da doença. No entanto, com mais tempo de infecção ocorreu uma mudança nesta assinatura e modulação da quimiotaxia de LyT, pela redução de IL-12b e quimiocina C-C ligante [CCL] 21, bem como, a diminuição da expressão de moléculas envolvidas com a organização do baço, como CCL19, CCR7, CCR6, CXCL13, LT α e C-X-C receptor (CXCR) 5, em estágio final da doença. Além disso, neste estágio de doença foi observado a hiperexpressão de CDKN2A (um regulador do

ciclo celular), que foi apontado como o responsável pela alteração da sinalização da organização do microambiente esplênico (VILAS et al., 2021).

1.1.1.3 DLK1

O DLK1 (proteína) é uma glicoproteína de transmembrana pertencente ao grupo de proteínas chamado de Família do Fator de Crescimento Epidérmico (Epidermal Growth Factor [EGF] – like Family), por conter repetições de subunidades EGF em sua porção extracelular. Esta molécula serve como um ligante de receptores da via notch de sinalização (FALIX et al., 2012; TRAUSTADÓTTIR et al., 2019a). Sendo que a via delta-notch composta pelos receptores notch 1-4 e seus ligantes, estão envolvidos com processos de diferenciação e proliferação celular, desempenhando papel no desenvolvimento de tecidos embrionários e especificação celular (*cell fate decision*) (FALIX et al., 2012; TRAUSTADÓTTIR et al., 2019a; VANDERBECK; MAILLARD, 2021).

A expressão de DLK1 ocorre principalmente durante o período fetal e após o nascimento fica restrito basicamente aos tecidos endócrinos/neuroendócrinos. O aumento da expressão de DLK1 em tecidos adultos está relacionado com malignidades, diferenciação terminal de células e estudos recentes apontam para uma possível participação desta molécula em processos regenerativos de órgãos (FALIX et al., 2012; TRAUSTADÓTTIR et al., 2019a). Como relatado anteriormente, DLK1 parece estar envolvido também com a diferenciação terminal de LyB no baço (RAGHUNANDAN et al., 2008).

Apesar de ser um receptor presente na superfície de células, o DLK1 possui um sítio de clivagem que permite a liberação de uma forma solúvel da proteína. De um modo geral DLK1 é considerado como um inibidor da proliferação e diferenciação de células. No entanto, esta atividade é muito controversa, com artigos demonstrando diferentes ações que pode até mesmo ter efeito contrário (induzindo a proliferação ou diferenciação), assim, o efeito de DLK1 vai depender do tipo de célula, forma da proteína e tipo de interação molecular (FALIX et al., 2012; TRAUSTADÓTTIR et al., 2019a).

1.2 BAÇO

A partir da visceralização da *Leishmania*, ocorre o desenvolvimento da resposta imunológica local nos órgãos afetados pela doença, que é específica em cada órgão. Enquanto

o fígado é um local com capacidade de resolução da infecção e de controlar o crescimento parasitário, principalmente pela resposta T-mediada e formação de granulomas, a medula óssea e baço são locais com estabelecimento e cronicidade da infecção, com carga parasitária persistente em praticamente todo período da doença (FALEIRO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2016).

1.2.1 Estrutura e função

O baço é um importante órgão linfoide secundário responsável pela vigilância imunológica de antígenos circulantes na corrente sanguínea, além da função de hemocaterese e reciclagem do ferro (LEWIS; WILLIAMS; EISENBARTH, 2019; MEBIUS; KRAAL, 2005). Localizado no abdômen em contato com o estômago, o baço possui uma cápsula fibrosa de tecido conjuntivo, que se ramifica em estruturas chamadas de trabéculas e adentram o parênquima do órgão (Figura 1, A). Com uma ampla vasculatura, devido uma rede de ramificações dos vasos (artéria e veia esplênica) que o perfundem, criando a maior capacidade de filtração do sangue no organismo (MEBIUS; KRAAL, 2005).

Além disso, ele é composto por duas regiões morfológicas, que vão desempenhar as diferentes funções do órgão. A região de polpa branca (PB), formada majoritariamente por linfócitos, responsável pela função imunológica, e a região de polpa vermelha (PV), povoada principalmente por hemácias e outros leucócitos circulantes, em que ocorre principalmente a atividade hematológica do órgão (Figura 1, A) (LEWIS; WILLIAMS; EISENBARTH, 2019; MEBIUS; KRAAL, 2005).

1.2.1.1 Polpa vermelha

As ramificações da veia esplênica formam os sinusóides, vasos que recebem o sangue proveniente dos cordões, vascularizado pela artéria aferente do baço através de um sistema aberto. Os cordões são as áreas entre os sinusóides compostos por fibroblastos, fibras reticulares e muitos MΦ, com papel na remoção das hemácias senescentes (Figura 1, A) (LEWIS; WILLIAMS; EISENBARTH, 2019; MEBIUS; KRAAL, 2005). Além disso, os cordões possuem muitas células mielóides da imunidade inata, que podem sofrer alteração na sua quantidade e disposição em resposta à processos inflamatórios (LEWIS; WILLIAMS; EISENBARTH, 2019). A PV também representa um local para migração e manutenção de

plasmoblastos e PC, diferenciados primariamente na PB, permitindo a rápida circulação de AC na corrente sanguínea (LEWIS; WILLIAMS; EISENBARTH, 2019; MEBIUS; KRAAL, 2005).

A parede dos sinusóides é formada pelas células endoteliais do vaso, com estrutura descontínua e que possuem uma fibra de estresse na membrana basal celular, responsável pela regulação do espaçamento entre as células adjacentes. A organização das fibras e disposição paralela entre as células endoteliais, forçam a passagem das hemácias entre os espaços criados pela fibra de estresse do endotélio, sendo que os eritrócitos mais velhos se tornam mais rígidos e com baixa flexibilidade para passar por esses espaços, sendo incapazes de adentrar o sinusóide e retornarem à circulação, ficando retido nos cordões (LEWIS; WILLIAMS; EISENBARTH, 2019; MEBIUS; KRAAL, 2005).

A retenção de hemácias senescentes no baço, junto com a sinalização mediada pela perda do CD47 (sinal “não me coma” [*don't eat me*]) ou pela opsonização de AC/sistema complemento dessas células, permitem a eritrofagocitose pela população de MΦ da PV. Este processo de destruição das hemácias compreende um importante aspecto fisiológico para reciclagem e armazenamento do ferro proveniente da hemoglobina (LEWIS; WILLIAMS; EISENBARTH, 2019; MEBIUS; KRAAL, 2005).

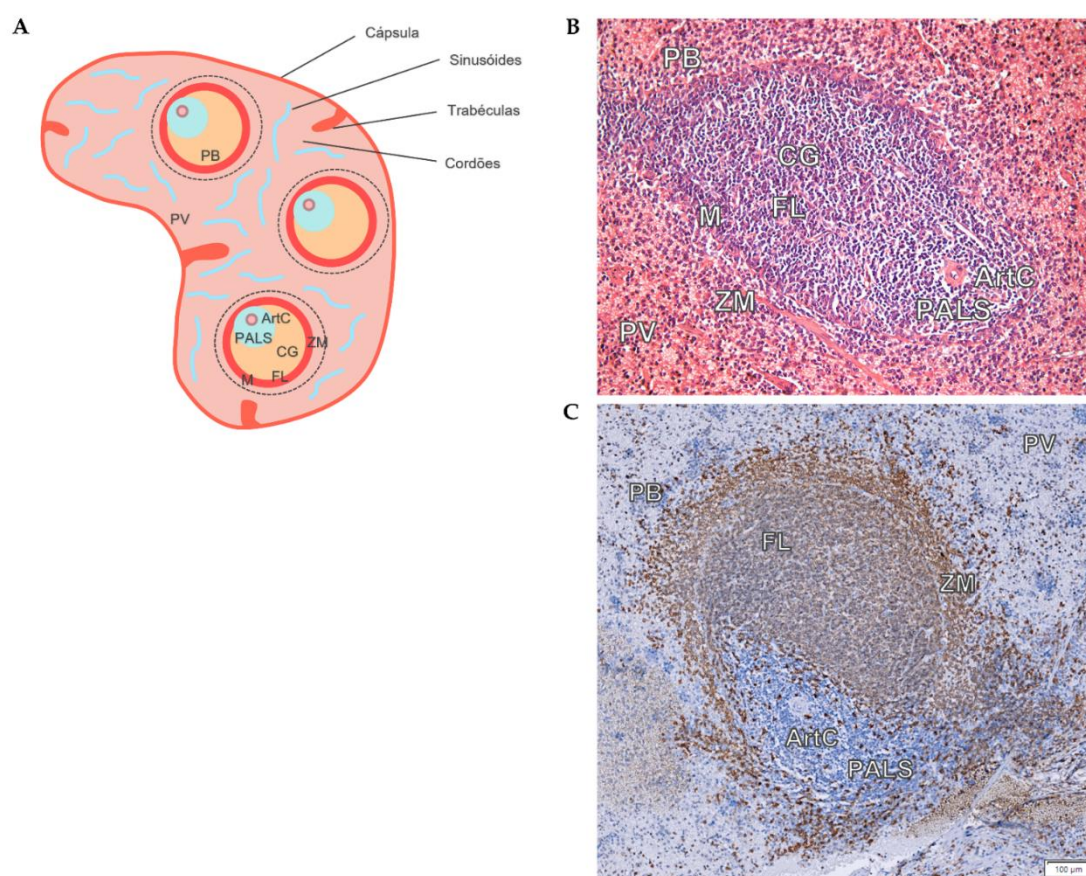
1.2.1.2 Polpa branca

A segunda região do baço possui organização de tecido linfóide similar ao observado em linfonodos, com a compartimentalização de LyT e B. A PB é composta por folículos linfóides (FL) repletos de LyB FO (Figura 1, C), local onde ocorre a expansão clonal dessas células ativadas e maturação da produção de AC por elas (Figura 1). Além de uma outra sub-região, uma área de LyT chamada de bainha linfóide periarteriolar (*periarteriolar lymphoide sheath* – PALS), por estar envolta de uma arteríola central (ArtC). Sendo este último, um local de apresentação antigênica para iniciação da resposta de LyT (Figura 1) (LEWIS; WILLIAMS; EISENBARTH, 2019; MEBIUS; KRAAL, 2005; ORACKI et al., 2010).

Após ativação dos LyB FO eles podem dar origem a estrutura chamada de centro germinativo (CG) nos FL, onde essas células recebem estímulos principalmente dos LyT CD4⁺ folicular (*T helper follicular* – Tfh) e DCs foliculares (*follicular dendritic cells* – FDCs), que auxiliam a diferenciação e refinamento da resposta mediada por AC (Figura 1, A e B) (NUTT et al., 2015; ORACKI et al., 2010; SHAPIRO-SHELEF; CALAME, 2005; ZHANG; GARCIA-

IBANEZ; TOELLNER, 2016). A presença do CG é observada em lâmina histológica corada por Hematoxilina e Eosina (H&E) e se caracterizam pelo centro do FL mais claro, formado por LyB FO maiores (Figura 1, B). No FL também há uma região chamada de manto (M), formando uma espécie de anel contornando a região do CG, constituído de LyB menores (Figura 1, A e B) (BROZMAN, 1985; CESTA, 2006).

Diferente dos linfonodos, a PB do baço não possui uma cápsula separando as regiões de linfócitos do parênquima do órgão (PV). Há apenas uma zona intermediária composta por células que separam as duas regiões contornando toda a PB, chamada de zona marginal (ZM) (Figura 1), bem definida nos modelos de roedores (LEWIS; WILLIAMS; EISENBARTH, 2019; MEBIUS; KRAAL, 2005; ORACKI et al., 2010).



PB – Polpa branca; **PV** – Polpa vermelha; **ArtC** – Arteríola central; **PALS** – bainha linfóide periarteriolar; **CG** – Centro germinativo; **M** – Manto; **FL** – Folículo linfóide; **ZM** – Zona marginal.

Figura 1 - Estrutura do baço de hamsters. (A) – Ilustração esquemática histológica do baço. (B) – Micrografia do baço de hamster por coloração em H&E, com a identificação das regiões de PB e PV (aumento 20x). (C) – Marcação de IHQ para LyB (CD20) em baço de hamster, com a identificação das regiões de PB e PV (barra de escala 100µm).

Imagem: Autoria própria

Fonte: (HERMIDA et al., 2018; LEWIS; WILLIAMS; EISENBARTH, 2019; MEBIUS; KRAAL, 2005)

Na ZM da PB ocorre o trânsito/recirculação de células e antígenos do sangue, um importante processo para a vigilância imunológica exercida pelos órgãos linfoides secundários. Este aspecto da ZM se deve a presença e perfusão pela ArtC. Ela possui também duas subpopulações de MΦ, chamados de MΦ de zona marginal (MZM) e MΦ metalofílicos de zona marginal (MMM), além de uma subpopulação de LyB do tipo inata, os LyB de zona marginal (LyB ZM), sendo que esse conjunto de células desempenham função na apresentação antigênica aos LyB FO e LyT da PB (LEWIS; WILLIAMS; EISENBARTH, 2019; MEBIUS; KRAAL, 2005; ORACKI et al., 2010).

A organização da PB é mantida por uma rede de sinalização de quimioatratores, responsáveis pela localização correta de LyT e B em suas respectivas áreas, sendo esta organização um aspecto importante para a resposta imunológica do órgão (LEWIS; WILLIAMS; EISENBARTH, 2019; MEBIUS; KRAAL, 2005; ORACKI et al., 2010).

A PALS é mantida pela liberação de CCL19 e CCL21 que se ligam ao receptor CCR7 nos LyT. Estas quimiocinas são produzidas pelas células estromais da PALS e em menor quantidade pelas DCs. Enquanto a manutenção e migração de LyB para a formação do FL é exercida pela CXCL13, produzida pelas FDCs que é reconhecido pelo LyB através do receptor CXCR5 (LEWIS; WILLIAMS; EISENBARTH, 2019; MEBIUS; KRAAL, 2005; ORACKI et al., 2010). A expressão destas citocinas e organização da PB são controladas pela linfotóxina- $\alpha_1\beta_2$ (*lymphotoxin- $\alpha_1\beta_2$* – LT- $\alpha_1\beta_2$) e seus receptores (LT- β R e TNFR1). Sendo que a expressão de LT- $\alpha_1\beta_2$ pelo LyB e conseqüentemente o reconhecimento através dos receptores nas células estromais, induzem o translocamento de NF- κ B e a secreção destas quimioquinas (MEBIUS; KRAAL, 2005).

A expressão de receptores para esfingosina 1-fosfato (SIP₁ e SIP₃ [*Sphingosine-1-phosphate* – SIP]) nos LyB ZM vão ter função na retenção dessas células nessa região. Sendo que a sinalização mediada por estes receptores impede a reposta de LyB à CXCL13. No momento de estímulo antigênico, em que ocorre conseqüentemente regulação negativa da expressão de ambos SIP₁ e SIP₃, há a restauração da capacidade de LyB ZM em responder ao estímulo de CXCL13, permitindo o encontro dessas células com os LyB FO (CERUTTI; COLS; PUGA, 2013; MEBIUS; KRAAL, 2005; PILLAI; CARIAPPA, 2009).

1.2.2 Baço na leishmaniose visceral

Durante algumas infecções por microrganismos ocorrem alterações na organização do baço. Dentre estes microrganismos capazes de induzir a desorganização esplênica estão as espécies de *Leishmania* com capacidade de visceralização (*L. donovani* e *L. infantum*) (HERMIDA et al., 2018).

As alterações nos compartimentos esplênicos ocorrem de maneira sequencial, como demonstrado na infecção por *Leishmania* experimental de hamster. Inicialmente os FL sofrem uma hiperplasia reativa, que progride para uma atrofia e rompimento da estrutura folicular, podendo ainda ser acompanhada de um acúmulo de material hialino. Além disso, as regiões do M e ZM responsáveis pelos delineamentos das regiões de PB também se desfazem duramente a LV grave, tornando difícil a identificação dos compartimentos da PB, bem como, a distinção e separação entre as regiões de PB e PV (HERMIDA et al., 2018).

Uma proposta de classificação do baço segundo a organização estrutural histológica foi proposta por Santana e colaboradores (2008) e revista por Hermida e colaboradores (2018). Segundo está proposta, aqueles com as sub-regiões bem definidas foram considerados como organizados (ou tipo 1), enquanto os baços com baixa capacidade de se identificar e individualizar as regiões, além da ausência de folículos secundários (com presença de CG), foram considerados como moderadamente/extensivamente desorganizado (ou tipo 3). Baços que não são capazes de se enquadrar em nenhuma destas categorias e que apresentem algum grau de alteração hiper ou hipoplásica foram considerados como levemente desorganizado (tipo 2).

A esplenomegalia é uma das principais características da LV. Sendo que este aumento do baço está associado a uma exacerbação de algumas funções do órgão, dando origem ao hiperesplenismo, uma síndrome caracterizada por anemia e acompanhada de uma baixa contagem de plaquetas e leucócitos (DOS-SANTOS et al., 2014).

Cães naturalmente infectados e com a forma grave de LV apresentam a desorganização do baço, com uma baixa proporção PB/PV. As regiões de LyB foram as principais áreas afetadas com a desorganização, com um tamanho quase 4 vezes menor para o FL e aproximadamente 2 vezes menor para a região de ZM nos animais infectados, comparado com animais sem infecção (SILVA et al., 2012). Esta desorganização do baço está associada à importantes alterações na celularidade, com a diminuição de LyB (CD79 α^+) no FL em decorrência da diminuição de CXCL13, observada nos cães com a doença. A diminuição de

CXCL13, por sua vez, ocorre devido a diminuição de FDCs, uma importante fonte dessa quimiocina que também já foi relatada na infecção por *Leishmania* (SILVA et al., 2012).

Os LyT do baço também são afetadas durante a infecção natural por *Leishmania*. Houve a diminuição de células CD3⁺ no FL e de células CD4⁺ no baço de cães com LV e desorganização. Sendo que nestes animais também foi observado aumento do apoptose de LyT (DA SILVA et al., 2018; LIMA et al., 2012). Além disso, em hamsters experimentalmente infectados também ocorreu a diminuição de LyT na PALS, induzida por uma diminuição na quimiotaxia dessas células no baço (VILAS et al., 2021).

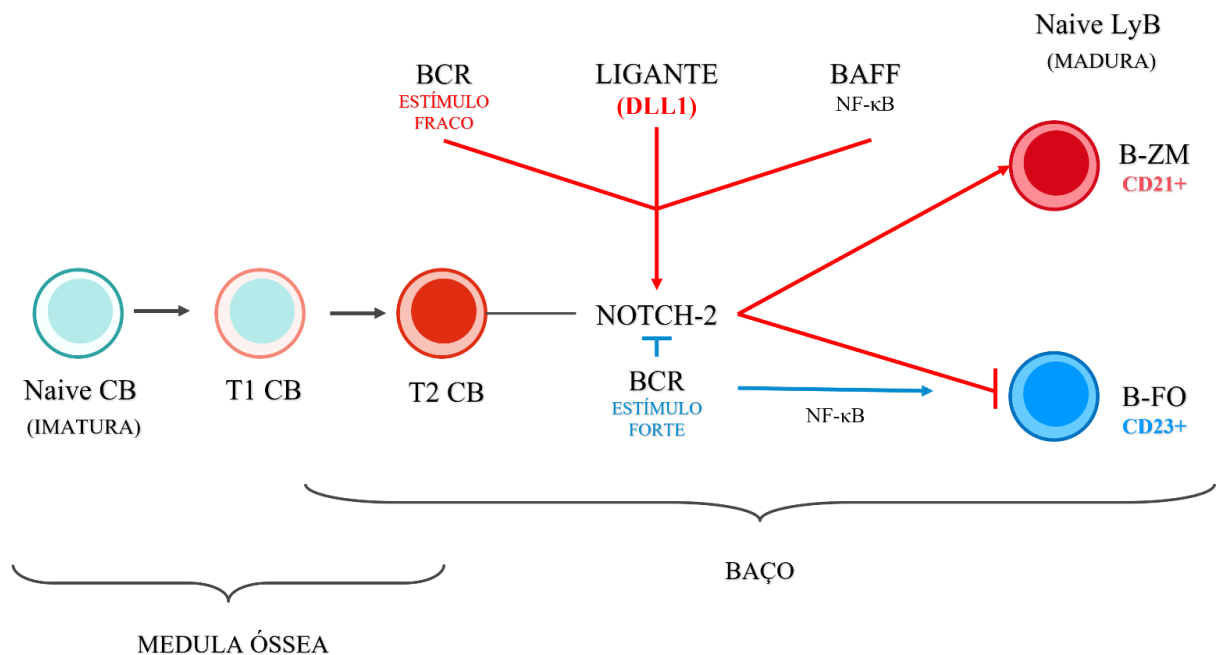
Durante a LV associado com a desorganização, ocorre um repovoamento de células na PV e a presença de agregados de PC se torna mais frequente nessa região. A maioria destas células são produtoras de IgG e são possivelmente responsáveis pela disproteinemia, caracterizada por uma hipergamaglobulinemia que ocorre em cães com LV. A plasmocitose na PV ocorre possivelmente pelo aumento de citocinas como o fator de ativação de célula B (*B-cell activating factor* – BAFF), o ligante indutor de proliferação (*proliferation-inducing ligand* – APRIL) e CXCL12 no baço, levando a retenção e prolongamento da sobrevivência dos PC no órgão (SANTANA et al., 2008; SILVA et al., 2012; SILVA-O'HARE et al., 2016).

A desorganização e alterações no baço estão associadas com uma maior gravidade da LV. Cães com baço tipo 3 têm mais sinais clínicos da doença e mais alterações nos exames laboratoriais do que os animais com infecção ativa e baço organizado. Da mesma forma, pacientes que vieram a óbito pela doença, apresentam tais alterações como desorganização da PB e plasmocitose na PV. Além disso, pacientes que foram a óbito com LV apresentavam com mais frequência a desorganização do baço do que pacientes que foram a óbito por outras doenças crônicas (HERMIDA et al., 2018).

1.3 DIFERENCIAÇÃO DE PLASMÓCITOS NO BAÇO

Após a diferenciação de células tronco hematopoiéticas e o desenvolvimento inicial de LyB na medula óssea, essas células imaturas (estágio transicional – T1/T2) podem migrar para o baço para diferenciação terminal, dando origem as subpopulações de LyB maduras que compõem a PB. Sendo que os dois principais fenótipos são os LyB FO (CD23⁺) e LyB ZM (CD21⁺), que compõem respectivamente as regiões do FL e ZM (PILLAI; CARIAPPA, 2009; SHAPIRO-SHELEF; CALAME, 2005).

O comprometimento celular e diferenciação para um determinado fenótipo vai depender principalmente do estímulo do receptor de LyB (*B cell receptor* -BCR), a participação de um receptor da família notch (NOTCH2) e da sinalização mediada pelo fator de transcrição NF- κ B. Um baixo estímulo ao BCR favorece a sinalização mediada pelo receptor NOTCH2, induzida pelo reconhecimento do seu ligante (*Ligante de Notch Canônico Tipo Delta*-DLL1) expresso pelas células endoteliais de vasos da PV, que em sinergismo com o reconhecimento de BAFF, induz a sinalização mediada pelo NF- κ B e favorece a diferenciação de célula B T2 para o fenótipo de LyB ZM, em detrimento da diferenciação dos LyB FO (Figura 2). Enquanto um forte reconhecimento e estímulo do BCR leva o bloqueio da via NOTCH2 de sinalização e induz a sinalização mediada por NF- κ B, favorecendo a diferenciação para LyB FO (Figura 2) (PILLAI; CARIAPPA, 2009).



CB – Célula B; **T1/T2 CB** – Célula B transicional; **BCR** – Receptor de célula B; **DLL1** – *Ligante de Notch Canônico Tipo Delta*; **B-ZM** – Célula B de zona marginal; **B-FO** – Célula B folicular.

Figura 2 - Diferenciação terminal de células B no baço. Um forte estímulo ao receptor BCR inibe a via NOTCH2 de sinalização e favorece a diferenciação mediada por NF- κ B para o fenótipo de LyB FO. Enquanto um baixo estímulo do receptor BCR é permissivo a sinalização por NOTCH2, induzida pelo reconhecimento de seu ligante DLL1, que em sinergismo com a sinalização de BAFF mediada pela expressão do NF- κ B, induzem a diferenciação para LyB ZM.

Imagem: Elaboração do autor

Fonte: (PILLAI; CARIAPPA, 2009; SHAPIRO-SHELEF; CALAME, 2005)

Além de ocupar regiões distintas da PB, as duas subpopulações de LyB do baço desempenham diferentes funções na imunidade mediada por AC. Os LyB ZM são células não circulantes, sendo as primeiras células que respondem rapidamente aos antígenos de maneira

T-independente (TI), sem a necessidade de co-estímulo provindo dos LyT. Enquanto os LyB FO vão desempenhar principalmente a resposta do tipo T-dependente (TD) para a produção de AC mais específicos. Ambos os dois fenótipos de LyB podem desenvolver os dois tipos de resposta, no entanto, há uma tendência do LyB ZM em desenvolver uma resposta TI e os LyB FO uma resposta TD (LEWIS; WILLIAMS; EISENBARTH, 2019; NUTT et al., 2015; ORACKI et al., 2010; SHAPIRO-SHELEF; CALAME, 2005).

A maior responsividade dos LyB ZM aos antígenos e rápida diferenciação em PC, independente do estímulo de LyT, ocorre em parte devido a expressão diferencial de fatores de transcrição relacionados com a diferenciação de PC (como BLMP1) nos LyB ZM. Além disso, os LyB ZM expressam um conjunto de receptores como CD21 (receptor de complemento 2), CD1d (uma molécula apresentadora similar ao complexo de histocompatibilidade [MHC] do tipo I), CD38 (ADP-Ribosil Ciclase 1), que estão associadas com a captura de antígenos, além da expressão de moléculas co-estimuladoras de LyT (CD80 e CD86) (ORACKI et al., 2010; SHAPIRO-SHELEF; CALAME, 2005).

O reconhecimento e ativação dos LyB ZM induz a migração deles através da PALS em direção a PV, onde passam por processos de proliferação e diferenciação celular, dando origem a agregados de plasmoblastos (foco extrafolicular) produtores de AC, que terminam se diferenciando em PC de vida curta. Apesar de ser uma resposta rápida, importante no combate inicial à patógenos, este tipo de resposta não passa pela mutação somática induzida pelos LyT, o que faz os AC produzidos por essas células serem de baixa afinidade aos antígenos. Como sugere o nome, estes PC de vida curta entram em apoptose após 8 dias de imunização (Figura 3, A-C) (ORACKI et al., 2010; SHAPIRO-SHELEF; CALAME, 2005).

Os LyB FO ativados por antígenos migram para a borda do FL, na interface entre as duas regiões de LyB e LyT (PALS), mediado pelo aumento da expressão de CCR7 nessas células. Neste local os LyB FO recebem estímulos de Thf ativadas (para o mesmo antígeno do LyB), que passam a expressar CXCR5, e por isso, migram também para a interface entre PALS e FL, permitindo o encontro entre essas células e a co-estimulação por elas para a diferenciação e proliferação dos LyB (Figura 3, 1) (LEWIS; WILLIAMS; EISENBARTH, 2019; ORACKI et al., 2010; SHAPIRO-SHELEF; CALAME, 2005; ZHANG; GARCIA-IBANEZ; TOELLNER, 2016). Um dos estímulos fornecido pelo LyT neste contato é a liberação de IL-21, que exerce papel na formação do foco extrafolicular e no suporte para diferenciação em PC (Figura 3, 1) (LEWIS; WILLIAMS; EISENBARTH, 2019; ORACKI et al., 2010; ZHANG; GARCIA-IBANEZ; TOELLNER, 2016).

Após a interação com os LyT, os LyB FO podem seguir duas vias distintas de diferenciação em PC: uma via similar a descrita acima (para LyB ZM), com a formação de um foco extrafolicular e produção de AC de baixa afinidade; ou uma segunda via, com o retorno desta célula para o interior do FL, dando origem ao CG e a geração de PC de vida longa (Figura 3). (ORACKI et al., 2010; SHAPIRO-SHELEF; CALAME, 2005; ZHANG; GARCIA-IBANEZ; TOELLNER, 2016).

A movimentação de LyB FO e internalização no FL para formação do GC ocorre devido a perda da sinalização pelo CCR7, além do movimento guiado através do CXCR5 e o gene 2 induzido pelo vírus Epstein-Barr (EBI2) (Figura 3, 2) (LEWIS; WILLIAMS; EISENBARTH, 2019; ORACKI et al., 2010; ZHANG; GARCIA-IBANEZ; TOELLNER, 2016). A formação madura do CG é caracterizada pelas duas áreas que o compõe, a zona escura (ZE) e a região da zona clara (ZC). Na ZE ocorre a proliferação de LyB e a mutação somática nessas células, induzido pela célula Thf na PALS, sendo que esse processo é responsável pela mudança da classe do AC e aumento da afinidade deles. Com a diminuição da capacidade proliferativa dos LyB na ZE elas migram para a ZC, onde ocorre um processo de seleção mediado pelas FDCs (Figura 3) (ORACKI et al., 2010; ZHANG; GARCIA-IBANEZ; TOELLNER, 2016)

As FDCs realizam apresentação de antígenos por imunocomplexos para os LyB, sendo que os diferentes clones de LyB gerados na mutação somática competem entre si pela ligação a esses antígenos, com base na afinidade deste reconhecimento, e a célula que passou por uma mutação resultante na forma com maior afinidade recebe estímulos para sobrevivência, proliferação e diferenciação. Este estímulo para sobrevivência e proliferação do clone selecionado é fornecido pelas células Thf presentes na ZC. Além disso, a partir da interação entre as células Thf e LyB elas podem retornar a ZE, passando por mais rodadas de hipermutação somática ou receber estímulo para diferenciação em PC de vida longa/LyB de memória (Figura 3, 2) (ORACKI et al., 2010; ZHANG; GARCIA-IBANEZ; TOELLNER, 2016).

O processo de recirculação de LyB entre o ZE e ZC é mediado pela expressão de CXCL13 (migração para ZC), CLXCL12 (migração para ZE), além de seus receptores CXCR5 e CXCR4, respectivamente. A recirculação de LyB no CG pode se repetir algumas vezes, levando ao acúmulo de mutações que favorecem uma melhor interação e reconhecimento antigênico por essas células (Figura 3, 2) (ORACKI et al., 2010; ZHANG; GARCIA-IBANEZ; TOELLNER, 2016).

Após a reação do GC, o LyB recebe estímulo para diferenciação em PC de vida longa ou dar origem o LyB de memória. Como esta célula passou pelas etapas de mutação somática e seleção por antígeno, os AC produzidos por elas são de alta afinidade aos antígenos (ORACKI et al., 2010; SHAPIRO-SHELEF; CALAME, 2005; ZHANG; GARCIA-IBANEZ; TOELLNER, 2016). A IL-21 além de induzir o foco extrafolicular de LyB, desempenha papel também na diferenciação dos LyB no CG, sendo importante para o desenvolvimento da reposta IgG-específica (Figura 3, 3) (ORACKI et al., 2010; ZHANG; GARCIA-IBANEZ; TOELLNER, 2016).

Os PC resultantes da diferenciação pós-CG serão de vida longa, quando encontram os fatores necessários para manutenção da sobrevivência. A migração dos PC para fora do FL é mediada pela sinalização de CXCR4 e seu ligante CXCL12, além da diminuição da expressão de CXCR5, responsável pela manutenção de LyB no FL. Estas células continuam o processo migratório em direção a medula óssea, também pela sinalização de CXCL12-CXCR4 ou, embora em menor frequência, podem permanecer no baço. Nestes locais os PC encontram nichos de sobrevivência, com a expressão de citocinas e fatores como IL-6, BAFF e APRIL, produzidos por células estromais e eosinófilos que garantem a sobrevivência e manutenção dos PC (Figura 3, 4) (NUTT et al., 2015; ORACKI et al., 2010; SHAPIRO-SHELEF; CALAME, 2005).

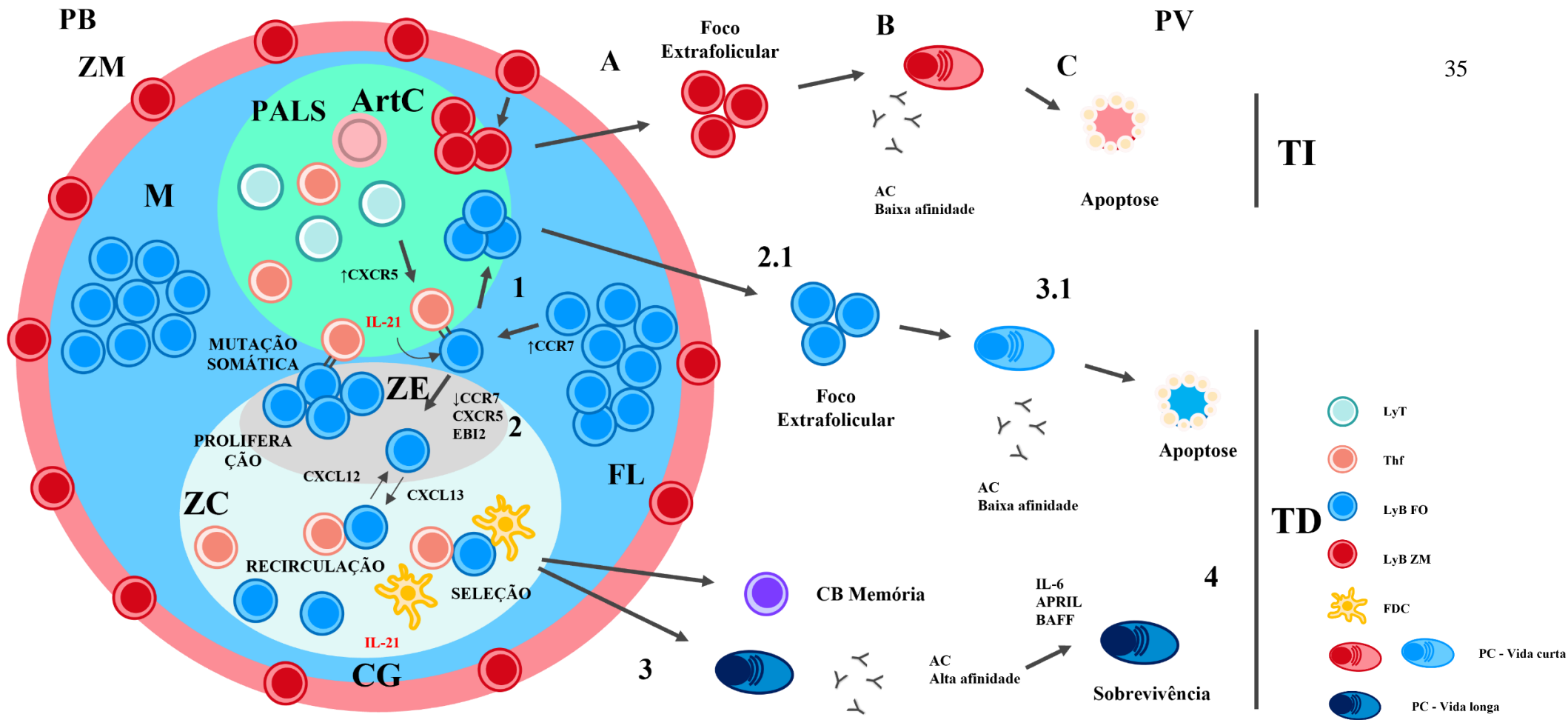


Figura 3 - Diferenciação de plasmócitos no baço. (A-C) **Diferenciação de LyB ZM.** A – Após estímulo e ativação do LyB ZM, essas células migram para PV através da PALS, dando origem ao foco extrafollicular. B – As células do foco extrafollicular se diferenciam em PC de vida curta, produtores de AC de baixa afinidade. C – Apoptose de PC de vida curta. (1-3) **Diferenciação de LyB FO.** (1) – Após estímulo e ativação dos LyB FO, essas células migram para a borda do FL, local de encontro com as Thf da PALS. A interação entre essas células pode resultar na formação de PC de vida curta (2.1 e 3.1) (Similar ao descrito em A-C) ou na geração de PC de vida longa (2-4). (2) – Re-entrada de LyB FO, dando origem ao CG, onde ocorre a mutação somática e seleção antigênica, por estímulos das células FDC e Thf. (3) – Os LyB FO que passam pelo CG podem dar origem a PC de vida longa ou LyB de memória. (4) A manutenção dos PC de vida longa depende da secreção de citocinas.

LyB – Célula B; **LyT** – Célula T; **Thf** – LyT folicular; **LyB ZM** – LyB de zona marginal; **LyB FO** – LyB folicular; **FDC** – Célula dendrítica folicular; **PC** – Plasmócito; **TI** – reposta T-independente; **TD** – resposta T-dependente; **PB** – Polpa branca; **PV** – Polpa vermelha; **ArtC** – Arteríola central; **PALS** – bainha linfóide periarteriolar; **CG** – Centro germinativo; **M** – Manto; **ZC** – Zona clara; **ZE**: Zona escura; **FL** – Folículo linfóide; **ZM** – Zona marginal.

Imagem: Elaboração do autor

Fonte: (LEWIS; WILLIAMS; EISENBARTH, 2019; NUTT et al., 2015; ORACKI et al., 2010; SHAPIRO-SHELEF; CALAME, 2005; ZHANG; GARCIA-IBANEZ; TOELLNER, 2016)

1.3.1 Regulação gênica da diferenciação de plasmócitos

O processo de diferenciação de PC é amplamente regulado por fatores de transcrição, específicos para cada estágio do desenvolvimento de LyB, que controlam a expressão de genes responsáveis pela manutenção da identidade de LyB ou em induzir a mudança desta identidade para o perfil de células secretoras de AC (*Antibody-secreting cells* – ASC) (NUTT et al., 2015; ORACKI et al., 2010; SHAPIRO-SHELEF; CALAME, 2005).

A manutenção da função de LyB até a diferenciação em PC é mantida principalmente pela expressão de *paired box protein 5* (PAX5). Este fator tem função no comprometimento celular (especificação celular) com a linhagem de LyB, durante o desenvolvimento na medula óssea, além de regular a expressão de receptores relacionados com a atividade dessas células, como CD79A, CD19, CD21, bem como, de outros fatores (IRF4, IRF8, BACH2, IKZF3 e SPIB) associados também com a manutenção do estágio de LyB. Além disso, PAX5 também possui uma participação importante na mutação somática que ocorre no CG. Sendo que a repressão dele é necessária para permitir a diferenciação em PC. Outros fatores como *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF), além do complexo formado por PU.1 (ou *spi-1 proto-oncogene* [SPI1]) e *interferon-regulatory factor* (IRF) 8 (PU.1-IRF8), contribuem para o estado de repouso de LyB e supressão da diferenciação de PC (Figura 4, A) (NUTT et al., 2015; ORACKI et al., 2010; SHAPIRO-SHELEF; CALAME, 2005).

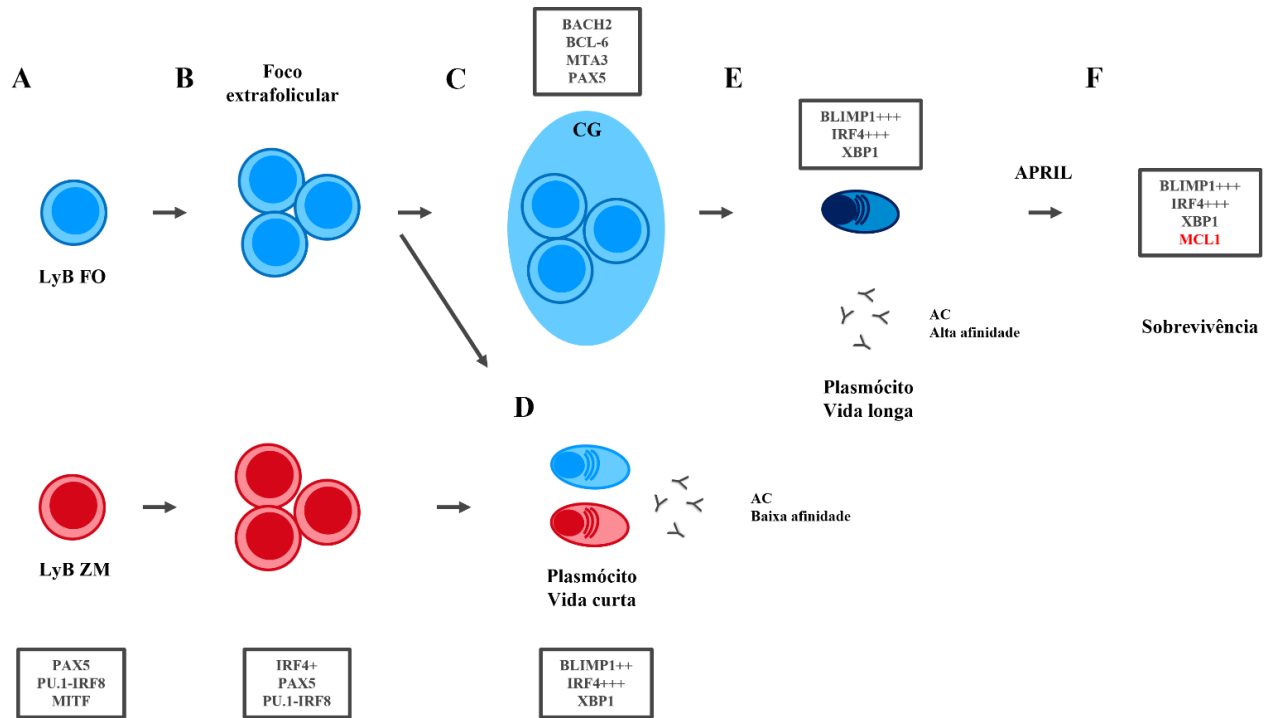
Um fator de transcrição considerado como intermediário entre a manutenção de LyB e diferenciação em PC com atividade em ambos os estágios, é chamado de IRF4. O IRF4 é o iniciador do processo molecular da diferenciação de PC, que passa a ser expresso em baixo nível após estimulação antigênica de LyB, causando a ativação e proliferação inicial delas (Figura 4, B). Além disso, IRF4 participa da reposta de CG no processo de mudança da classe de AC. Sendo que a atividade exercida por ele é dose-dependente e baixos níveis contribuem para o estágio de LyB, enquanto altos níveis promovem a diferenciação de PC (NUTT et al., 2015; ORACKI et al., 2010; SHAPIRO-SHELEF; CALAME, 2005).

O desenvolvimento da resposta do CG envolve a expressão de BACH2, *B-cell lymphoma-6* (BL-6) e *metastasis-associated 1 family, member* (MTA3). BACH2 é expresso em LyB do CG, com capacidade de inibir a expressão de *B-lymphocyte-induced maturation protein 1* (BLIMP1), sendo que a regulação da expressão de BACH2 é um dos eventos chaves na diferenciação mediada pela expressão de BLIMP1. BCL-6 é outro repressor de BLIMP1, responsável pela formação do CG e proliferação de LyB. A regulação da expressão de BLIMP1

impede a diferenciação precoce de PC dentro do CG, garantindo o acúmulo de mutações e processos de seleções dos clones de LyB. MTA3 interage com BCL-6 na atividade reguladora de BLIMP1 e prevenção da diferenciação de PC (Figura 4, C) (NUTT et al., 2015; ORACKI et al., 2010; SHAPIRO-SHELEF; CALAME, 2005).

A atividade de IRF4 relacionada com a diferenciação de PC ocorre devido a indução da expressão de BLIMP1, sendo este, um fator necessário para diferenciação terminal de PC e secreção de AC. BLIMP1 cessa a capacidade proliferativa de PC e inibe a expressão dos fatores relacionado com a manutenção de LyB e do desenvolvimento da resposta de CG, incluindo as atividades de mutação somática e interação entre LyT e LyB. Esta regulação impede o retorno do PC para o estágio inicial de LyB após diferenciação. O *x-box-binding protein 1* (XBP1) é outro fator de transcrição expresso pelos PC, que exerce um papel importante na atividade secretória de AC nessas células (Figura 4, D e E) (NUTT et al., 2015; ORACKI et al., 2010; SHAPIRO-SHELEF; CALAME, 2005).

Os PC formados expressam altos níveis de IRF4 e XBP1. Além disso, a expressão de BLIMP1 é maior nos PC em fase terminal de diferenciação. Os PC com expressão intermediária de BLIMP1 possuem características de células imaturas, presentes principalmente no baço e com menor frequência na medula óssea. Enquanto as células com alta expressão de BLIMP1 ocupam lugar na medula óssea e apresentam características de células maduras (Figura 4, D e E) (NUTT et al., 2015; ORACKI et al., 2010; SHAPIRO-SHELEF; CALAME, 2005). Além disso, a secreção de APRIL para manutenção da sobrevivência de PC induz a expressão de *myeloid cell leukaemia* (MCL1), uma proteína com atividade anti-apoptótica (Figura 4, F) (NUTT et al., 2015).



LyB ZM – LyB de zona marginal; LyB FO – LyB folicular; AC – Anticorpo CG – Centro germinativo.

Figura 4 - Regulação gênica da diferenciação de plasmócitos. (A) – A manutenção do estágio de LyB é mantida pela expressão de PAX5, do complexo PU.1-IRF8 e MITF. (B) – Após estímulo antigênico, os LyB ativados passam a expressar baixos níveis de IRF4, que contribui para a ativação e proliferação dessas células, além de ser um indutor da diferenciação em PC. (C) – A formação da reposta do CG é mediada pela expressão de BACH2, BCL-6, MTA3 e PAX5 (D) – Os PC imaturos expressão altos níveis de IRF4 e XBP1, além da expressão intermediária de BLIMP1. (E) – Os PC de fase terminal de diferenciação expressão altos níveis de BMILP1, IRF4 e XBP1. (F) – A sinalização por APRIL induz a expressão de MCL1, uma proteína anti-apoptótica. (+) Nível de expressão: + baixa expressão; ++ expressão intermediária; +++ alta expressão.

Imagem: Autoria própria.

Fonte: (NUTT et al., 2015; ORACKI et al., 2010; SHAPIRO-SHELEF; CALAME, 2005)

1.3.2 Plasmócitos na leishmaniose visceral

A hiperglobulinemia é um dos principais marcadores da LV. Apesar dos altos títulos séricos de AC, a maioria dessas imunoglobulinas são de baixa afinidade aos antígenos de *Leishmania*, além de serem produzidos AC autorreativos durante a infecção, favorecendo a formação de imunocomplexos (SAMANT et al., 2021; SILVA-BARRIOS; CHARPENTIER; STÄGER, 2018). Sendo assim, os AC produzidos durante a LV não são protetivos contra a infecção e estão associados com a gravidade da doença (SILVA-BARRIOS; CHARPENTIER; STÄGER, 2018).

A hiperglobulinemia pode ser explicada pela intensa plasmocitose na PV que ocorre durante a LV (FONTES et al., 2021; OMACHI et al., 2017; SILVA-O'HARE et al., 2016). Sendo que a expressão de BAFF pode ser um dos fatores responsáveis pelo acúmulo de PC no

órgão, como demonstrado no baço de cães infectados e pelos elevados níveis dessa citocina no soro de pacientes com LV (GOTO et al., 2014; SILVA-O'HARE et al., 2016). Além disso, na infecção experimental por *L. donovani*, a esplenomegalia que ocorre na LV foi associada com o aumento de PC, e ambos, a plasmocitose e hipergamaglobulinemia foi evitada pela depleção gênica de BAFF (OMACHI et al., 2017).

Um estudo de coorte com acompanhamento de pacientes de área endêmica para infecção por *L. donovani*, demonstrou que a soroconversão com alto títulos de AC estão associados com a progressão da doença e conseqüentemente o desenvolvimento de sintomas (HASKER et al., 2014). Além disso, na infecção experimental por *L. infantum* em modelo murino, foi evidenciado a contribuição de AC na exacerbação da doença, caracterizada pelo aumento da carga parasitária em órgãos alvos, após transferência passiva de AC (IgG ou IgM) específicos ou não para antígenos do parasito em animal com resistência preliminar (antes da transferência) (DEAK et al., 2010). De forma similar, em cães naturalmente infectados apesar de um alto número de PC na PV do baço, poucos parecem ser específicos para antígenos de *Leishmania*, sendo que os animais que apresentavam a presença de muitos PC específicos para antígenos de *L. infantum* estavam associados com uma maior gravidade da doença (FONTES et al., 2021).

1.3.3 Plasmócitos nas doenças crônicas e infecciosas

Em doenças autoimunes é comum a presença de PC autorreativos, como o caso do Lúpus eritematoso sistêmico (*systemic lupus erythematosus* – SLE), sendo que a hiper-responsividade de LyB tem sido considerado como um dos fatores para o desenvolvimento do SLE. Os PC são frequentemente encontrados em focos inflamatórios periféricos, nos quais essas células contribuem para a patogênese da doença através da formação e depósito de imunocomplexos em órgãos como pulmão e rins, causando a ativação do sistema complemento e destruição tecidual. Além disso, um aumento de PC no baço e medula óssea são encontrados em modelos para o SLE, com a presença de células de vida curta e vida longa (ORACKI et al., 2010).

Na esclerose múltipla, uma outra doença autoimune, foi observado a presença e persistência de PC no tecido nervoso de estado crônico de inflamação, em decorrência da formação de nichos para sobrevivência dessas células. Estes PC migram através de CXCL12 e expressão de uma molécula de adesão (VCAM-1), e a persistência se deve a liberação de BAFF

e APRIL no tecido inflamado. A conservação de PC pode estar associada com a manutenção do estado inflamatório neste local (POLLOK et al., 2017).

A ativação policlonal de LyB e hipergamaglobulinemia não são aspectos exclusivos da infecção por *Leishmania*. Em outras infecções parasitárias (como na infecção por *Trypanosoma* spp., e *P. falciparum*) também ocorrem a expansão clonal inespecífica de LyB com a produção de AC inespecíficos, que causam prejuízo na reposta mediada por AC (NOTHELFER; SANSONETTI; PHALIPON, 2015; SILVA-BARRIOS; CHARPENTIER; STÄGER, 2018). A expressão de BAFF contribui para o desenvolvimento de AC inespecíficos na infecção por *Trypanosoma* (SILVA-BARRIOS; CHARPENTIER; STÄGER, 2018).

Nas infecções virais (HCV e HIV) e bacterianas o fenômeno da diluição de AC específicos para esses patógenos, pela excessiva produção de AC inespecíficos da resposta policlonal, caracteriza-se como uma modulação e forma de evasão do sistema imune (NOTHELFER; SANSONETTI; PHALIPON, 2015).

1.4 MODELO EXPERIMENTAL DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Hamsters da linhagem Golden Sirius são considerados como um modelo apropriado para estudos acerca da LV, devido à similaridade com a doença humana. Esta similaridade inclui aspectos imunopatológicos compartilhados, como o desenvolvimento de esplenomegalia, caquexia e hipergamaglobulinemia (KUMAR; NYLÉN, 2012; RODRIGUES et al., 2016; SAMANT et al., 2021; VILAS et al., 2021). Além disso, a desorganização do tecido linfóide do baço em estágio crônico da doença já foi relatada neste modelo de infecção (VERESS; ABDALLA; EL HASSAN, 1983; VILAS et al., 2021).

A produção mista de citocinas tanto da resposta Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-12) quanto Th2 (IL-4, IL-10 e TGF- β) também já foi observado na infecção experimental de hamster. Apesar de que a produção de IL-4 foi próxima do nível de animais não infectados. Enquanto IL-10 aumenta no baço dos animais após 4 semanas de infecção, indicando uma contribuição dessa citocina na progressão da doença (KUMAR; NYLÉN, 2012; SAMANT et al., 2021). Além disso, na resposta humoral de hamsters ocorre a ativação policlonal de LyB e a produção de AC inespecíficos, que podem estar associados com o aumento de lesões e gravidade da doença (SAMANT et al., 2021).

Apesar da alta similaridade de aspectos imunopatológicos entre seres humanos e hamsters, há uma grande limitação na disponibilidade de AC e regentes comerciais para essa

espécie, limitando a utilização deles para o desenvolvimento de pesquisas (KUMAR; NYLÉN, 2012; SAMANT et al., 2021).

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

2.1 JUSTIFICATIVA

A retenção e sobrevivência de PC na PV do baço é uma alteração importante encontrada em casos graves de LV (SANTANA et al., 2008; SILVA et al., 2012). Isto ocorre devido a diferenciação inespecífica de LyB durante a infecção, na qual ocorre também a indução da produção de IL-10 por essas células, com capacidade de modulação da resposta imune efetora do hospedeiro, favorecendo a sobrevivência do parasito. Além disso, a ativação policlonal é responsável pela produção de muitos PC produtores de anticorpos inespecíficos para antígenos de *Leishmania*, com a produção exacerbada de AC, e contribuindo para o agravamento da doença (SILVA-BARRIOS; CHARPENTIER; STÄGER, 2018). O acúmulo de PC também é descrito em outras condições crônicas e infecciosas, entretanto, pouco se sabe dos mecanismos relacionados com a geração destas células.

Apesar desta alteração ter sido descrita durante a infecção natural da LV. Este aspecto ainda não foi investigado na infecção experimental de hamsters, um modelo susceptível e com aspectos imuno-patológicos da doença semelhante ao observado em humanos. Portanto, a investigação das vias de sinalização envolvidas na diferenciação anômala de LyB, que podem estar associadas com acúmulo de plasmócitos na PV do baço na LV experimental, é uma via a ser explorada. Sendo que a análise sequencial dois eventos moleculares que precedem e estão associados com a desorganização e plasmocitose, contribui para a identificação de potenciais biomarcadores preditores da gravidade na doença.

2.2 HIPÓTESE

A expressão de DLK1 correlaciona-se com a diferenciação anômala de LyB e acúmulo de PC na polpa vermelha em baço de hamsters, no decorrer da desorganização esplênica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os potenciais mecanismos associados com alterações na diferenciação de LyB e plasmocitose do baço, durante o curso da leishmaniose visceral.

3.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Identificar as vias do desenvolvimento de LyB e PC associados com *DLK1* em baços de hamsters infectados por *L. infantum*;
- 2) Definir a proporção de LyB e PC em baços de hamsters infectados por *L. infantum*;
- 3) Correlacionar as alterações na distribuição de LyB no baço com a disproteinemia sérica em hamsters infectados experimentalmente com *L. infantum*;
- 4) Identificar os PC produtores de AC específicos para as formas promastigotas e amastigotas em baços de hamsters infectados por *L. infantum*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL DE ESTUDO

Para o desenvolvimento do presente trabalho foram utilizadas amostras de baço, soro e dado transcriptômico de arquivo obtidos no âmbito do projeto: “Cinética da desestruturação do tecido linfóide esplênico na leishmaniose visceral: um estudo experimental em camundongo e hamsters”. O trabalho fez parte, por sua vez, do projeto intitulado: “Desenvolvimento de testes baseados na resposta imune celular para a identificação de cães infectados com *Leishmania* e para a definição de resistência, susceptibilidade de gravidade na leishmaniose visceral”, aprovado pelo comitê de ética para o uso de animais em pesquisa (CPqGM-FIOCRUZ, CEUA, licenças N.004/2013 e N.017/2015).

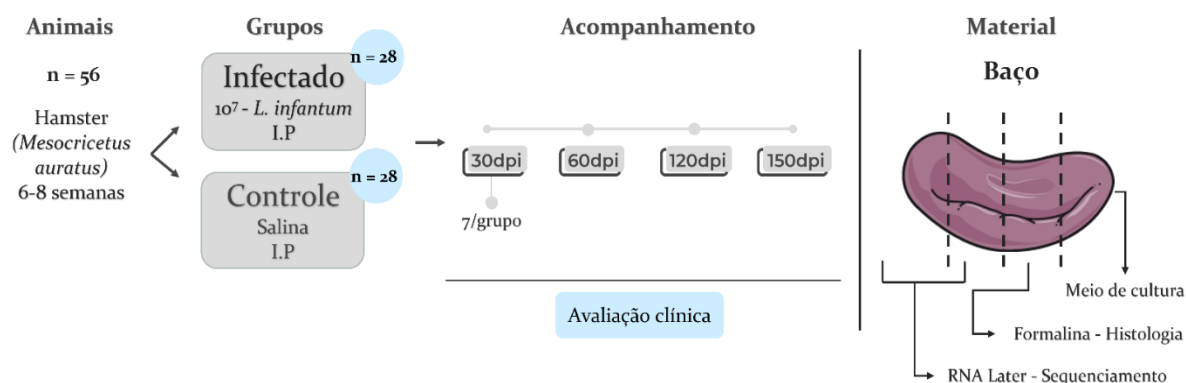
Nos tópicos a seguir estão descritas brevemente algumas das etapas metodológicas utilizadas na obtenção do material experimental. Maiores detalhes sobre a obtenção e processamento das amostras podem ser encontrados no material disponível em apêndice (VILAS et al., 2021, apêndice S1 página 86).

4.1.1 Animais e infecção

Hamsters da linhagem Golden Sirius (*Mesocricetus auratus*) com 6 a 8 semanas de idade foram alocados aleatoriamente entre os grupos experimentais, de forma homogênea em relação a idade, sexo e peso. Desses, 28 animais do grupo infectado receberam 1×10^7 formas promastigotas de *L. infantum* (cepa MHOM/BR2000/Merivaldo2) de cultura em fase estacionária, em 1mL de solução fisiológica via intraperitoneal (I.P). Enquanto 28 animais do grupo controle receberam pela mesma via e volume apenas a solução diluente, totalizando 56 animais (Figura 5). O cálculo amostral foi baseado nos objetivos do projeto, considerando a prevalência da desorganização esplênica em animais experimentalmente infectados (VERESS; ABDALLA; EL HASSAN, 1983; VILAS et al., 2021).

Os animais foram acompanhados semanalmente para avaliação clínica. Sendo que após 30, 60, 120 e 150 dias após injeção (dpi), 7 animais de cada grupo foram eutanasiados através de injeção letal de anestésicos (xilazina + cetamina), nos diferentes pontos para avaliação histológica. Além de 3 destes animais também de cada ponto foram utilizados para avaliação transcriptômica do baço, sendo escolhidos os animais com mais alterações histológicas

apresentadas (VILAS et al., 2021, apêndice S1 página 86). Para detecção do parasito e confirmação da infecção, foi realizado cultura e isolamento de *Leishmania* em meio de cultura (Figura 5) (DOS-SANTOS et al., 2008). Além disso, no momento da eutanásia foi feita a coleta de sangue pela punção intracardíaca para obtenção do soro.



dpi- Dias após injeção; **I.P.**- Intraperitoneal.

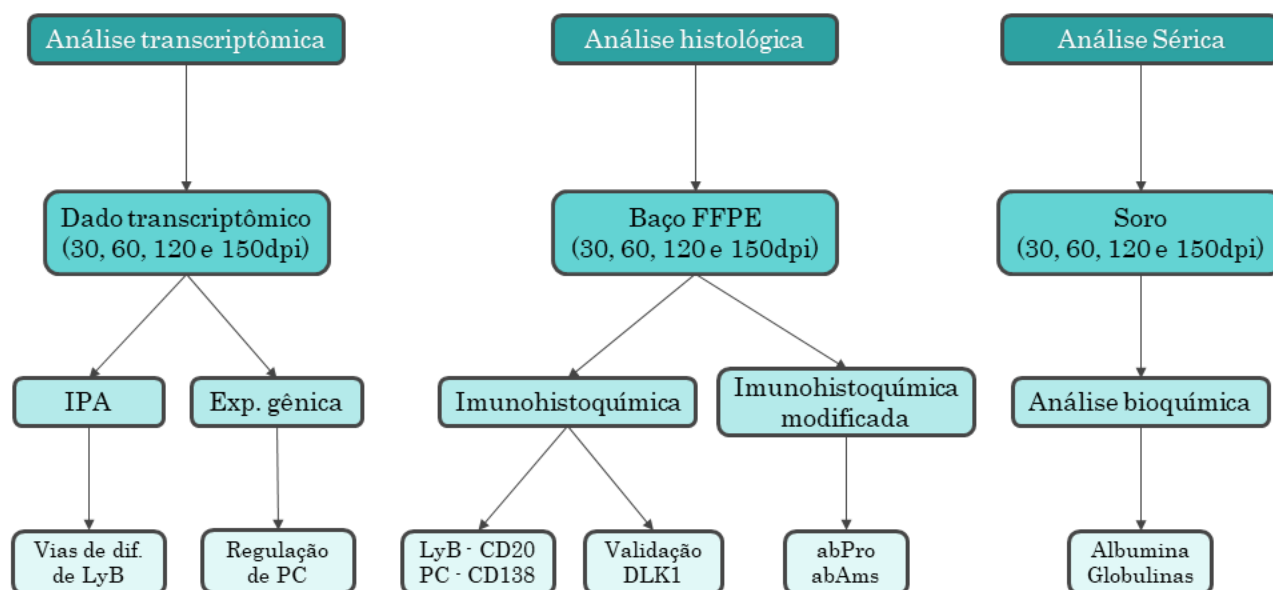
Figura 5 - Ilustração da abordagem experimental do projeto de origem do material experimental

Fonte: Elaboração do autor

4.2 DELINEAMENTO METODOLÓGICO

A partir da disponibilidade do material experimental, foi proposto a realização do presente trabalho de mestrado com o intuito de investigar os potenciais mecanismos associados com o desenvolvimento anômalo de LyB e plasmocitose no curso da LV. Para isso, o dado transcriptômico gerado a partir do sequenciamento e análise previa, foi submetido ao enriquecimento de vias e interações gênicas através do software Ingenuity Pathway Analysis (IPA), além da avaliação do perfil transcricional relacionado com a regulação de PC (Figura 6).

Os baços fixados em formalina e embebidos em parafina (FFPE) foram utilizados em reações de IHQ para identificação de LyB, usando o marcador CD20, assim como, identificação de PC usando o marcador CD138. Nesses baços também foi feita marcação para a molécula DLK1 e validação do dado transcriptômico. Além da avaliação da especificidade de PC no tecido esplênico, através de uma técnica de IHQ modificada, em que se utiliza os antígenos de superfície biotinilados do parasito (Antígeno de superfície biotinilado de promastigota - abPro/antígeno de superfície biotinilado de amastigota - abAms) como sonda para a reação (MIZUTANI et al., 2016). Adicionalmente, o soro dos animais foi submetido à análise bioquímica dos níveis séricos de albumina e globulinas (Figura 6).



IPA- Igenuity Pathway Analysis; **Dif.**- Diferenciação; **LyB**- Célula B; **Exp.**- Expressão; **PC**- Plasmócito; **FFPE**- *Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded*; **abPro**- Antígeno biotilado de promastigota; **abAms**- Antígeno biotilado de amastigota; **dpi**- Dias após injeção.

Figura 6 - Desenho esquemático do delineamento metodológico

Fonte: Elaboração do autor

4.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

O fragmento reservado para avaliação histológica foi fixado em formalina alcóolica ácida entre 24 e 48 horas à temperatura ambiente (TA) e submetido ao processamento histológico. Os fragmentos embebidos em parafina foram seccionados e corados por hematoxilina-eosina (H&E) para avaliação de alterações histológicas, realizada de forma cega por dois médicos patologistas de acordo com os parâmetros descritos por Santana et al (2008). A classificação da organização esplênica foi realizada entre as seguintes categorias: Tipo 1 ou bem-organizado; Tipo 2 ou levemente desorganizado; Tipo 3 ou moderadamente/extensivamente desorganizado, seguindo os critérios de classificação de Hermida e colaboradores (2018) (VILAS et al., 2021, apêndice S1 página 86).

4.4 AVALIAÇÃO TRANSCRIPTÔMICA

A realização das técnicas de processamento e pré-análise do perfil transcriptômico dos animais foi realizado anteriormente, no trabalho citado (VILAS et al., 2021, apêndice S1 página

86). Nesta seção será apresentada uma breve descrição destas etapas de avaliação transcricômica, para melhor compreensão dos dados utilizados neste trabalho.

4.4.1 Extração e seleção do RNA

Para sequenciamento e avaliação transcricômica os fragmentos foram mantidos em solução estabilizante (RNA Later - Invitrogen) à 4°C por 24 horas. Após esse período, a solução foi descartada e os fragmentos congelados à -80°C.

As amostras congeladas foram maceradas em trizol e submetidas à extração de RNA usando kit de extração RNAeasy (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Uma etapa de tratamento com DNase foi adicionada ao processo e foi realizada a depleção de RNA ribossomal (RNAr) para enriquecimento da amostra. Além disso, foi realizada a mensuração da quantidade de RNA por Nanodrop (ThermoFischer), bem como, da qualidade através de eletroforese automatizada Agilent Bioanalyzer (Agilent), tendo o valor de RIN (RNA *integrity number*) maior que 7 considerado como aceitável (VILAS et al., 2021, apêndice S1 página 86).

4.4.2 Avaliação do perfil transcricômico

O sequenciamento foi obtido através da técnica de RNA-seq (Illumina HiSeq 2000) por *paired-end* de 3 animais de cada grupo experimental, nos quatro pontos de acompanhamento (30, 60, 120 e 150 dpi). Foi realizada avaliação da qualidade de *reads* pelo software FastQC (v0.10.1) e o alinhamento com o genoma de referência de golden hamster (*Mesocricetus auratus* – ID 11998) disponível em banco de dados (NCBI), feito pelo software STAR. Já a mensuração da quantidade de leituras (*reads*) associadas foi realizada pelo FeatureCounts (DOBIN et al., 2013; VILAS et al., 2021).

Pelos dados do repositório GEO (NCBI), foi avaliado a presença e abundância de genes anotados e identificação dos transcritos diferencialmente expressos, através do teste de razão de verossimilhança com o pacote de BioConductor R EdgeR e o teste Wald com DESeq2 (KONG et al., 2017; ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2009; VILAS et al., 2021).

4.5 ENRIQUECIMENTO DE VIAS E EXPRESSÃO TRANSCRIPTÔMICA

4.5.1 Rede de interações transcriptômica

A partir do dado obtido pela análise transcriptômica realizado por Melo e colaboradores (2021), foi feito no presente trabalho o enriquecimento de vias de diferenciação e manutenção de LyB com *DLK1* através do software Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen), que utiliza anotações gênicas de uma base de conhecimento própria experimentalmente validados, para construção das redes de interações dos transcritos diferencialmente expressos obtidos pelo sequenciamento. Nessas análises foi utilizado um *cut-off* de log de *fold change* (FC) de 2, *False Discovery Ratio* (FDR) $qvalue < 0,05$ e z-score de 2, para reduzir ruídos de análise e identificação dos transcritos diferencialmente expressos com maior robustez de algoritmo.

4.5.2 Expressão transcriptômica

Foi realizado uma análise da expressão transcriptômica de moléculas envolvidas no desenvolvimento e regulação de LyB (PU.1, MITF, IRF8, BACH2, BCL-6, MTA3, BLIMP1, IRF4, XBP1, CXCL13, CXCL12, CXCR4, IL6, BAFF, APRIL e MCL1) (NUTT et al., 2015; ORACKI et al., 2010; SHAPIRO-SHELEF; CALAME, 2005) (Tabela 1). Nestas análises, foram utilizados o FC de Log2 dos transcritos (FC-Log2) para a confecção dos gráficos, considerando os transcritos diferencialmente expressos aqueles que apresentavam um $FDR < 0,05$ e um *cut-off* de FC-Log2 de 1.

Tabela 1 - Lista de moléculas avaliadas pela expressão transcriptômica

Regulação de LyB	MOLÉCULAS	GENE
Manutenção de LyB	PU.1*, IRF8, MITF	*SPI1
CG	BACH2, BCL-6 e MTA3	-
Diferenciação	BLIMP1*, IRF4 e XBP1	*PRDM1
Migração	CXCL13, CXCL12 e CXCR4	-
Sobrevivência	IL-6 e BAFF*, APRIL [#] e MCL1	*TNFSF13B, [#] TNFSF13

LyB: Célula B

Fonte: Elaboração do autor

4.6 CULTURA *L. infantum*

A *Leishmania* (*L. infantum* – cepa MHOM/BR2000/Merivaldo2) foi mantida em meio de cultura Schneider completo, suplementado com 10% de SBF (Soro Bovino Fetal) e gentamicina à 24°C, até fase estacionária.

4.7 BIOTINILAÇÃO PROMASTIGOTA DE *L. infantum*

O método de obtenção do abPro está disponível na literatura e seguiu o processo de biotinilação dos antígenos de superfície de promastigotas em fase estacionária, com a obtenção dos antígenos solúveis pela lise e centrifugação. Em um trabalho anterior, para a marcação de PC específicos contra antígenos de promastigota de *L. infantum* no baço de cães, foi determinado a concentração de 1:100 do abPro (FONTES et al., 2021).

4.8 DIFERENCIAÇÃO DE AMASTIGOTA DE *L. infantum*

4.8.1 Infecção e diferenciação

MΦ de linhagem murino (J774) foram utilizados para induzir a diferenciação de amastigotas de *L. infantum*. As células J774 foram mantidas em meio RPMI completo (10% de SBF + 2mM de glutamina + gentamicina) à 37°C com 5% de CO₂.

Para infecção, os MΦ aderidos à garrafa de cultura foram separados com incubação de 11mL de Hanks' Balanced Salt Solution sem cálcio e magnésio (HBSS^{-Ca/Mg}) gelado, por 20 minutos à TA. Após o período de incubação, foram feitos jatos de HBSS^{-Ca/Mg} com pipeta sorológica na parede da garrafa para soltar as células. Então, elas foram lavadas 3 vezes em 15-20mL de HBSS com cálcio e magnésio (HBSS^{+Ca/Mg}), a 1700rpm, 4°C por 10 minutos.

A *L. infantum* em fase estacionária também foi lavada 3 vezes com 15-20mL de HBSS^{+Ca/Mg} a 3000rpm, 4°C por 10 minutos. Após lavagens, a concentração de J774 foi ajustada para 2x10⁶ em 1mL de RPMI completo e adicionado mais 1mL de RPMI completo com 4x10⁷ promastigotas de *L. infantum* (proporção - 20 parasitos/célula), em poço de placa de cultura (6 poços) e incubado por 24h à 37°C com 5% CO₂ para infecção. No dia seguinte, foi feita a troca do meio RPMI completo para retirar formas promastigotas não internalizadas e incubado por mais 24h à 37°C com 5% CO₂ para diferenciação.

4.8.2 Isolamento de amastigota

Para isolamento das formas amastigotas de *L. infantum* das células infectadas, os poços da placa de cultura foram lavados 3 vezes com 1mL de Phosphate-Buffered Saline [1x] (PBS), as células que se desprenderam da placa foram fixadas e guardadas para avaliação da taxa de infecção, por citocentrifugação (*cytospin*, 500g por 5 minutos) em lâmina de vidro e coloração com hematoxilina. Após lavagem, foi adicionado 5mL de HBSS^{-Ca/Mg} gelado com 2mM de EDTA e incubado por 5 minutos à 4°C. No passo seguinte, a solução com EDTA foi aspirado e desprezado diversas vezes através de agulha (30/27G) em seringa. A solução com as células foi centrifugada a 100xg, por 5 minutos à 4°C, e posteriormente, o sobrenadante foi centrifugado a 3500rpm, por 10 minutos à 4°C. O sedimento foi fixado com 4% de paraformaldeído e avaliado por lâminas de citocentrifugação (1000g por 5 minutos) coradas com hematoxilina.

4.9 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Secções de baço FFPE com 4µm de espessura em lâminas carregadas negativamente (Starfrost) foram utilizadas para reações de IHQ. Os tecidos foram submetidos à desparafinização em 5 incubações sequenciais de xilol (5 minutos), reidratação em gradiente decrescente de álcool (5 minutos) e lavagem em água destilada. Adicionalmente, os cortes foram incubados em 20% de hidróxido de amônio diluído em álcool 95%, por 20 minutos, seguido de lavagem em água corrente e água destilada por 5 minutos cada, para retirar pigmentos de formol do tecido.

Para recuperação antigênica foi utilizado o método de calor (115°C por 20 minutos) em panela de pressão elétrica. O tampão de recuperação usado foi de acordo com indicação do fabricante do anticorpo. Para identificação de LyB e PC (CD20 e CD138, respectivamente) foi utilizado Tris-EDTA (pH: 9.0), enquanto a reação para marcação de DLK1 utilizou-se citrato (pH: 6.0) (Tabela 2). Após recuperação, as lâminas eram mentidas no tampão à TA por 20 minutos para resfriamento.

O bloqueio da peroxidase endógeno foi feito em 3 etapas de incubação com 3% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água destilada, por 10 minutos cada, seguido de lavagem em água destilada. Já o bloqueio de reações inespecíficas foi realizado com a utilização de soro da espécie produtora do anticorpo secundário (Soro de cavalo, Vector - ref. 30022), por 15 minutos à TA e lavagem em PBS após bloqueio. Uma etapa de permeabilização foi adicionada

para a marcação de DLK1, utilizando 2 incubações com 0,1% de saponina em PBS, por 5 minutos cada (Tabela 2).

A concentração do anticorpo primário foi determinada através de testes de padronização, sendo definido as seguintes concentrações: anti-CD20 (Abcam, ref. ab64088) – **1/200**; anti-CD138 (Abcam, ref. ab128936) e anti-DLK1 (Abcam, ref. ab21682) – **1/1000** (Tabela 2). Assim, foi adicionado 100µL do anticorpo diluído em PBS com 1% de albumina de soro bovino (*bovine serum albumin* – BSA) em cada corte e incubado por 16-18h (*overnight*) à 4°C, em câmara úmida. Para os três marcadores, após incubação as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com polímero anti-IgG de coelho (Produzido em cavalo, Vector - ref. 30026) conjugado com HRP (Horseradish Peroxidase) por 30 minutos à TA. Em seguida, as secções foram lavadas em PBS e a revelação foi feita com 100µL de 0,02% de DAB + 0,006% de H₂O₂ em 0,05M de Tris-Hcl (pH: 7,6). As lâminas foram coradas com hematoxilina, desidratadas em gradiente decrescente de álcool, clarificadas em xilol e a montagem da lamínula feita com meio Entellan. Para controle da reação, secções de baços eram incubadas com IgG de coelho na etapa de marcação com anticorpo primário.

Tabela 2 - Anticorpos imuno-histoquímica

Marcador	ESPÉCIE	RECUPERAÇÃO	CONCENTRAÇÃO	PERMEABILIZAÇÃO
CD20	Coelho	Tris-EDTA (pH 9.0)	1/200	-
CD138	Coelho	Tris-EDTA (pH 9.0)	1/1000	-
DLK1	Coelho	Citrato (pH 6.0)	1/1000	2x 0,1% Saponina (5')

Fonte: Elaboração do autor

4.9.1 Padronização imuno-histoquímica modificada

A marcação de PC específicos *in situ* pela técnica de IHQ modificada seguiu as mesmas etapas descritas anteriormente (tópico 4.9), com algumas modificações. Para determinar a concentração de abPro e o tipo de recuperação, foram testadas as concentrações de 1:50, 1:100 e 1:200 do abPro, em diferentes tipos de recuperação antigênica: mediada por calor; enzimática; dupla recuperação.

Na recuperação mediada por calor foram testados os tampões Tris-EDTA (pH: 9.0) e citrato (pH: 6.0) à 115°C, por 20 minutos em panela de pressão elétrica. A recuperação enzimática foi realizada através da incubação com proteinase K (20µg/mL) em 0,05M de TBS (Tris-Buffered Saline), por 15 minutos à TA. Além da recuperação dupla, com a combinação das recuperações por calor e enzimática. Para esse último, as lâminas passaram pela recuperação com panela em tampão Tris-EDTA e após o resfriamento foram submetidas ao tratamento com proteinase K. Além disso, o bloqueio de reações inespecíficas foi feito com 1% de BSA em PBS, por 15 minutos à TA.

Para revelação das células positivas para o abPro foi utilizado o sistema biotina-estreptavidina. Nesse caso, os cortes foram incubados com 100µL de estreptavidina-HRP (2µg/mL) por 30 minutos à TA. Então, as lâminas foram lavadas com PBS e seguia-se as etapas de revelação com DAB, coloração em hematoxilina, desidratação, clarificação e montagem.

4.9.2 Análise das marcações

As lâminas resultantes das reações de IHQ foram escaneadas através de microscópio de digitalização (Olympus – VS – 110), pela objetiva de 40x. As regiões e áreas de interesse foram fotografadas pelo software OLYMPUS OlyVIA (V. 3.2.1) e a contagem ou mensuração realizada através do ImageJ (Fiji, NIH – V.1.53f).

As marcações de CD20 e CD138 foram analisadas para as duas regiões histológicas do baço (PB e PV). Para avaliação de LyB (CD20) na PB foram selecionados os 5 maiores folículos em corte transversal, presentes no corte histológico e foi usado a proporção de área marcada (ZM + FL) em relação a área total do folículo nas análises (% de área marcada). Já na PV foi selecionado um campo com maior concentração de células marcadas, chamada de *hotspot*, e 4 áreas adjacentes não sobrepostas. A análise semi-quantitativa de células foi realizada pela contagem manual nas áreas pré-selecionadas e foi estimado a densidade celular (célula/mm²) pela divisão do número de células contadas pela área da foto, multiplicado por 1.000.000 (nº de células/área foto*1x10⁶).

De forma similar à análise descrita no parágrafo anterior, a contagem de PC (CD138) foi realizada individualmente nas duas regiões. A partir da seleção de 5 áreas de *hotspots*, porém, nesse caso de 5 campos não adjacentes da PV, assim como, 5 campos de *hotspots* de diferentes folículos da PB. A quantidade de células também foi determinada por contagem manual e estimada pela densidade celular (nº de célula/área foto*1x10⁶). Em relação ao DLK1,

foi selecionado 5 áreas de *hotspots* independentemente da região esplênica que elas ocupavam e se manteve a quantificação por densidade de células.

4.10 VALIDAÇÃO DLK1 – WESTERN BLOT

Foi realizada a técnica de western blot (Miniblotter, Immunetics) para confirmação e validação da marcação de DLK1 por IHQ. Para isso, foi utilizado um fragmento de baço (60mg) de hamster sadio, congelado e sem fixação. O órgão foi macerado em 300µL de tampão de amostra 2x (4% de SDS [Sodium Dodecyl Sulfate] + 20% de Glicerol + 10% 2-ME [2-Mercaptoetanol] + 0,02% BPB [Bromophenol Blue] + Tris 62.5mM [pH: 6.8]). Após a maceração, foi adicionado mais 300µL de água bidestilada (água para injeção), ficando no final o volume de 600µL (10% - Proporção tecido x volume [m/v]) e concentração do tampão igual a 1x. Então, o macerado foi centrifugado a 14.000 rcf por 1 minuto e o sobrenadante coletado e submetido à passagem em agulha, diversas vezes. Após centrifugação, a amostra foi fervida por 5 minutos e centrifugada novamente a 14.000 rcf por 5 minutos.

Feito o processamento da amostra, foi utilizado 200µL de homogeneizado (macerado/proteínas) para corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida (15%), a 80mA (PowerPac 1000, Bio-Rad) em tampão de corrida (25mM Tris + 192mM glicina + 0,1% SDS). Ao final da separação de proteínas pelo gel, foi realizada a transferência de proteínas para a membrana de nitrocelulose através de transferência úmida (*Wet/tank transfer* [Trans-Blot Cell – Bio-Rad]) por 1 hora a 200mA em tampão de transferência (Mesma composição do tampão de corrida, com adição de 20% de metanol).

A confirmação da transferência e marcação das posições do gel na membrana foi feita em coloração com vermelho ponceau. O bloqueio com 5% de leite desnatado em TBS + 0,05% de tween 20 por 2 horas, seguido de 3 lavagens com TBS + 0,05% de tween 20 por 5 minutos, sob agitação. O anticorpo (anti-DLK1 – ab21682) foi diluído (1/2000) em solução de bloqueio, sendo adicionado 320µL da solução e incubado por 1 hora à TA, sob agitação. Após incubação, foi feita 3 lavagens como descrito anteriormente e adicionado 320µL de anti-IgG de coelho conjugado com HRP (anti-IgG Rb-HRP – ab205718) diluído em solução de bloqueio, mantido por 1 hora à TA, também sob agitação, seguido de lavagem. Para revelação das bandas foi feita incubação em TBS por 3 minutos e adição do cromógeno DAB (0,02% de DAB + 0,006% de H₂O₂ em 0,05M de Tris-Hcl [pH: 7,6]) na membrana até o aparecimento das bandas. O controle da reação foi feito com a incubação de IgG de coelho.

4.11 ANÁLISE BIOQUÍMICA DE SORO

No soro dos animais obtido através de punção cardíaca em tubo seco, a análise bioquímica foi realizada por um laboratório de análises clínicas veterinário (CITVET 2), para avaliação de proteínas totais e frações, através do método enzimático automatizado. Objetivando a determinação dos níveis séricos de albumina e globulinas para a estimativa da razão desses marcadores (albumina/globulinas).

4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A representação gráfica dos resultados expressa os valores obtidos nas diferentes métricas, médias e desvio padrão (DP). A análise estatística da densidade celular das populações avaliadas por IHQ foi realizada através da comparação entre grupo controle e infectado, em cada ponto de avaliação, utilizando teste Mann-Whitney. Enquanto, a avaliação da dinâmica de celularidade dos animais infectados ao longo da cinética de infecção, foi realizado pela análise diferencial (*Fold Change*, FC), utilizando a proporção da diferença dos valores encontrados no grupo infectado com a média do grupo controle (**FC** [(valor animal infectado - média controle) /média controle]). A análise estatística do FC foi realizado pelo teste Kruskal-Wallis e pós-teste recomendado (Dunn's teste). Teste de correlação Spearman foi utilizado para dados sem distribuição normal. A significância foi estabelecida com valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DOS ANIMAIS DO ESTUDO

As alterações clínicas e histológicas apresentadas pelos animais foram descritas por Melo e colaboradores (2021). Aqui apresentamos um breve sumário dos dados publicados, com a disponibilidade do material completo em apêndice (apêndice S1, página 86): todos os animais infectados foram positivos na cultura, com uma tendência de aumento na carga parasitária ao longo da cinética, pela avaliação do sequenciamento. Foi observada a presença de mais sinais clínicos no grupo infectado 150 dpi, nesse ponto também foi observada uma perda de peso maior entre os animais infectados (VILAS et al., 2021).

Em relação à avaliação histológica, os animais tiveram diminuição da PB em 120 e 150 dpi, que foi associado à diminuição do centro germinativo nos FL, no ponto de 150 dpi (VILAS et al., 2021). Além disso, a desorganização da PB nos animais infectados ocorreu a partir de 120 dpi, quando foi observada moderada desorganização (baço tipo 2) em 5 animais (71%) do grupo infectado. No último ponto, 150 dpi houve moderada desorganização em 3 (42,8%) animais e completa desorganização (baço tipo 3) em 2 (28,6%), dos animais infectados (Tabela 3).

Tabela 3 - Classificação histológica do baço

Tipo do baço	30 DPI		60 DPI		120 DPI		150 DPI	
	CONT	INF	CONT	INF	CONT	INF	CONT	INF
Tipo I	7/7 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	6/7 (86%)	2/7 (29%)	6/7 (86%)	2/7 (29%)
Tipo II	0	0	0	0	0	5/7 (71%)	1/7 (14%)	3/7 (42%)
Tipo III	0	0	0	0	1/7 (14%)	0	0	2/7 (29%)

Legenda: **dpi** – dias após injeção; **cont** – controle; **inf** – infectado

Fonte: Elaboração do autor

5.2 DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS DLK1⁺ AO LONGO DA INFECÇÃO

A marcação de IHQ para DLK1 permitiu a detecção da forma de membrana do receptor. Além disso, foi possível também avaliar a distribuição dessas células nos diferentes compartimentos esplênicos. A maioria das células positivas para a marcação possuíam aspecto de PC (núcleo periférico com forma de “roda de carroça”) (Figura 7), e as células DLK1⁺ se concentravam principalmente na região de PB, em áreas perivasculares (como a PALS) nos dois grupos, infectado e controle (Figura 8, A). **IHQ** – imuno-histoquímica; **FC** – *fold change*; **PC** – plasmócitos.

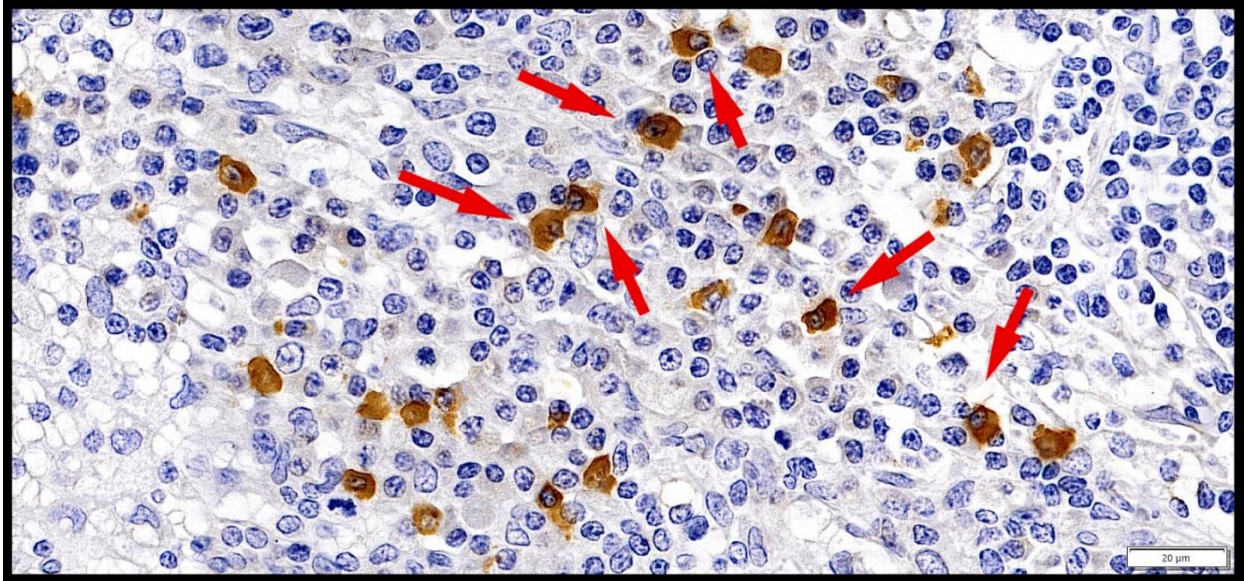
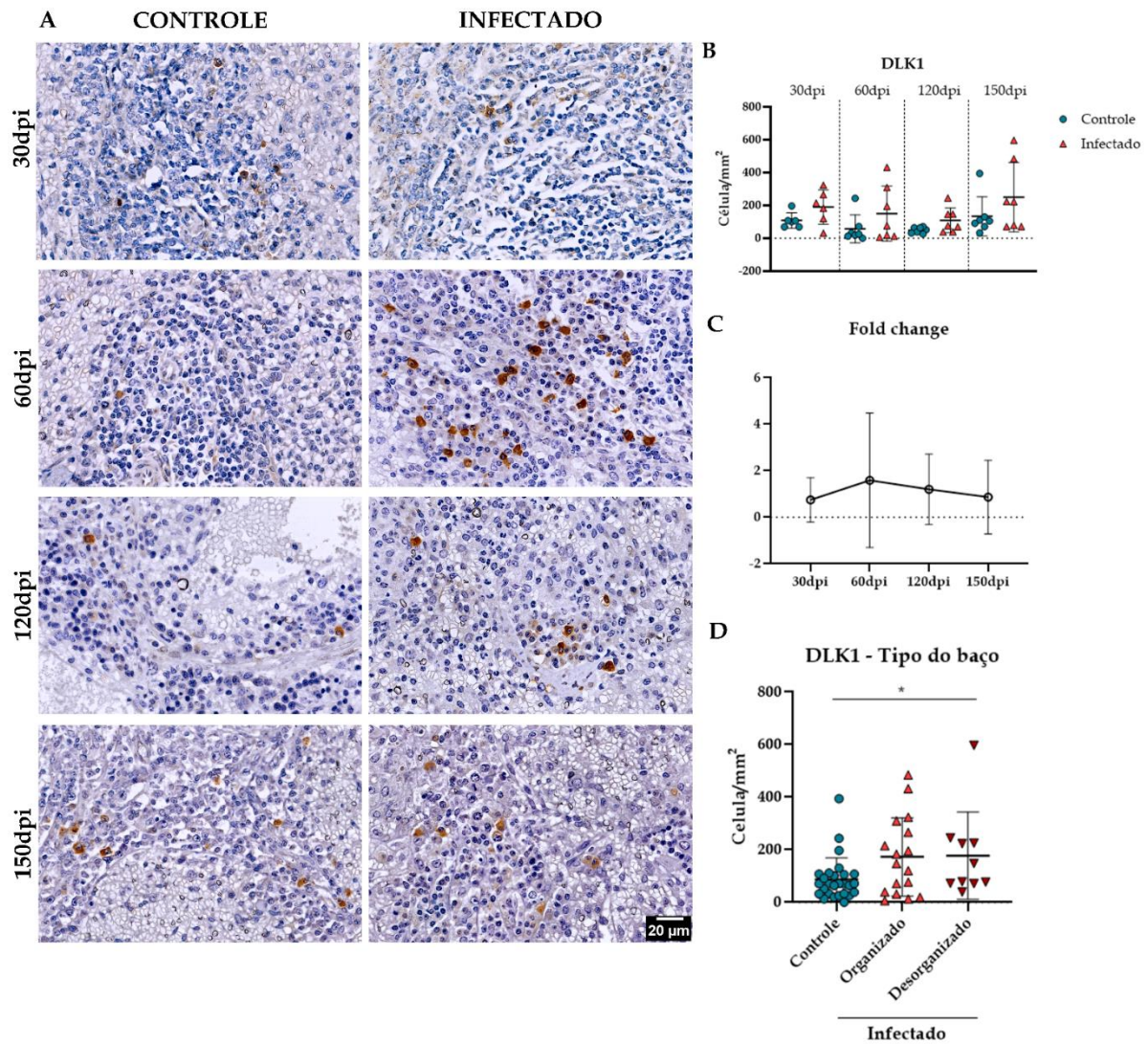


Figura 7 - Células positivas para DLK1 no baço de hamsters. Marcação de IHQ utilizando o marcador DLK1 no baço de hamsters (barra de escala 20 μ m). **Setas vermelhas:** células com aspecto de PC positivas para a marcação.

Fonte: Elaboração do autor

Não houve diferença na densidade de células entre os grupos controle e infectado em nenhum dos pontos de avaliação (Figura 8, B). Quando avaliamos a dinâmica da celularidade de DLK1⁺ no curso da doença, pela análise de expressão diferencial nos animais infectados, foi possível observar uma tendência de aumento de células marcadas no baço dos animais, principalmente nos pontos iniciais entre 30 e 60 dpi, (Figura 8, C). Além disso, quando o grupo infectado dos diferentes pontos de avaliação foi estratificado entre os animais que não apresentaram desorganização do baço (baço tipo 1) e os animais com desorganização do baço (baços tipos 2 ou 3), foi observado aumento das células DLK1⁺ no grupo de animais infectados com alteração na organização esplênica, quando comparado com o grupo controle (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$), mas sem diferença entre os animais infectados com baço organizado e grupo controle, assim como, entre os grupos infectados (Figura 8, D).



dpi – dias após injeção; **IHQ** – imuno-histoquímica; **FC** – *fold change*; **DP** – desvio padrão
DLK1⁺ - células DLK1 positivas

Figura 8 - Distribuição de células DLK1⁺ no baço de hamsters: (A) – Micrografia das marcações de DLK1 por IHQ no baço de hamsters (Barra de escala 20µm). (B) – Gráfico da densidade de células. As linhas representam a média com DP. (C) – Representação gráfica do FC dos animais infectados nos diferentes pontos de acompanhamento. Os símbolos representam a média e as linhas o DP. Número de animais para marcações de IHQ: n=6/grupo (30 dpi) e n=7/grupo (60, 120 e 150 dpi). (D) – Representação gráfica da densidade de células DLK1⁺ estratificada pela classificação histológica do baço nos animais infectados (n=27 [controle], n=17 [infectado-organizado] e n=10 [infectado-desorganizado]).

Fonte: Elaboração do autor

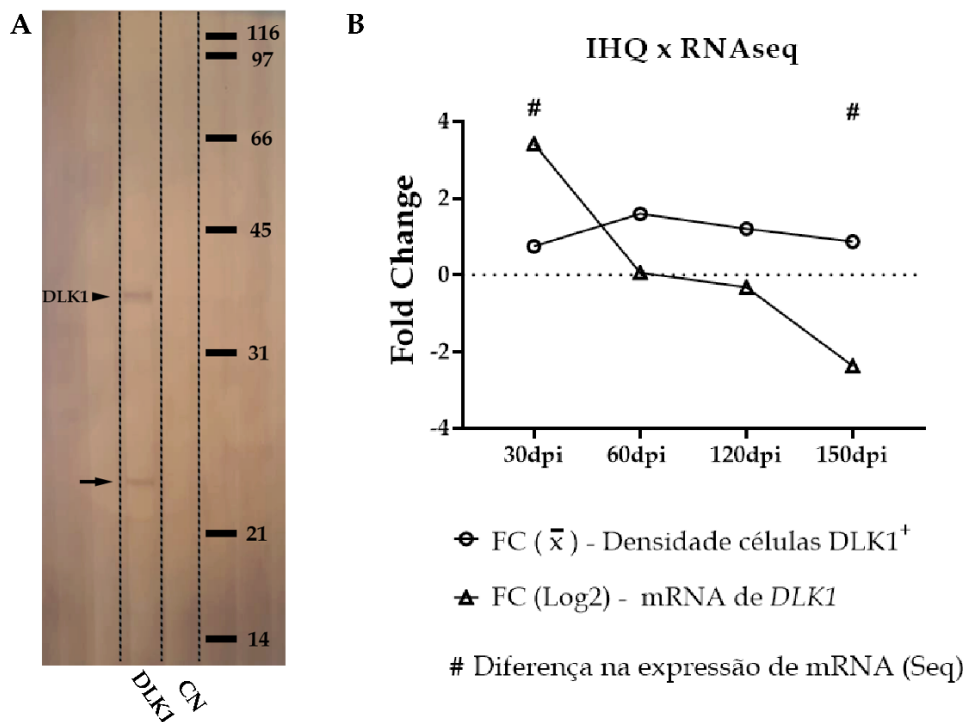
5.3 VALIDAÇÃO DA MARCAÇÃO POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

Como a marcação de DLK1 na IHQ foi feita com a utilização de anticorpo produzido contra a molécula expressa em camundongo, foi realizado um western blot para confirmar se o peso molecular da molécula reconhecida pelo anticorpo em hamsters, coincidia com o peso

descrito para DLK1. Para isso, um baço de animal saudável, congelado e sem fixação foi utilizado. O western blot revelou a detecção de duas bandas reconhecidas pelo anticorpo anti-DLK1, uma com aproximadamente 40kDa, correspondente ao peso da molécula DLK1 de 41kDa e outra em torno de 24kDa, correspondendo a forma clivada do receptor (Abcam, anexo S2 página 108) (Figura 9, A). Nenhuma banda foi detectada na raia do controle negativo (CN) incubado com IgG (de soro – policlonal [mesmo isotipo do anti-DLK1]) de coelho.

A marcação por IHQ foi adicionalmente validada pelo dado encontrado na avaliação do transcriptoma dos animais com doença mais grave, em que foi observado um aumento da expressão diferencial de *DLK1* no ponto inicial 30 dpi, com diminuição progressiva até o ponto final 150 dpi, nos animais infectados (VILAS et al., 2021). As marcações de IHQ nos animais submetidos ao sequenciamento confirmaram esse aumento inicial e diminuição ao longo da cinética, com o dado recentemente publicado (Apêndice S1, página 98).

Adicionalmente, comparamos os dados de expressão transcricional de *DLK1* dos animais submetidos ao sequenciamento, pelo FC-Log2 (mRNA), com a proporção de células DLK1⁺, pela média do FC (\bar{X}) da densidade celular, considerando as contagens de DLK1⁺ dos demais animais dos grupos controle e infectado, nos diferentes pontos de acompanhamento (e que não foram usados na avaliação do transcriptoma do dado publicado). Assim, observamos que apesar do aumento do transcrito de *DLK1* 30 dpi, só foi observado uma tendência de aumento do número de células DLK1⁺ no ponto seguinte, em 60 dpi, com retorno ao valor basal de células marcadas encontrado em 30 dpi nos pontos mais tardios, 120 e 150 dpi (Figura 9, B).



CN – controle negativo; dpi – dias após injeção; IHQ – imuno-histoquímica; RNAseq – sequenciamento de RNA; mRNA – RNA mensageiro; FC – fold change; DLK1⁺ – células DLK1 positivas; Seq – sequenciamento.

Figura 9 - Validação da marcação por imuno-histoquímica e dado transcriptômico: (A) – Fotografia da membrana de nitrocelulose utilizada na técnica de western blot de amostra do baço de hamster. 1ª raia (DLK1): incubação com anti-DLK1 e identificação de duas bandas (DLK1 e forma clivada da proteína). 2ª raia (CN): incubação com IgG de soro de coelho e ausência de marcação. (B) – Gráfico de comparação da expressão transcricional de DLK1 (FC-Log2) e densidade de células DLK1⁺ (média \bar{X}) do FC da densidade celular. **Número de animais:** n=3/grupo para dado de sequenciamento e n=6/grupo (30 dpi) e n=7/grupo (60, 120 e 150 dpi) para distribuição de células DLK1⁺.

Fonte: Elaboração do autor

5.4 VIA DE DESENVOLVIMENTO DE CÉLULAS B

A análise de vias de diferenciação e desenvolvimento de LyB associado com *DLK1* foi realizada utilizando dados do transcriptoma dos baços de animais infectados por *L. infantum*, através do enriquecimento de vias e rede de interações gênicas pelo IPA.

Em 30 dpi observamos que a expressão aumentada de *DLK1* se sobressai em relação a expressão das demais moléculas (Figura 9, 30 dpi). *DLK1* está inserido em um eixo de interação com as moléculas da família IL-12. A diminuição dessas moléculas ocorreu concomitante com a diminuição de *DLK1* no estudo sequencial (Figura 10, forma traçada em vermelho).

A IL-21 junto com IFN- γ (IFNG) parecem ter um papel central na regulação da via de diferenciação de LyB nos animais infectado, por estarem dispostas centralmente na rede, estabelecendo várias interações com as demais moléculas, principalmente com algumas delas, como outros interferons (IFN type 1 e IFNK), CXCR5, o complexo IL-12 (IL12 [complex]), CDKN1A e EGR2A na rede (Figura 11, 60 dpi). Após aumento da expressão de IL-21 e IFN- γ a partir de 60 dpi (Figura 9, 60 dpi), observamos o início da diminuição da expressão de CXCR5, PAX5, receptor de complemento tipo 2 (*complemente receptor type 2* [CR2 ou CD21]), CD72, CD79B e fator de transcrição Spi-B (*Spi-B transcription factor – SPIB*) com 120 dpi, e menor expressão evidenciada 150 dpi (Figura 9, 120 e 150 dpi). Estas moléculas estão associadas com ativação de LyB e a diminuição delas ocorre no processo de diferenciação de PC (NUTT et al., 2015; ORACKI et al., 2010; SHAPIRO-SHELEF; CALAME, 2005; WU; BONDADA, 2002). O que demonstra a diferenciação de PC em estágio tardio da infecção.

Adicionalmente, ocorreu aumento da expressão de transcritos relacionados com vias de diferenciação e regulação do ciclo celular (*Cyclin dependente kinase inhibitor 1 A - CDKN1A* e *T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1 - TAL1*) nos pontos mais tardios, 120 e 150 dpi (Figura 9, 120 e 150 dpi).

30dpi

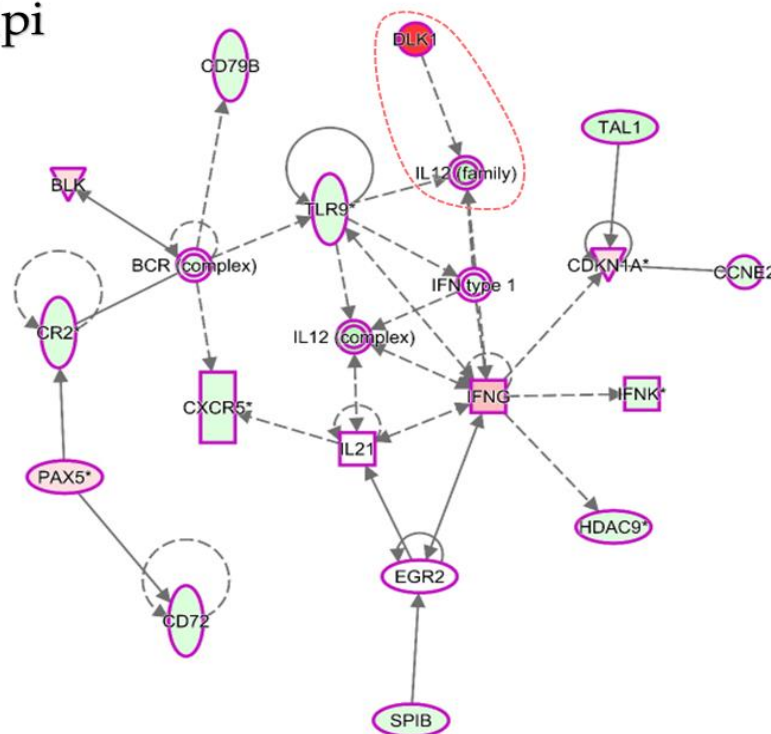


Figura 10 - Via de diferenciação e desenvolvimento de células B de animais infectados em 30 dpi: Rede de interação gênica do enriquecimento de vias de desenvolvimento de LyB com *DLK1* do transcriptoma de baço de animais infectados 30 dpi. A cor verde representa diminuição da expressão dos transcritos e vermelho

aumento. Em 30 dpi observamos a expressão significativa apenas de *DLK1*. **Número de animais:** n=3/grupo (30, 60, 120 e 150 dpi).

Fonte: Elaboração do autor

60dpi

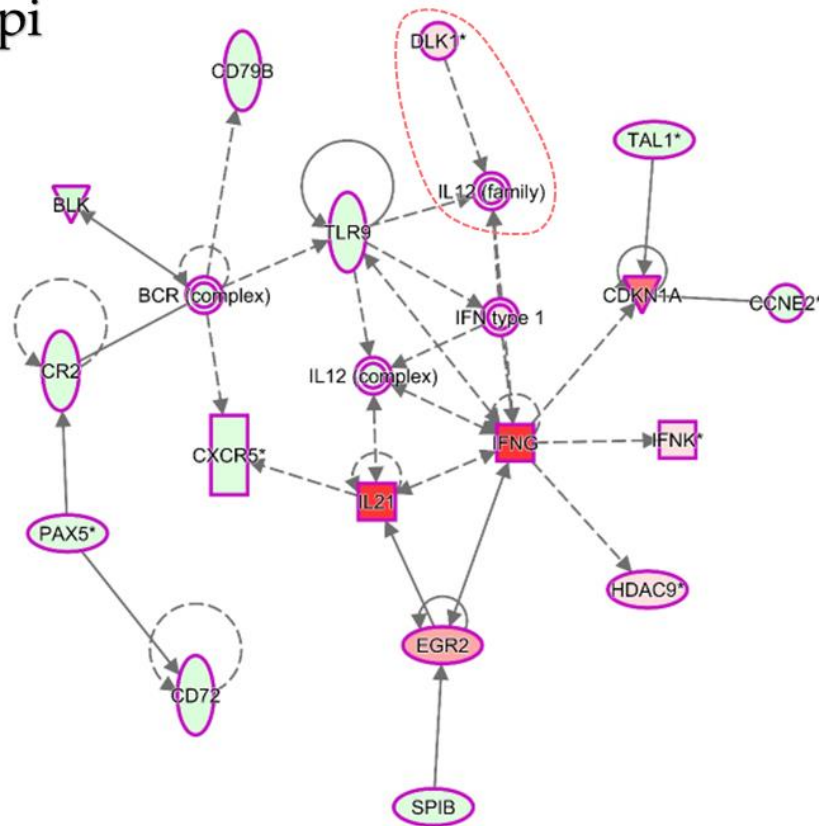


Figura 11 - Via de diferenciação e desenvolvimento de células B de animais infectados em 60 dpi: Rede de interação gênica do enriquecimento de vias de desenvolvimento de LyB com *DLK1* do transcriptoma de baço de animais infectados 60 dpi. A cor verde representa diminuição da expressão dos transcritos e vermelho aumento. A partir de 60 dpi ocorre aumento de IL-21, IFN- γ e CDKN1A. **Número de animais:** n=3/grupo (30, 60, 120 e 150 dpi). **Fonte:** Elaboração do autor

120dpi

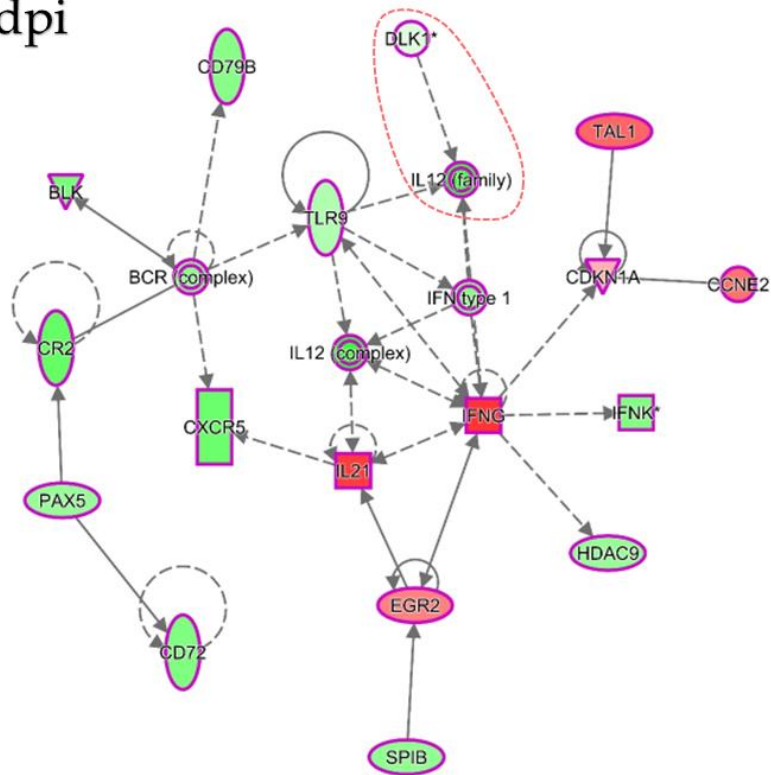


Figura 12 - Via de diferenciação e desenvolvimento de células B de animais infectados em 120 dpi: Rede de interação gênica do enriquecimento de vias de desenvolvimento de LyB com *DLK1* do transcriptoma de baço de animais infectados 120 dpi. A cor verde representa diminuição da expressão dos transcritos e vermelho aumento. Em 120 dpi inicia uma diminuição da expressão de moléculas (CXCR5, PAX5, CR2 (CD21), CD72, CD79B e SPIB) envolvidas com a diferenciação de PC e aumento de moléculas relacionadas com o controle da divisão celular (CDKN1A e TAL1). **Número de animais:** n=3/grupo (30, 60, 120 e 150 dpi).

Fonte: Elaboração do autor

150dpi

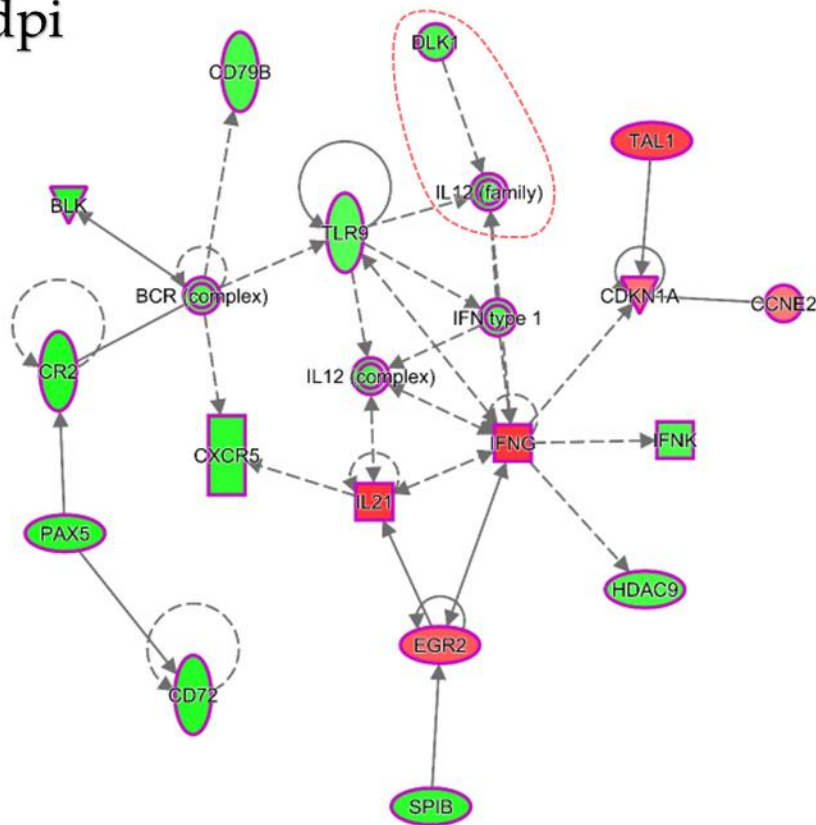


Figura 13 - Via de diferenciação e desenvolvimento de células B de animais infectados em 150 dpi: Rede de interação gênica do enriquecimento de vias de desenvolvimento de LyB com *DLK1* do transcriptoma de baço de animais infectados 150 dpi. A cor verde representa diminuição da expressão dos transcritos e vermelho aumento. Em 150 dpi permanece a diminuição da expressão de moléculas (CXCR5, PAX5, CR2 (CD21), CD72, CD79B e SPIB) envolvidas com a diferenciação de PC e aumento de moléculas relacionadas com o controle da divisão celular (CDKN1A e TAL1). **Número de animais:** n=3/grupo (30, 60, 120 e 150 dpi).

Fonte: Elaboração do autor

5.5 EXPRESSÃO TRANSCRIPTÔMICA ASSOCIADA COM DIFERENCIAÇÃO E REGULAÇÃO DE PLASMÓCITOS AO LONGO DA INFECÇÃO

Foi realizado uma avaliação da expressão transcricional no transcriptoma de baço dos animais infectados, de moléculas associadas com a diferenciação, migração e manutenção de LyB/PC descritos na literatura: manutenção de LyB (PU.1, MITF e IRF8); resposta do CG (BACH2, BCL-6 e MTA3); diferenciação de PC (BLIMP1, IRF4 e XBP1); migração (CXCL13, CXCL12 e CXCR4); manutenção de PC (IL6, BAFF, APRIL e MCL1) (NUTT et al., 2015; ORACKI et al., 2010; SHAPIRO-SHELEF; CALAME, 2005).

Em relação aos fatores de transcrição (FT) associados com a manutenção da identidade de LyB e inibição da diferenciação, observamos apenas aumento de MITF 150 dpi, nos animais infectados (Figura 10, A). Todos os fatores responsáveis pela formação e atividade do CG

apresentam uma tendência de diminuição nos pontos finais (120 e 150 dpi) de avaliação (Figura 10, B).

Nos FT associados com a diferenciação de PC, apesar de não ser encontrado diferença estatística na expressão dos fatores avaliados, houve uma tendência de aumento de BLIMP1 nos animais com LV, principalmente entre 60 e 120 dpi (Figura 10, C). Foi observado também diminuição de CXCL13 e CXCL12 nos pontos 120 e 150 dpi (Figura 10, D). Adicionalmente, houve aumento de IL-6 no último ponto de avaliação, mas não houve diferença na expressão de BAFF e APRIL no curso da doença (Figura 10, E).

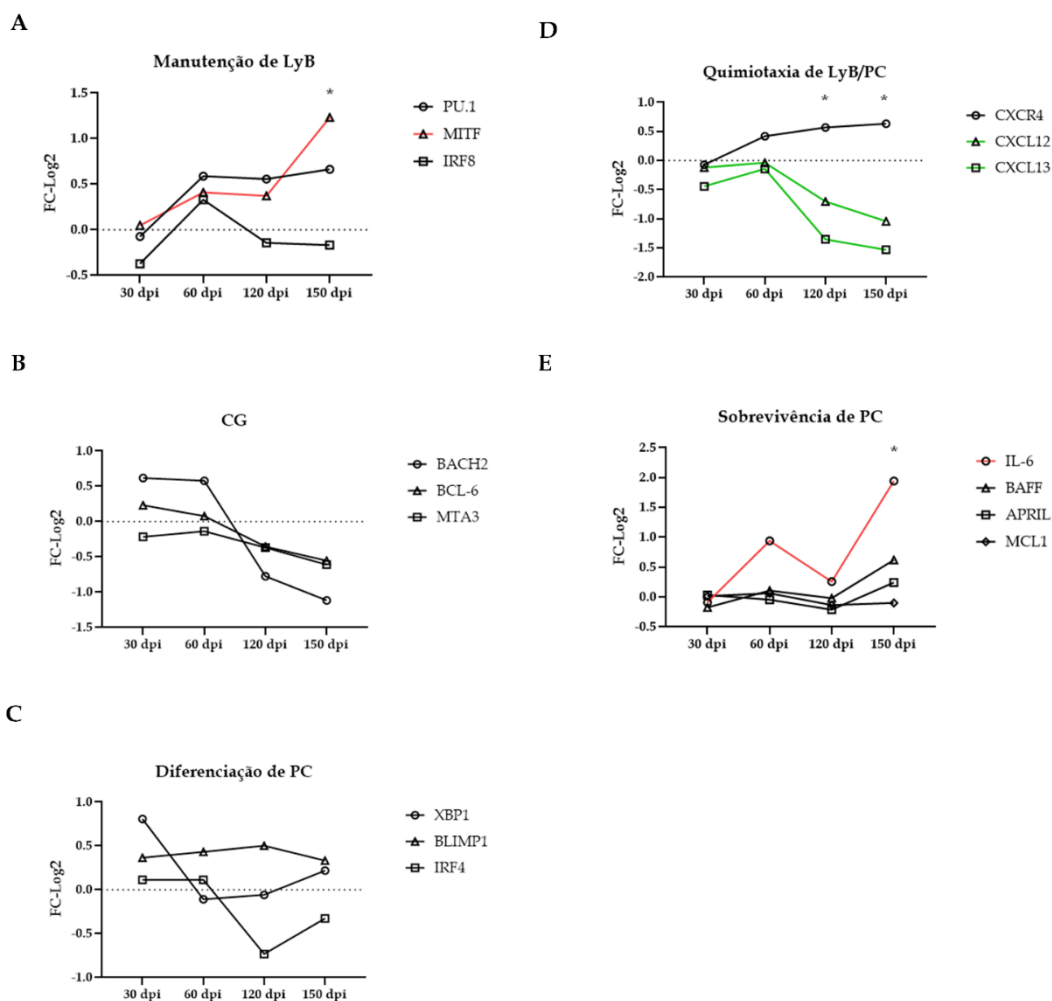


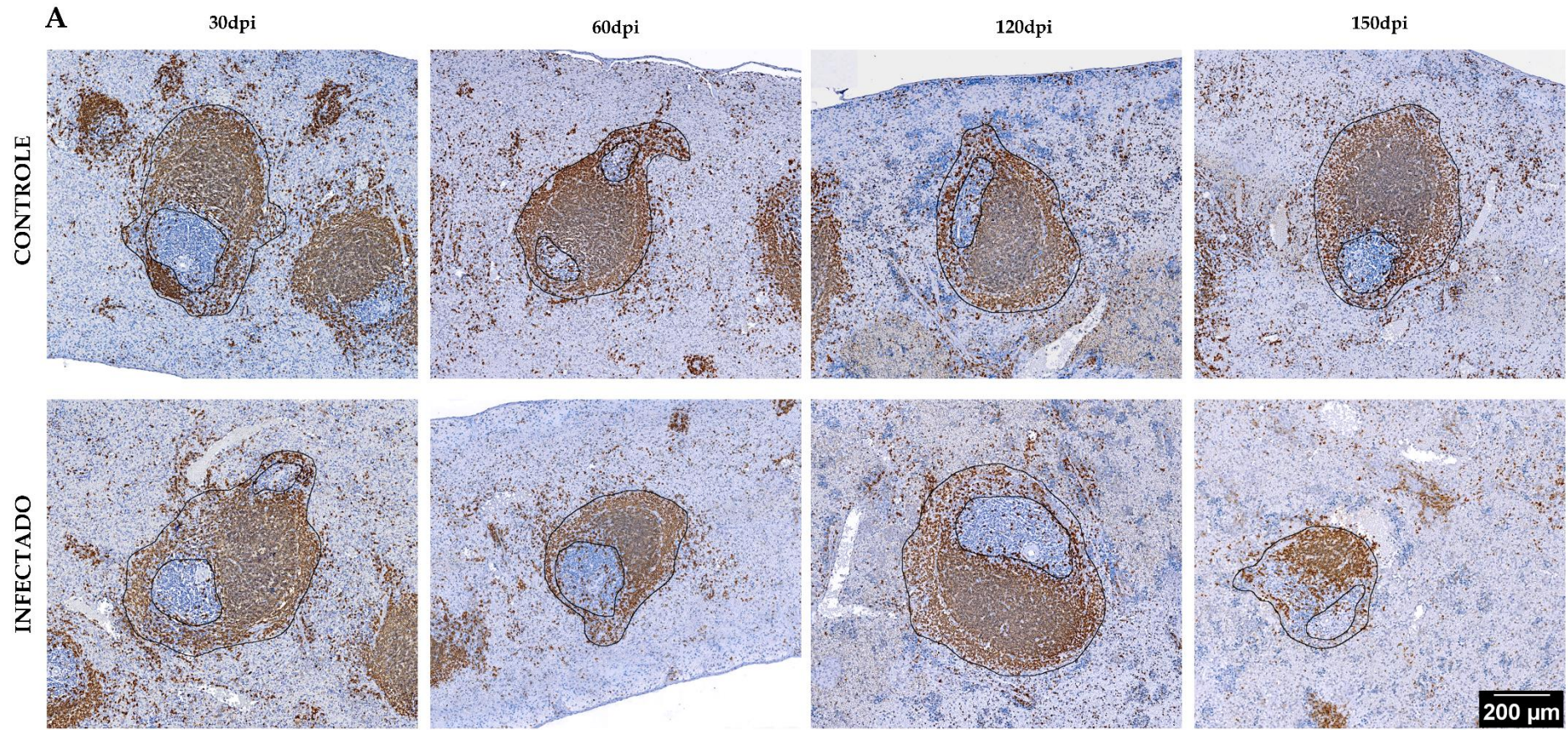
Figura 14 - Perfil transcricional da diferenciação e regulação de plasmócitos nos animais infectados: Expressão transcricional de fatores associados com a regulação de LyB/PC. **(A)** – FT associados com a manutenção de LyB e inibição da diferenciação de PC. **(B)** – FT relacionados com a formação da resposta de CG. **(C)** – Fatores de diferenciação de PC. **(D)** – Expressão de moléculas envolvidas na migração de LyB/PC. **(E)** – Moléculas responsáveis pela sobrevivência de PC. As linhas verdes representam os transcritos com diminuição da expressão, em preto aqueles sem diferença e as linhas vermelhas os que apresentaram aumento (FDR<0,05 e FC >±1). (*) – Representa o ponto em que foi observado diferença estatística. **Número de animais:** n=3/grupo (30, 60, 120 e 150 dpi).

Fonte: Elaboração do autor

5.6 PROPORÇÃO DE CÉLULAS B NO BAÇO

A marcação de células positivas para CD20 por IHQ no baço de hamsters exibiu um aspecto esperado da marcação de LyB esplênicos, com a marcação dos FL e ZM na região de PB (Figura 11, A) e de células na PV (Figura 12, A). As mensurações da área marcada dos 5 maiores folículos da PB presentes no corte histológico, demonstraram um aumento da marcação de CD20 na área de LyB (FL e MZ) da PB no grupo infectado no ponto de 120 dpi (Mann-Whitney, $p < 0,05$) em comparação ao controle, e uma tendência de diminuição no ponto consecutivo 150 dpi (Figura 11, B).

Na análise diferencial fica mais evidente essa tendência de diminuição da marcação de CD20 nos animais infectados no último ponto de avaliação, quando comparado ao ponto anterior 120 dpi (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$ – Figura 11, C). A contagem de LyB na PV de animais infectados por *L. infantum* não apresentou diferença em nenhum dos quatro pontos de acompanhamento (Figura 12, A e B). Observou-se apenas uma tendência de aumento nos pontos com 60 e 120 dpi, evidenciada através da análise diferencial (Figura 12, C).

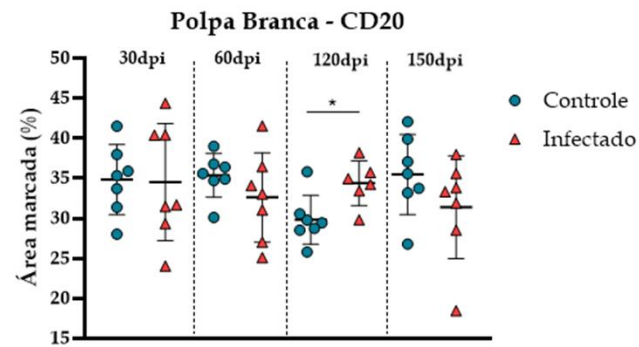


LyB – célula B; IHQ – imuno-histoquímica; PB – polpa branca; DP – desvio padrão; FC – fold change.

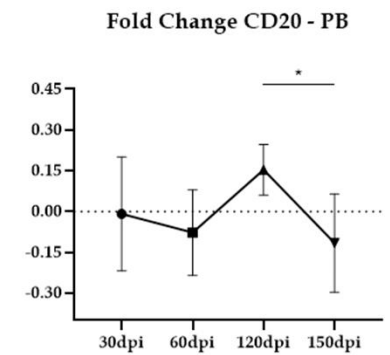
Figura 15 - Proporção de células B na polpa branca do baço de hamsters: (A) – Micrografia das marcações de CD20 por IHQ na PB do baço de hamsters (Barra de escala 200µm). (B) – Gráfico da mensuração de área marcada (%). As linhas representam a média com DP. (C) – Representação gráfica do FC dos animais infectados nos diferentes pontos de acompanhamento. Os símbolos representam as médias e as linhas o DP. **Número de animais:** n=7/grupo (30, 60, 150 dpi), n=7 [controle] e n=6 [infectado] (120 dpi).

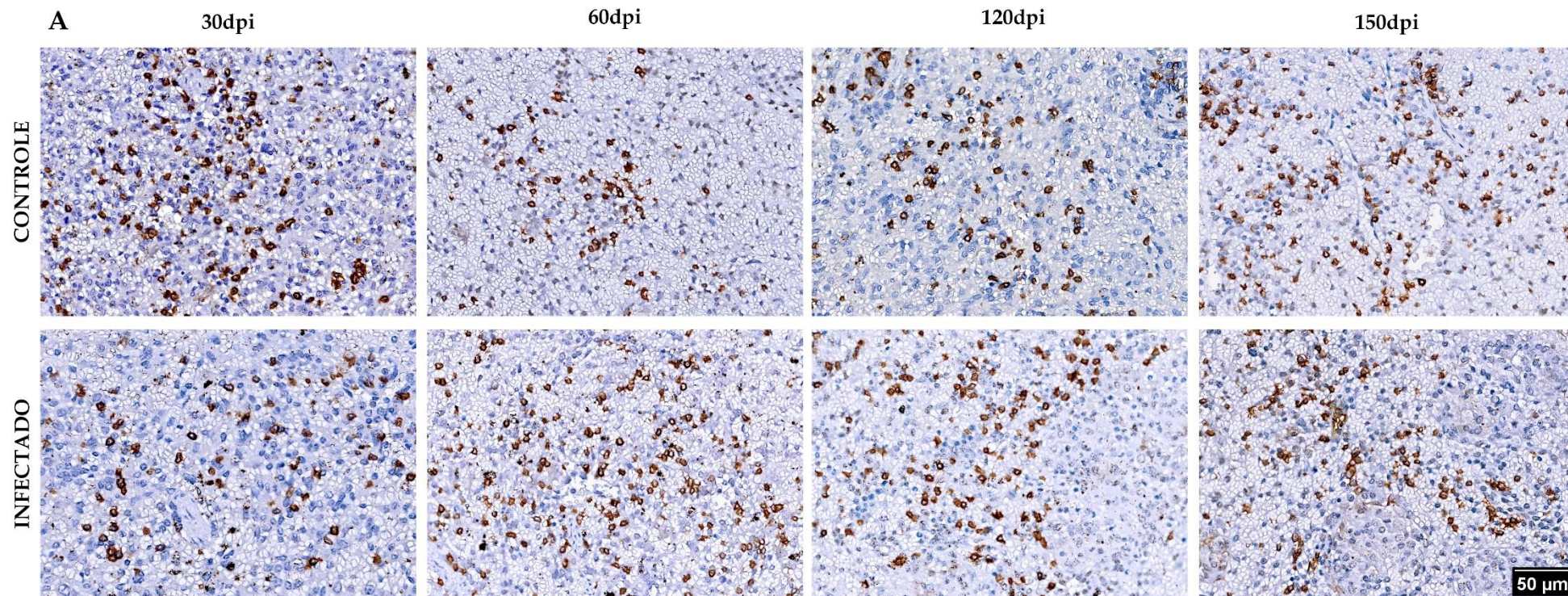
Fonte: Elaboração do autor

B

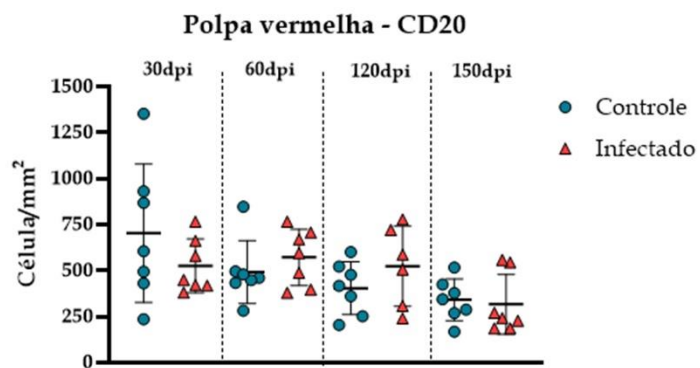


C

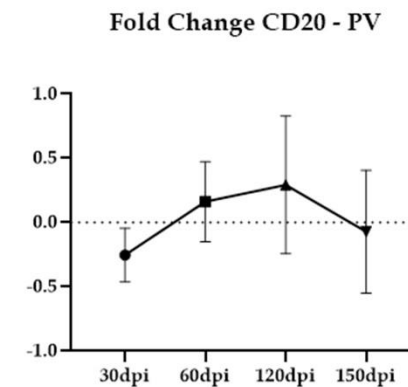




B



C



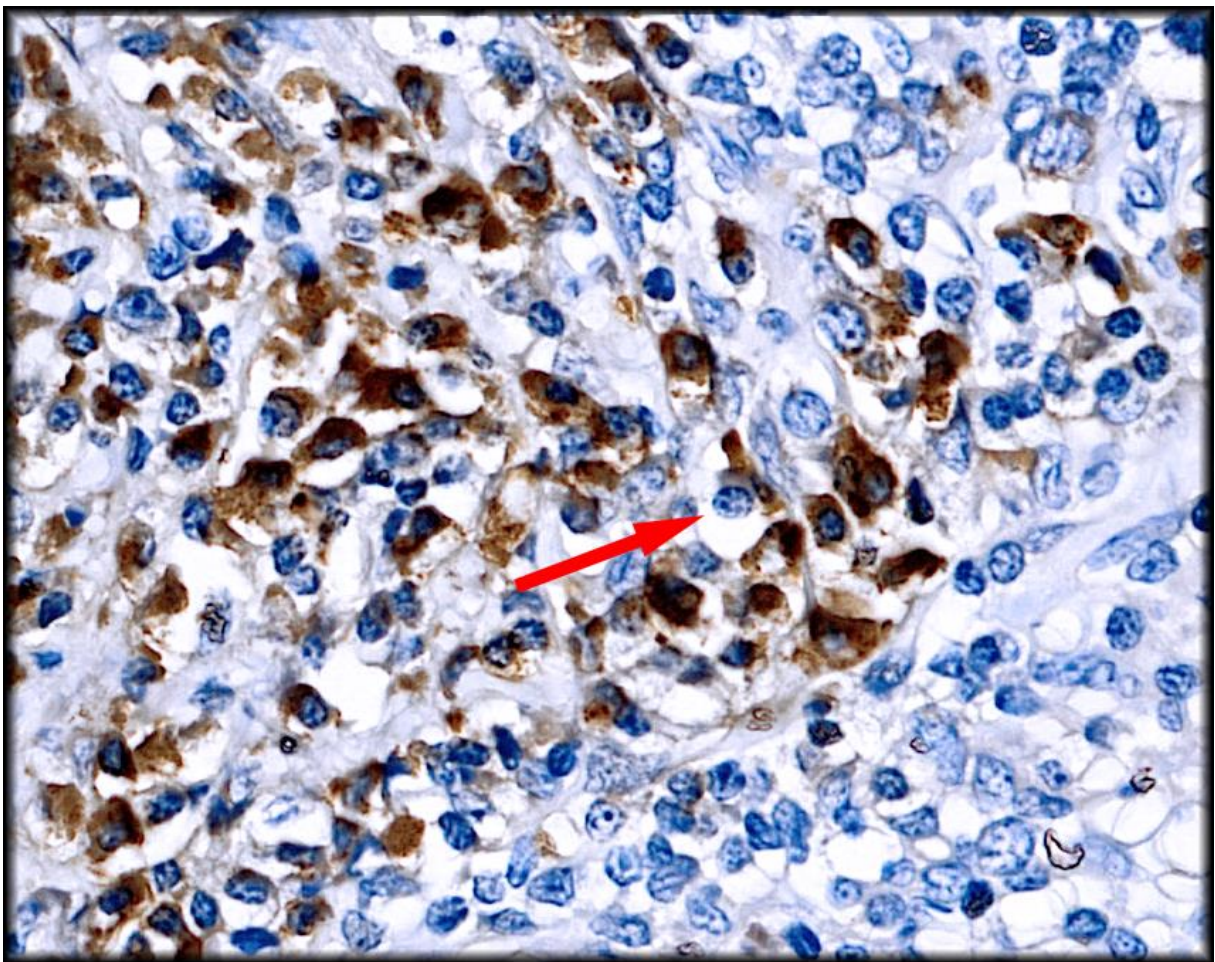
LyB – célula B; IHQ – imuno-histoquímica; PV – polpa vermelha; DP – desvio padrão; FC – fold change.

Figura 16 - Distribuição de células B na polpa vermelha do baço de hamsters: (A) – Micrografia das marcações de CD20 por IHQ na PV do baço de hamsters (Barra de escala 50µm). (B) – Gráfico da mensuração de densidade de células marcadas. As linhas representam a média com DP. (C) – Representação gráfica do FC dos animais infectados nos diferentes pontos de acompanhamento. Os símbolos representam as médias e as linhas o DP. **Número de animais:** n=7/grupo (30, 60, 150 dpi), n=7 [controle] e n=6 [infectado] (120 dpi).

Fonte: Elaboração do autor

5.7 PROPORÇÃO DE PLASMÓCITOS NO BAÇO

As células marcadas com CD138 no baço de hamsters possuíam morfologia de PC (Figura 17), entretanto, foi observado que algumas células com aspectos de PC não foram marcadas pela reação de IHQ por CD138, embora fosse com pouca frequência (Figura 17, seta vermelha). As células marcadas se concentravam na PALS, principalmente na periferia desse compartimento na região de PB, e observamos também a marcação dos vasos sanguíneos pela reação, como a marcação da ArtC (Figura 18, A). Enquanto na PV, foi pouco frequente a observação de PC entre os cordões esplênicos nos pontos de avaliação.

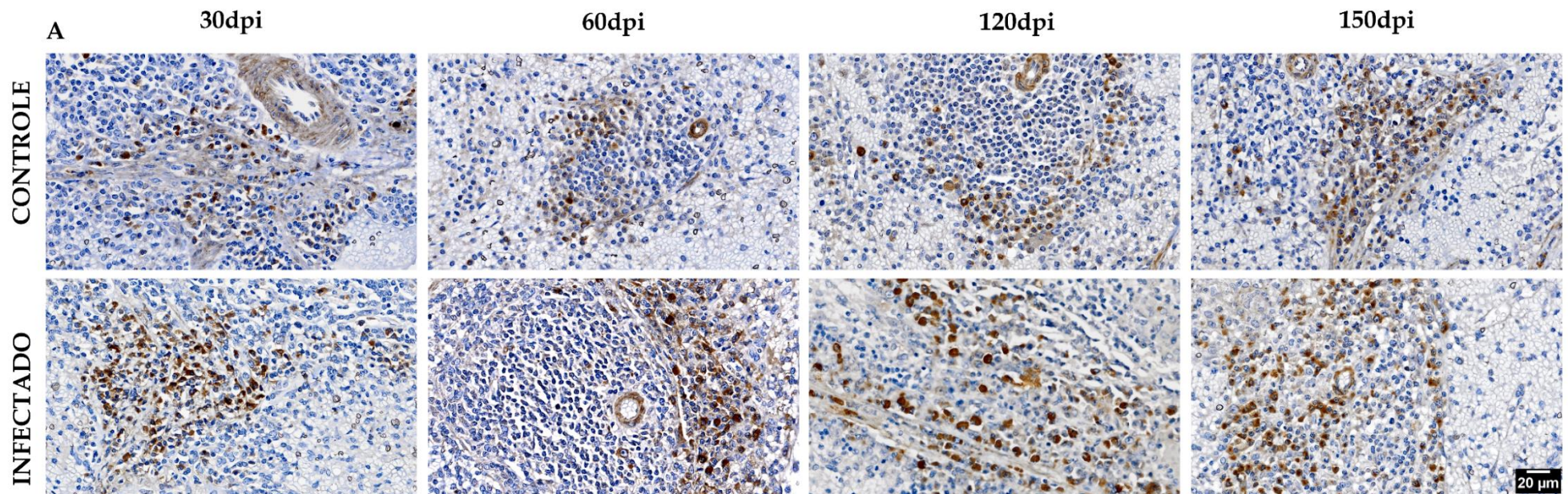


IHQ – imuno-histoquímica; PB – polpa branca; PC – plasmócitos.

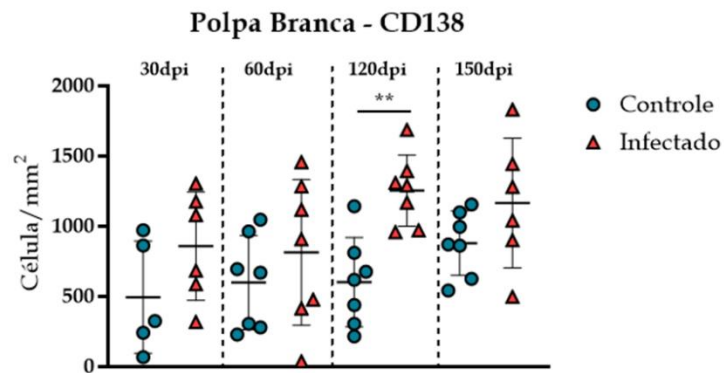
Figura 17 - Marcação de células CD138⁺ no baço de hamsters: Micrografia da marcação de CD138 por IHQ na PB do baço de hamster. É possível observar células com aspecto de PC marcados pela reação e uma célula com aspecto de plasmócitos não marcado (**Seta vermelha**).

Fonte: Elaboração do autor

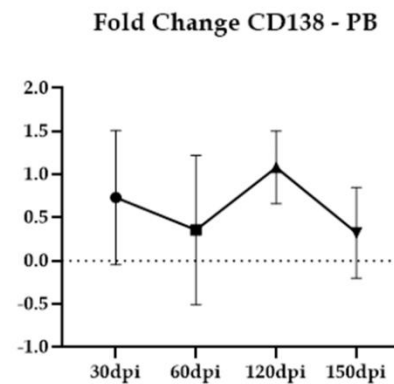
A contagem de PC na PB de 5 áreas de *hotspot* em 5 folículos linfóides, demonstrou um aumento de PC na PALS dos animais infectados 120 dpi, (Mann-Whitney, $p < 0,01$ - Figura 18, B). A expressão diferencial da densidade de células marcadas não demonstrou nenhuma alteração significativa ao longo da cinética, mas manteve-se relativamente alta em todos os pontos, com maior ponto de elevação 120 dpi (Figura 18, C). Além disso, quando foi estratificado a proporção de PC no grupo infectado entre os animais que apresentavam ou não desorganização do baço, não foi observada nenhuma alteração na comparação entre eles, só quando comparado entre controle e infectado-desorganizado (Kruskal-Wallis, $p < 0,01$ – Figura 18, D).



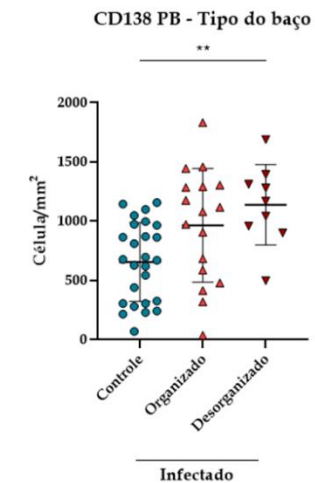
B



C



D



PC – plasmócitos; IHQ – imuno-histoquímica; PB – polpa branca; DP – desvio padrão; FC – fold change.

Figura 18 - Proporção de plasmócitos na polpa branca no baço de hamsters: (A) – Micrografia das marcações de CD138 por IHQ na PB do baço de hamsters (Barra de escala 20µm). (B) – Gráfico da mensuração de densidade de células marcadas. As linhas representam a média com DP. (C) – Representação gráfica do FC dos animais infectados nos diferentes pontos de acompanhamento. Os símbolos representam as médias e as linhas o DP. **Número de animais:** n=5 [controle] e n=6 [infectado] (30 dpi), n=7/grupo (60, 120 dpi), n=7 [controle] e n=6 [infectado] (150 dpi). (D) - Representação gráfica da densidade de PC estratificado pela classificação histológica do baço nos animais infectados (n=26 [controle], n=17 [infectado-organizado] e n=9 [infectado-desorganizado]).

Fonte: Elaboração do autor

5.8 DISPROTEINEMIA

A análise da hiperglobulinemia nos animais infectados foi realizada através da avaliação da disproteinemia, pela estimativa da proporção de albumina em relação aos níveis de globulinas séricas, medido em um exame bioquímico de proteínas totais e frações do soro. Não foi observada nenhuma alteração nos níveis plasmáticos de globulinas nos animais com LV (Figura 17, A). Houve apenas uma tendência de aumento 30 e 150 dpi, que foi apresentada também pela análise diferencial da razão entre os dois marcadores (Figura 17, B).

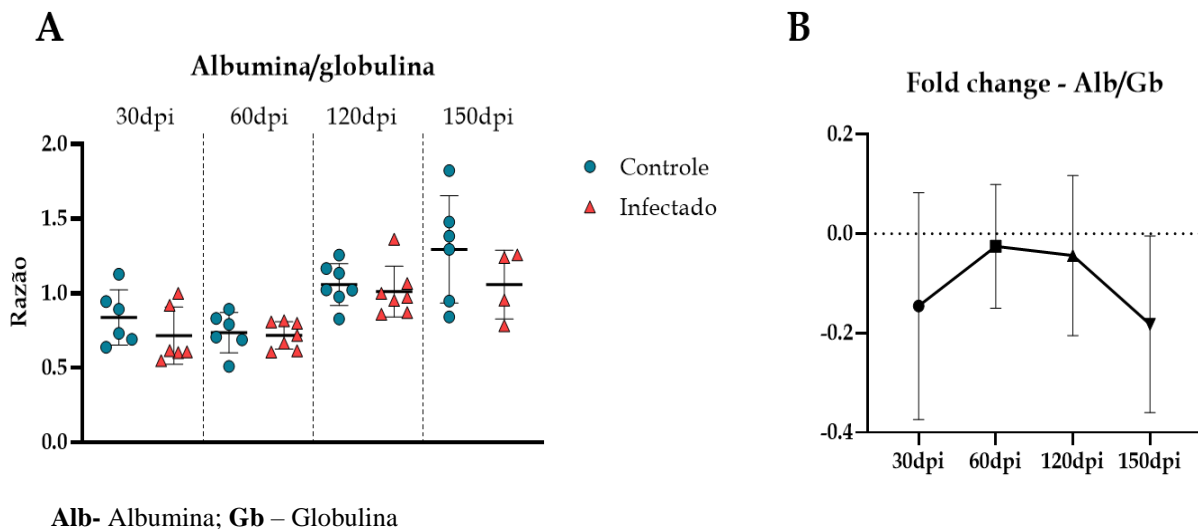


Figura 19 - Análise da disproteinemia: (A) – Gráfico da razão entre albumina e globulina sérica. As linhas representam a média com DP. (B) – Representação gráfica do FC da razão encontrada nos animais infectados, nos diferentes pontos de acompanhamento. Os símbolos representam as médias e as linhas o DP. **Número de animais:** n=6/grupo (30 dpi), n=6 [controle] e n=7 [infectado] (60 dpi), n=7/grupo (120 dpi), n=6 [controle] e n=4 [infectado] (150 dpi).

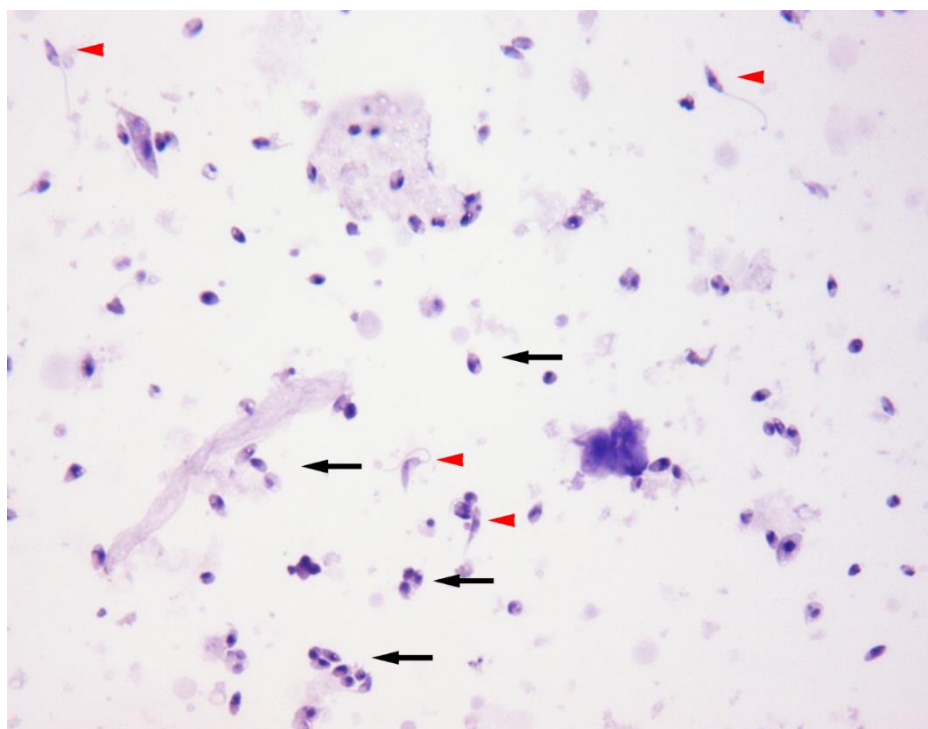
Fonte: Elaboração do autor

5.9 ESPECIFICIDADE DE PC NO BAÇO

Foi proposto a realização da técnica de IHQ modificada para avaliar a especificidade de PC contra antígenos biotinilados das formas amastigotas e promastigotas de *L. infantum*, assim como, a distribuição dessas células nos diferentes compartimentos esplênicos. No entanto, não obtivemos êxito nas marcações e padronização da técnica no baço de hamsters em tecido FFPE. Foram testadas diferentes concentrações do abPro (1:50, 1:100 e 1:200), a partir da diluição padronizada em um trabalho anterior (1:100), no baço de cães naturalmente infectados por *Leishmania* (FONTES et al., 2021). Além da utilização de diferentes formas de recuperação antigênica, como a mediada por calor em tampão Trisi-EDTA (pH 9.0) e citrato (pH 6.0), o

método enzimático com o uso de proteinase K e até mesmo uma dupla recuperação e associação dos dois métodos, com uma etapa de recuperação na panela de pressão elétrica, seguido da incubação com a proteinase K. A incapacidade de aplicar a marcação em nosso trabalho pode ter sido decorrente do método de conservação, uma vez que, a técnica é mais bem aplicada em amostras congeladas (MIZUTANI et al., 2016).

Apesar de não ter sido possível realizar a marcação e avaliação da especificidade de PC *in situ*, foi possível padronizar a diferenciação e isolamento de formas amastigotas de *L. infantum*, que era um objetivo secundário, considerando a utilização do abAms para as marcações. Assim, foi estabelecido um método de diferenciação *in cell* com a infecção de MΦ de linhagem murino (J774) com as formas promastigotas, em que se obteve após 24h de infecção (48h de cultivo) o isolamento de formas amastigotas das células infectadas, com morfologia característica de amastigotas de *Leishmania* (formas arredondadas com ausência do flagelo) (Figura 18, setas pretas). No entanto, foi observada também a presença de algumas formas promastigotas após o isolamento, que foi atribuído como contaminação da etapa de infecção celular de parasitos não internalizados (Figura 18, pontas de seta vermelhas).



MΦ – macrófagos.

Figura 20 - Diferenciação de amastigotas de *L. infantum*: Isolamento de formas amastigotas de MΦ (J774) infectados com formas promastigotas de *L. infantum*. **Setas pretas:** formas amastigotas de *L. infantum*; **Pontas de seta vermelhas:** formas promastigotas de *L. infantum*.

Fonte: Elaboração do autor

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho realizamos a identificação de moléculas e mecanismos potencialmente envolvidos com a diferenciação anômala de LyB e acúmulo de PC no baço durante a LV. Fizemos isso a partir da validação de dados transcriptômicos do baço de hamsters com LV através da identificação IHQ de DLK1, além da análise de transcritos e vias de interação gênica relacionadas com o desenvolvimento de LyB e diferenciação de PC. Paralelamente, correlacionamos esses dados com a análise da distribuição de LyB nos diferentes compartimentos esplênicos.

Dentre os modelos experimentais disponíveis, o hamster (*Mesocricetus auratus*) caracteriza-se como um dos melhores de representação da doença observada em humanos. Isso se dá pelo fato do animal apresentar sinais clínicos clássicos da doença, como a hepatoesplenomegalia após 90 dpi e hipergamaglobulinemia (DEA-AYUELA et al., 2007; DORES MOREIRA et al., 2016; MELBY et al., 2001; REQUENA et al., 2000; VILAS et al., 2021). Além disso, os animais também apresentam alterações laboratoriais compatíveis com a doença, como a diminuição do hematócrito, redução do número de hemácias e hemoglobina, além do aumento de marcadores bioquímicos hepáticos e renais, principalmente nos pontos 180 e 270 dpi (DORES MOREIRA et al., 2016).

A atrofia com progressão para desorganização da PB do baço já foi observada em hamsters com LV (RIÇA-CAPELA et al., 2003; VERESS; ABDALLA; EL HASSAN, 1983; VILAS et al., 2021). Neste trabalho os animais apresentaram hepatoesplenomegalia, mas apenas dois animais apresentaram a desorganização completa do baço em 150 dpi. Além disso, não foram observadas alterações laboratoriais. Sendo que a ausência de alterações significativas pode ser justificável pela heterogeneidade dos animais, além do tempo e rota de infecção usados.

A análise IHQ da distribuição de células DLK1⁺ mostrou uma tendência de aumento destas células no baço de animais infectados, principalmente entre os pontos iniciais (30 e 60 dpi), mas que se manteve em todo o curso da doença. Apenas nos animais com doença grave e que foram incluídos nas análises transcriptômicas, observamos uma diminuição destas células nos pontos de 120 e 150 dpi. Esse dado se correlaciona com o resultado de expressão transcricional publicado pelo nosso grupo (VILAS et al., 2021), e com o descrito na infecção de camundongos por *L. donovani*, em que também houve regulação negativa da expressão de *DLK1* entre 21 e 42 dpi (ASHWIN et al., 2018).

Além da heterogeneidade do grupo de animais estudados por IHQ uma possível explicação para a ausência de significância observada, é que a expressão gênica por RNA mensageiro (mRNA) nem sempre tem uma correlação direta com a expressão de proteínas (BAUERNFEIND; BABBITT, 2017; PAYNE, 2015; REIMEGÅRD et al., 2021). Este efeito se deve os processos de regulação pós-translacional, além das diferenças entre as taxas de síntese e decaimento entre as duas moléculas (PAYNE, 2015). Dessa forma, Reimegård e colaboradores (2021) demonstraram que a expressão de mRNA não foi capaz de refletir a concentração de proteínas no mesmo tempo de análise, porém houve uma concordância na direção das mudanças de expressão de mRNA e proteínas no desenvolvimento neuronal ao longo do tempo.

É possível que a hiperexpressão de DLK1 na fase inicial da infecção possa permanecer por um longo período, até estágios mais tardios da doença. Mesmo com a permanência da tendência de aumento neste período, a expressão diferencial é menor em relação aos pontos iniciais, demonstrando uma mudança na mesma direção da expressão transcricional. Sendo que nos animais susceptíveis esse decaimento é maior, levando à redução de células DLK1⁺ observada.

Além da diferença no papel das isoformas de DLK1 em prevenir a diferenciação ou proliferação de células, é proposto também que a sinalização pelo reconhecimento de DLK1 pode ocorrer de maneira NOTCH-dependente ou independente. Sendo que esta segunda forma ocorre através da modulação da via MAPK/EKR, importante para os processos de diferenciação e proliferação celular (PITTAWAY et al., 2021; TRAUSTADÓTTIR et al., 2019b), incluindo a ativação e proliferação de LyB, assim como, a diferenciação de PC (KHIEM et al., 2008; RAMAN; CHEN; COBB, 2007; SCHEFFLER et al., 2021).

A via MAPK é um dos alvos da modulação da resposta do hospedeiro por *Leishmania*, contribuindo para a diminuição da expressão de IL-12 e indução de IL-10 (SOARES-SILVA et al., 2016). Aqui, como demonstramos a interação entre *DLK1* e IL-12 para LyB, a modulação de MAPK/ERK pode ser uma via em comum entre as duas moléculas favorecendo a plasmocitose.

A via de desenvolvimento de LyB que inclui *DLK1* está associada com a diferenciação de PC pelo eixo com a família de citocinas IL-12, em que se observa a diminuição dessas citocinas nos pontos finais (120 e 150 dpi). A IL-12 atua na diferenciação de PC secretoras de IgM, e o aumento dela induz a diferenciação de PC de vida curta, inibindo a resposta de CG (KIM et al., 2008; MOENS; TANGYE, 2014). Além disso, esta citocina em conjunto com

outras da resposta Th1 possuem efeito protetivo na LV, no entanto, é observado uma regulação na expressão destas citocinas efetoras em formas ativas da LV e a disfunção na produção de IL-12 por células DCs em estágios crônicos da LV (DAYAKAR et al., 2019; FALEIRO et al., 2014; KUMAR; NYLÉN, 2012; SAMANT et al., 2021; VOLPEDO et al., 2021).

A infecção experimental de hamsters por *L. donovani* demonstrou pequeno aumento inicial de IL-12 até 28 dias de infecção, mas que não se sustentou no ponto seguinte 56 dias após, sendo também o último ponto de avaliação. Além disso, estes animais não apresentaram alteração significativa nos títulos de IgM (MELBY et al., 2001). Por outro lado, nosso grupo demonstrou a diminuição de IL-12B (IL-12p40) no baço dos animais infectados por *L. infantum*, no mesmo período (120 e 150 dpi) (VILAS et al., 2021).

Na análise transcriptômica de vias de desenvolvimento de LyB, também demonstramos que IL-21 e IFN- γ possuem papel central durante a infecção e estão relacionadas com a diferenciação de PC a partir de 60 dpi. A IL-21 é um dos estímulos derivados da interação entre células Thf e LyB para a indução da diferenciação de PC na resposta TD, e possui um papel importante tanto na formação do foco extrafolicular de PC de vida curta como na formação e desenvolvimento da resposta de CG, responsável pela formação de PC de vida longa (ETTINGER et al., 2005; LINTERMAN et al., 2010; ORACKI et al., 2010; OZAKI et al., 2004; ZHANG; GARCIA-IBANEZ; TOELLNER, 2016; ZOTOS et al., 2010). Enquanto o IFN- γ está envolvido na produção de IgG2 (JURADO et al., 1989; KAWANO; NOMA; YATA, 1994). Sendo que a produção de ambos, IFN- γ e IL-21 já foi relatada no baço de hamsters infectados por *L. donovani*, em que houve o IgG2 como o principal isotipo secretado (KONG et al., 2017; MEDINA-COLORADO et al., 2017; MELBY et al., 2001).

Em outras condições essas moléculas também estão envolvidas com a diferenciação de PC produtores de IgG2. Durante a infecção por *Plasmodium* em modelo experimental, a produção de IL-21 e co-expressão com IFN- γ foi observada. Sendo que a sinalização por IL-21 em LyB foi necessária para controle da infecção (PÉREZ-MAZLIAH et al., 2015). O aumento excessivo de IL-21 também ocorre no SLE, promovendo a diferenciação de PC autorreativos (OZAKI et al., 2004; WANG et al., 2018). Além disso, a apresentação antigênica por LyB induziu a produção de IFN- γ por células Thf no SLE, sendo que a ausência da sinalização mediada por IFN- γ em LyB inibiu a produção de AC IgM, IgG2 e IgG2c autorreativos (JACKSON et al., 2016). Portanto, o aumento de IL-21 e INF- γ demonstrados neste trabalho pode representar a interação entre LyB e Thf, induzindo um grande estímulo para diferenciação de PC produtores de IgG2 na LV.

A via de interação gênica em que houve aumento de IL-21 e IFN- γ , está relacionada à diferenciação de PC pela regulação das moléculas CXCR5, PAX5, CD21, CD72, CD79B e SPIB, 120 e 150 dpi. A regulação negativa destas moléculas ocorre como processo da transformação e mudança de fenótipo de LyB em PC (NUTT et al., 2015; ORACKI et al., 2010; SHAPIRO-SHELEF; CALAME, 2005; WU; BONDADA, 2002).

Apesar de não ter diferença na expressão transcricional de nenhum fator relacionado com a diferenciação de PC, BLIMP1 apresentou uma tendência de aumento, principalmente nos pontos 60 e 120 dpi. Esta tendência pode indicar uma expressão intermediária de BLIMP1 (BLIMP1^{int}). Sendo que a população de PC BLIMP1^{int} são os de vida curta recém-formados, gerados de maneira mais rápida (ORACKI et al., 2010). Estes PC BLIMP1^{int} podem se diferenciar terminalmente nos PC de vida longo com alta expressão de BLIMP1, provavelmente devido estímulos de sobrevivência nos nichos em locais como a medula óssea (NUTT et al., 2015; ORACKI et al., 2010). Como não observamos aumento na expressão de muitos fatores de sobrevivência (apenas IL-6) até o último ponto de análise, isso pode justificar a expressão intermediária de BLIMP1 e a prevalência de PC de vida curta.

Os dados transcriptômicos se correlacionam com a diferenciação e acúmulo de PC na PALS 120 dpi, evidenciado neste trabalho. A PALS é um local de trânsito e saída de PC para a PV (ORACKI et al., 2010), e cães com LV apresentam o acúmulo dessas células nesse local, além da região de PV (FONTES et al., 2021).

A plasmocitose na PV é um achado característico das alterações do baço durante a LV, mantidos através da secreção de BAFF e APRIL (SANTANA et al., 2008; SILVA-O'HARE et al., 2016). Esta diferenciação anômala de LyB pode ser decorrente do fenômeno de ativação policlonal de LyB (SILVA-BARRIOS; CHARPENTIER; STÄGER, 2018). Aqui, não quantificamos os PC presentes na PV, mas observamos a presença deles e como houve a plasmocitose na PALS, que pode indicar a migração das células geradas através da sinalização por IL-21 e IFN- γ na PB, é possível que haja um aumento também na PV.

A manutenção inicial de PC 150 dpi, pode estar relacionada com a secreção apenas de IL-6 150 dpi. O aumento de IL-6 já foi relatado na infecção experimental de hamsters por *L. donovani* (KONG et al., 2017). Além disso, a IL-6 por si só é capaz de suportar a sobrevivência de PC em cultura, no entanto, este efeito é muito maior com adição de outros fatores, como BAFF ou APRIL (JOURDAN et al., 2014).

Em uma doença inflamatória neurológica, em que há aumento de plasmoblastos, apenas a adição de IL-6 foi suficiente para manutenção dessas células em cultivo, sendo que a adição

de BAFF ou APRIL não surtiu efeito (CHIHARA et al., 2011). Assim, a expressão de IL-6 pode suportar inicialmente a sobrevivência de células imaturas, mas é possível que essa manutenção de PC seja substituída pela expressão de BAFF e APRIL com um maior tempo de infecção, como observado na infecção natural da doença.

Em relação aos LyB, a expressão transcriptômica de BACH2, BCL-6 e MTA3 apresentaram tendência de diminuição a partir de 60 dpi, com menor nível 150 dpi. Estes fatores estão relacionados com a formação do CG e os processos de maturação da resposta de AC que ocorrem nesse local (NUTT et al., 2015; ORACKI et al., 2010; SHAPIRO-SHELEF; CALAME, 2005). Além disso, este dado corrobora com a atrofia de CG observada pela análise histológica dos animais, demonstrado previamente pelo nosso grupo (VILAS et al., 2021). Portanto, esta tendência de diminuição pode indicar um prejuízo na resposta de CG, favorecendo a inespecificidade de PC contra antígenos de *Leishmania* durante infecção.

Os dados da nossa análise transcriptômica correlacionam-se também com a nossa análise IHQ da distribuição de LyB. Houve diminuição de CXCL13 e CXCL12 em pontos tardios da infecção, 120 e 150 dpi. Sugerindo que a migração de LyB foi afetada no curso da LV em hamsters. A perda da sinalização por CXCL13 em decorrência da diminuição de FDCs, contribuindo para a redução de LyB FO e atrofia da PB foi observada na infecção natural de cães com forma grave da LV (SILVA et al., 2012). Já CXCL12 apresentou aumento no baço de cães com LV e foi associada como um dos fatores responsáveis pela migração e acúmulo de PC na PV (SILVA-O'HARE et al., 2016). No entanto, isso também não foi observado durante a infecção de hamsters por *L. donovani*, em que a expressão transcriptômica demonstrou uma regulação negativa de CXCL12 (KONG et al., 2017).

A sinalização por CXCL12 é necessária para a retenção de LyB na ZM (WANG et al., 2012), e sua diminuição pode ser responsável pela redução de LyB ZM, contribuindo para a perda da delimitação dessa região, como ocorre na LV (SANTANA et al., 2008; SILVA et al., 2012). Além disso, CXCL12 desempenha um papel importante na recirculação de LyB FO no CG, contribuindo para a produção de AC de alta afinidade (BARINOV et al., 2017). Estas alterações na migração e moléculas relacionadas com a organização do baço pode ser decorrente da diminuição de Linfotóxina- α (LTA), observada nos transcritos do baço de hamsters infectados por *L. infantum* (VILAS et al., 2021).

Houve hiperplasia das áreas de LyB da PB 120 dpi, seguido de atrofia 150 dpi. A desorganização do baço com progressão para atrofia do FL é precedido por uma fase

hiperplásica reacional da PB (HERMIDA et al., 2018). Sendo que o prejuízo na quimiotaxia de LyB 120 e 150 dpi, pode ser o responsável pela alteração na celularidade da PB 150 dpi.

Outro aspecto identificado na avaliação transcriptômica, foi o aumento de CDKN1A, induzido pela sinalização de IFN- γ , e que interage com TAL1 na via de diferenciação de LyB, além de MITF na expressão transcricional, 120 e 150 dpi. Sendo estes fatores relacionados com a regulação do ciclo celular. O CDKN1A é um inibidor do ciclo celular (LIM; KALDIS, 2013; MALUMBRES; BARBACID, 2009), e sua expressão pode ser induzida por IFN- γ , causando a parada do ciclo celular (SCHRODER et al., 2004). Sendo que o aumento de CDKN1A pode ser um dos fatores responsáveis pela inibição da resposta de CG. Uma vez que o BCL-6 inibe a expressão de CDKN1A, e foi demonstrado que a regulação dele é necessária para a formação do CG (BÉGUELIN et al., 2017; NUTT et al., 2015).

Adicionalmente, nosso grupo já demonstrou a hiperexpressão de outro inibidor do ciclo celular o CDKN2A na LV experimental, que foi associado com a regulação das moléculas envolvidas na desorganização do baço (VILAS et al., 2021). Além disso, a expressão de ambos (CDKN1A e 2A) foram relatados em casos de leishmaniose cutânea por *L. braziliensis* antes do tratamento. Sendo que a expressão destes inibidores, junto com outros fatores, estava relacionada com um fenótipo de senescência celular e a produção de um conjunto de mediadores inflamatórios, associados com a gravidade da doença (FANTECELLE et al., 2021). Além disso, o fenótipo de células secretoras associado a senescência já foi observado para LyB em tecido adiposo de pacientes obesos, em que foi demonstrado o aumento de CDKN1 e 2A (FRASCA et al., 2021).

O aumento das outras moléculas reguladoras do ciclo celular demonstradas neste trabalho, podem contribuir para a expressão de CDKN1A e o estado de senescência. A expressão de TAL1 em células tronco hematopoiéticas pode controlar o estado quiescente dessas células através da indução de CDKN1A (LACOMBE et al., 2010). Enquanto MITF, apesar de ser um fator com função na manutenção do estágio de LyB (ORACKI et al., 2010; SHAPIRO-SHELEF; CALAME, 2005), também pode estar relacionado com a indução da senescência celular, por ser capaz de induzir a expressão de CDKN1A, contribuindo para a parada do ciclo celular, como observado para células de melanoma (CARREIRA et al., 2005; WANG et al., 2016).

Como foi mencionado, apesar dos altos títulos de AC, boa parte desses são inespecíficos contra os antígenos de *Leishmania*, o que impede o reconhecimento e os mecanismos efetores dos AC (SILVA-BARRIOS; CHARPENTIER; STÄGER, 2018). A inespecificidade de AC

além de prejudicar a proteção humoral contra a infecção, eles podem se acumular em outros órgãos formando imunocomplexos, causando uma resposta inflamatória local e danos ao tecido (REQUENA et al., 2000; SAMANT et al., 2021; SILVA-BARRIOS; CHARPENTIER; STÄGER, 2018).

Alguns trabalhos apontam que os AC específicos também contribuem para a patogênese da doença na doença natural em cães e modelo experimental de camundongo infectado por *L. donovani* (FONTES et al., 2021; SILVA-BARRIOS; STÄGER, 2019). Sendo que a diminuição da resposta Tr1, a diminuição do nível de IL-10 e aumento da resposta Th1, foram os efeitos observados quando foi realizado a inibição da produção de AC específicos em camundongos. Demonstrando uma capacidade imunoreguladora dos AC produzidos durante a infecção (SILVA-BARRIOS; STÄGER, 2019). Entretanto, no presente trabalho não foi observado disproteinemia nos hamsters com LV, indicando conseqüentemente a ausência de hipergamaglobulinemia nos estágios de observação deste experimento. É necessário ressaltar que poucos animais apresentaram uma forma de doença grave até o último ponto de análise e obtivemos amostra de apenas 4 animais. Estes fatores podem ter contribuído para o resultado encontrado.

Neste trabalho observamos que com 30 dpi não houve muitas alterações do ponto de vista histológico ou transcricional no baço de animais infectados, com exceção da hiperexpressão do transcrito de *DLK1* neste ponto. A partir de 60 dpi ocorre algumas mudanças a nível transcricional nos animais infectados por *L. infantum*, como a sinalização de IL-21 e IFN- γ para a diferenciação de PC, possivelmente devido a interação entre LyT-LyB, além de um provável aumento de células $DLK1^+$ nos hamsters com LV.

Como previsto pela análise transcriptômica, foi observado a diferenciação e aumento de PC na PALS 120 dpi, hiperplasia da área de LyB da PB nos animais com LV. Enquanto 150 dpi houve atrofia desta área da PB em hamsters infectados, que pode ser decorrente da diminuição da quimiotaxia para LyB (CXCL12 e CXCL13) que também ocorreu nestes animais durante este período. No ponto final de análise também observamos uma diminuição da resposta de centro germinativo, contribuindo para a atrofia da PB observada. A análise transcriptômica demonstrou ainda o aumento de moléculas relacionadas com a senescência celular 150 dpi e que a sobrevivência dos PC gerados pode ser mantida inicialmente pela secreção de IL-6.

6 CONCLUSÕES

1. As vias relacionadas a diferenciação de LyB em hamsters com LV incluem a regulação positiva de IL-21 e IFN- γ , e demonstra que DLK1 está associada com as citocinas IL-12 no papel de diferenciação de PC;
2. Nos hamsters com LV ocorre a diminuição da quimiotaxia de LyB/PC;
3. Hamsters com LV apresentam uma fase de hiperplasia da PB que antecede a atrofia e desorganização;
4. Os hamsters com LV apresentam aumento do trânsito e acúmulo de PC na PALS em estágio tardio de infecção.

Além disso, não houve correlação entre a disproteinemia e as alterações encontradas no baço de animais infectados, já que os animais não apresentaram hiperglobulinemia. Devido ao método de preservação do material, não foi possível identificar os PC específicos para antígenos de *L. infantum* no baço de animais infectados.

REFERÊNCIAS

- ANVERSA, L. S. et al. **Human leishmaniasis in Brazil: A general review. Revista da Associacao Medica Brasileira** Associacao Medica Brasileira, , 1 mar. 2018.
- ASHWIN, H. et al. Tissue and host species-specific transcriptional changes in models of experimental visceral leishmaniasis. **Wellcome Open Research**, v. 3, 2018.
- BARINOV, A. et al. Essential role of immobilized chemokine CXCL12 in the regulation of the humoral immune response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 9, p. 2319–2324, 28 fev. 2017.
- BAUERNFEIND, A. L.; BABBITT, C. C. The predictive nature of transcript expression levels on protein expression in adult human brain. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, 24 abr. 2017.
- BÉGUELIN, W. et al. EZH2 enables germinal centre formation through epigenetic silencing of CDKN1A and an Rb-E2F1 feedback loop. **Nature Communications 2017 8:1**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 12 out. 2017.
- BROZMAN, M. Outer mantle zone of the follicle in the human spleen. **Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histopathology**, v. 407, n. 1, p. 107–117, mar. 1985.
- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 15 set. 2018.
- CARREIRA, S. et al. Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression. **Nature 2005 433:7027**, v. 433, n. 7027, p. 764–769, 17 fev. 2005.
- CERUTTI, A.; COLS, M.; PUGA, I. Marginal zone B cells: Virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 2, p. 118–132, 2013.
- CESTA, M. F. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. **Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 5, p. 455–465, 25 jun. 2006.
- CHIHARA, N. et al. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 9, p. 3701–3706, 1 mar. 2011.
- 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, p. e0006445, 20 abr. 2018.
- DAYAKAR, A. et al. Cytokines: Key determinants of resistance or disease progression in visceral leishmaniasis: Opportunities for novel diagnostics and immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. APR, p. 670, 2019.
- DEA-AYUELA, M. A. et al. Setting New Immunobiological Parameters in the Hamster Model of Visceral Leishmaniasis for In Vivo Testing of Antileishmanial Compounds. **Veterinary Research Communications 2007 31:6**, v. 31, n. 6, p. 703–717, 19 jan. 2007.
- DEAK, E. et al. Murine visceral leishmaniasis: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 5, p. 1355–1368, 1 maio 2010.

DOBIN, A. et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, v. 29, n. 1, p. 15–21, 2013.

DORES MOREIRA, N. DAS et al. Clinical, hematological and biochemical alterations in hamster (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected with *Leishmania infantum* through different routes of inoculation. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 31 mar. 2016.

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

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, p. 1–7, 9 set. 2014.

ETTINGER, R. et al. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 175, n. 12, p. 7867–7879, 15 dez. 2005.

FALEIRO, R. J. et al. Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e2914, 2014.

FALIX, F. A. et al. Possible roles of DLK1 in the Notch pathway during development and disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 6, p. 988–995, 1 jun. 2012.

FANTECELLE, C. H. et al. Transcriptomic landscape of skin lesions in cutaneous leishmaniasis reveals a strong CD8⁺ T cell immunosenescence signature linked to immunopathology. **Immunology**, v. 164, n. 4, p. 754–765, 1 dez. 2021.

FONTES, J. L. M. et al. Anti-*Leishmania infantum* Antibody-Producing Plasma Cells in the Spleen in Canine Visceral Leishmaniasis. **Pathogens 2021, Vol. 10, Page 1635**, v. 10, n. 12, p. 1635, 17 dez. 2021.

FRASCA, D. et al. B Cells with a Senescent-Associated Secretory Phenotype Accumulate in the Adipose Tissue of Individuals with Obesity. **International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 1839**, v. 22, n. 4, p. 1839, 12 fev. 2021.

GOTO, Y. et al. Elevation of Serum B-Cell Activating Factor Levels During Visceral Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 5, p. 912–914, 5 nov. 2014.

HASKER, E. et al. Strong Association between Serological Status and Probability of Progression to Clinical Visceral Leishmaniasis in Prospective Cohort Studies in India and Nepal. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. e2657, 2014.

HERMIDA, M. D. E. R. et al. Histological Disorganization of Spleen Compartments and Severe Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, n. November, p. 394, 2018.

JACKSON, S. W. et al. B cell IFN- γ receptor signaling promotes autoimmune germinal centers via cell-intrinsic induction of BCL-6. **Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 5, p. 733–750, 2 maio 2016.

- JOURDAN, M. et al. IL-6 supports the generation of human long-lived plasma cells in combination with either APRIL or stromal cell-soluble factors. **Leukemia** **2014** **28:8**, v. 28, n. 8, p. 1647–1656, 7 fev. 2014.
- JURADO, A. et al. The immunomodulatory effects of interferon-gamma on mature B-lymphocyte responses. **Experientia** **1989** **45:6**, v. 45, n. 6, p. 521–526, jun. 1989.
- KAWANO, Y.; NOMA, T.; YATA, J. Regulation of human IgG subclass production by cytokines. IFN-gamma and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. **The Journal of Immunology**, v. 153, n. 11, 1994.
- KHIEM, D. et al. A p38 MAPK-MEF2C pathway regulates B-cell proliferation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 44, p. 17067–17072, 4 nov. 2008.
- KIM, S. J. et al. Increased IL-12 inhibits B cells' differentiation to germinal center cells and promotes differentiation to short-lived plasmablasts. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 10, p. 2437–2448, 29 set. 2008.
- KONG, F. et al. Transcriptional Profiling in Experimental Visceral Leishmaniasis Reveals a Broad Splenic Inflammatory Environment that Conditions Macrophages toward a Disease-Promoting Phenotype. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 1, p. e1006165, 1 jan. 2017.
- KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. AUG, p. 251, 2012.
- LACOMBE, J. et al. Scl regulates the quiescence and the long-term competence of hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 115, n. 4, p. 792–803, 28 jan. 2010.
- LEWIS, S. M.; WILLIAMS, A.; EISENBARTH, S. C. Structure-function of the immune system in the spleen. **Science immunology**, v. 4, n. 33, 2019.
- LIM, S.; KALDIS, P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. **Development (Cambridge, England)**, v. 140, n. 15, p. 3079–3093, 1 ago. 2013.
- LIMA, V. M. F. DE et al. Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral blood of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 2–4, p. 147–153, 23 mar. 2012.
- LINTERMAN, M. A. et al. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 2, p. 353–363, 15 fev. 2010.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer** **2009** **9:3**, v. 9, n. 3, p. 153–166, mar. 2009.
- MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nature Reviews Immunology** **2005** **5:8**, v. 5, n. 8, p. 606–616, ago. 2005.
- MEDINA-COLORADO, A. A. et al. Splenic CD4+ T Cells in Progressive Visceral Leishmaniasis Show a Mixed Effector-Regulatory Phenotype and Impair Macrophage Effector Function through Inhibitory Receptor Expression. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0169496, 2017.
- MELBY, P. C. et al. The Hamster as a Model of Human Visceral Leishmaniasis: Progressive Disease and Impaired Generation of Nitric Oxide in the Face of a Prominent Th1-Like Cytokine Response. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 3, p. 1912–1920, 1 fev. 2001.

- MIZUTANI, Y. et al. Enzyme-labeled antigen method: Development and application of the novel approach for identifying plasma cells locally producing disease-specific antibodies in inflammatory lesions. **Acta Histochemica et Cytochemica**, v. 49, n. 1, p. 7–19, 2016.
- MOENS, L.; TANGYE, S. G. Cytokine-mediated regulation of plasma cell generation: IL-21 takes center stage. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. FEB, p. 65, 2014.
- NOTHELFER, K.; SANSONETTI, P. J.; PHALIPON, A. Pathogen manipulation of B cells: the best defence is a good offence. **Nature Reviews Microbiology** 2015 **13:3**, v. 13, n. 3, p. 173–184, 9 fev. 2015.
- NUTT, S. L. et al. The generation of antibody-secreting plasma cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 3, p. 160–171, 2015.
- OMACHI, S. et al. B-cell activating factor deficiency suppresses splenomegaly during *Leishmania donovani* infection. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 489, n. 4, p. 528–533, 5 ago. 2017.
- ORACKI, S. A. et al. Plasma cell development and survival. **Immunological Reviews**, v. 237, n. 1, p. 140–159, 1 set. 2010.
- OZAKI, K. et al. Regulation of B Cell Differentiation and Plasma Cell Generation by IL-21, a Novel Inducer of Blimp-1 and Bcl-6. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 9, p. 5361–5371, 1 nov. 2004.
- PAYNE, S. H. The utility of protein and mRNA correlation. **Trends in biochemical sciences**, v. 40, n. 1, p. 1–3, 2015.
- PÉREZ-MAZLIAH, D. et al. Disruption of IL-21 Signaling Affects T Cell-B Cell Interactions and Abrogates Protective Humoral Immunity to Malaria. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 3, p. e1004715, 1 mar. 2015.
- PILLAI, S.; CARIAPPA, A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 11, p. 767–777, 2009.
- PITTAWAY, J. F. H. et al. The role of delta-like non-canonical Notch ligand 1 (DLK1) in cancer. **Endocrine-related cancer**, v. 28, n. 12, p. R271–R287, 15 out. 2021.
- POLLOK, K. et al. The chronically inflamed central nervous system provides niches for long-lived plasma cells. **Acta neuropathologica communications**, v. 5, n. 1, p. 88, 25 nov. 2017.
- RAGHUNANDAN, R. et al. Dlk1 Influences Differentiation and Function of β Lymphocytes. <https://home.liebertpub.com/scd>, v. 17, n. 3, p. 495–507, 24 jun. 2008.
- RAMAN, M.; CHEN, W.; COBB, M. H. Differential regulation and properties of MAPKs. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3100–3112, 14 maio 2007.
- REIMEGÅRD, J. et al. A combined approach for single-cell mRNA and intracellular protein expression analysis. **Communications Biology** 2021 **4:1**, v. 4, n. 1, p. 1–11, 25 maio 2021.
- REQUENA, J. M. et al. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 76, n. 3–4, p. 269–281, 31 out. 2000.
- RIÇA-CAPELA, M. J. et al. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. **Parasitology research**, v. 89, n. 3, p. 163–169, 1 fev. 2003.

- ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139–140, 2009.
- RODRIGUES, V. et al. Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. **Parasites & Vectors** 2016 **9:1**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 1 mar. 2016.
- SAMANT, M. et al. Role of Cytokines in Experimental and Human Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 74, 18 fev. 2021.
- 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.
- SCHEFFLER, L. et al. ERK phosphorylation is RAF independent in naïve and activated B cells but RAF dependent in plasma cell differentiation. **Science Signaling**, v. 14, n. 682, 11 maio 2021.
- SCHRODER, K. et al. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 2, p. 163–189, 1 fev. 2004.
- SHAPIRO-SHELEF, M.; CALAME, K. C. Regulation of plasma-cell development. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 3, p. 230–242, 2005.
- 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, 2012.
- SILVA-BARRIOS, S.; CHARPENTIER, T.; STÄGER, S. The Deadly Dance of B Cells with Trypanosomatids. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 155–171, 1 fev. 2018.
- SILVA-BARRIOS, S.; STÄGER, S. Hypergammaglobulinemia sustains the development of regulatory responses during chronic Leishmania donovani infection in mice. **European Journal of Immunology**, v. 49, n. 7, p. 1082–1091, 1 jul. 2019.
- SILVA-O'HARE, J. et al. Disruption of splenic lymphoid tissue and plasmacytosis in canine visceral leishmaniasis: Changes in homing and survival of plasma cells. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–17, 2016.
- SOARES-SILVA, M. et al. The mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway: Role in immune evasion by trypanosomatids. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 183, 24 fev. 2016.
- TRAUSTADÓTTIR, G. Á. et al. The imprinted gene Delta like non-canonical Notch ligand 1 (Dlk1) is conserved in mammals, and serves a growth modulatory role during tissue development and regeneration through Notch dependent and independent mechanisms. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 46, p. 17–27, 1 abr. 2019a.
- TRAUSTADÓTTIR, G. Á. et al. The imprinted gene Delta like non-canonical Notch ligand 1 (Dlk1) is conserved in mammals, and serves a growth modulatory role during tissue development and regeneration through Notch dependent and independent mechanisms. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 46, p. 17–27, 1 abr. 2019b.
- VANDERBECK, A.; MAILLARD, I. Notch signaling at the crossroads of innate and adaptive immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 109, n. 3, p. 535–548, 1 mar. 2021.

- VERESS, B.; ABDALLA, R. E.; EL HASSAN, A. M. Visceral spreading depletion of thymus-dependent regions and amyloidosis in mice and hamsters infected intradermally with *Leishmania* isolated from Sudanese cutaneous leishmaniasis. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 64, n. 5, p. 505–514, 1983.
- VILAS, C. et al. Splenic Transcriptional Responses in Severe Visceral Leishmaniasis: Impaired Leukocyte Chemotaxis and Cell Cycle Arrest. v. 12, n. November, p. 1–15, 2021.
- VOLPEDO, G. et al. Determinants of Innate Immunity in Visceral Leishmaniasis and Their Implication in Vaccine Development. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 4258, 12 out. 2021.
- WANG, C. et al. Phosphorylation of MITF by AKT affects its downstream targets and causes TP53-dependent cell senescence. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 80, p. 132–142, 1 nov. 2016.
- WANG, H. et al. The CXCR7 chemokine receptor promotes B-cell retention in the splenic marginal zone and serves as a sink for CXCL12. **Blood**, v. 119, n. 2, p. 465–468, 12 jan. 2012.
- WANG, S. et al. IL-21 drives expansion and plasma cell differentiation of autoreactive CD11 χ T-bet χ B cells in SLE. **Nature Communications** **2018 9:1**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 1 maio 2018.
- WU, H. J.; BONDADA, S. Positive and negative roles of CD72 in B cell function. **Immunologic research**, v. 25, n. 2, p. 155–166, 2002.
- ZHANG, Y.; GARCIA-IBANEZ, L.; TOELLNER, K. M. Regulation of germinal center B-cell differentiation. **Immunological Reviews**, v. 270, n. 1, p. 8–19, 1 mar. 2016.
- ZOTOS, D. et al. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 2, p. 365–378, 15 fev. 2010.

APÊNDICE S1 : Recorte da publicação do trabalho de origem do material experimental e dado transcriptômico.



Splenic Transcriptional Responses in Severe Visceral Leishmaniasis: Impaired Leukocyte Chemotaxis and Cell Cycle Arrest

Caroline Vilas Boas de Melo¹, Felipe Guimarães Torres², Micely D'El-Rei Hermida^{1†}, Jonathan L. M. Fontes^{1†}, Bianca Ramos Mesquita¹, Reginaldo Brito¹, Pablo Ivan P. Ramos³, Gabriel R. Fernandes⁴, Luiz Antônio Rodrigues Freitas¹, Ricardo Khouf², Carlos Henrique Nery Costa⁵ and Washington L. C. dos-Santos^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:
Syamal Poy,
Indian Institute of Chemical Biology
(CSIR), India

Reviewed by:
Maritza Jaramila,
Université du Québec,
Canada
Mechavi Sudarshan,
Pallipuram University, India

***Correspondence:**
Washington L. C. dos-Santos
washington.santos@focruz.br

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:
This article was submitted to
Microbial Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 28 May 2021

Accepted: 18 October 2021

Published: 05 November 2021

Citation:
de Melo CVB, Guimarães Torres F,
Hermida MD'E-R, Fontes JLM,
Mesquita BR, Brito R, Ramos PIP,
Fernandes GR, Freitas LAR, Khouf R,
Costa CHN and dos-Santos WLC
(2021) Splenic Transcriptional
Responses in Severe Visceral
Leishmaniasis: Impaired Leukocyte
Chemotaxis and Cell Cycle Arrest.
Front. Immunol. 12:716314.
doi: 10.3389/fimmu.2021.716314

¹Laboratório de Patologia Estrutural e Molecular (LAPEM), Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil, ²Laboratório de Doenças Infecciosas Transmissíveis por Vetores (LBTV), Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil, ³Centro de Integração de Dados e Conhecimentos para Saúde (CIDACS), Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil, ⁴Informática de Biosistemas, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Brazil, ⁵Departamento de Medicina Comunitária, Instituto de Doenças Tropicais Natan Furtado, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brazil

Structural changes in the spleen have been reported in several infectious diseases. In visceral leishmaniasis (VL), a severe parasitic disease caused by *Leishmania* spp., the loss of white pulp accompanies a severe clinical presentation. Hamster model reproduces aspects of human VL progression. In the early stages, a transcriptomic signature of leukocyte recruitment was associated with white pulp hyperplasia. Subsequently, impaired leukocyte chemotaxis with loss of T lymphocytes in the periarteriolar lymphoid sheath occurred. This differential gene expression was subsequently corroborated by transcriptomic profiling of spleens in severe human VL. At the latest stage, spleen disorganization was associated with increasing clinical signs of VL. White pulp disruption was accompanied by decreased *DLK1* expression. The expression of *CXCL13*, *CCR5*, *CCL19*, *CCR6*, *CCR7* and *LTA* decreased, likely regulated by *CDKN2A* overexpression. Our findings enlighten a pathway implying cell cycle arrest and decreased gene expression involved in spleen organization.

Keywords: visceral leishmaniasis, white pulp remodeling, spleen disorganization, transcriptomic (RNA-Seq), spleen pathology, hamster

INTRODUCTION

The spleen plays a central role in the pathogenesis of visceral leishmaniasis (VL), a severe parasitic disease caused by *Leishmania infantum* or *Leishmania donovani* (1–4). In VL, infection in the spleen is persistent. This organ presents important sequential morphological changes that parallel the general clinical state of disease progression (5–7). The lymphoid follicles located in splenic white pulp (WP) respond to *Leishmania* infection by forming the germinal center and increasing B cell differentiation. This hyperplasia in the WP is accompanied by increasing numbers of *Leishmania*-infected

macrophages, which leads to splenomegaly and increased parasite burden in later stages of disease (8). The enlargement of the spleen exacerbates its function of blood cell recycling, contributing to pancytopenia (9, 10). As the disease progresses, cell populations become substantially altered in the white and red pulp (RP). Lymphoid follicles decrease in size and the boundaries between the germinal center mantle area and marginal zone become less evident, eventually disappearing (6, 11–13).

Disruption in splenic microarchitecture has been reported in a variety of diseases, such as leishmaniasis and malaria, as well as many viral diseases, including HIV and COVID-19 (14–17). However, the mechanisms underlying these changes have yet to be elucidated. The splenic architecture is chemically maintained by a complex network of transcripts. In *Leishmania*-infected dogs with disorganized spleens, decreased *CXCL13* expression has been associated with a loss of follicular dendritic cells and decreased numbers of B cells in lymphoid follicles (18). Concomitantly, the accumulation of plasma cells in the RP may result from interference in B cell differentiation pathways in the spleen (13). Moreover, the overexpression of *CXCL12*, *BAFF* and *APRIL* in splenic RP supports the hypothesis of anomalous homing and increased plasma cell life span (13). In the periarteriolar lymphoid sheath (PALS), T cell apoptosis driven by cellular exhaustion markers, such as CTLA-4, may lead to decreased numbers of CD4+ T lymphocytes, which has been associated with WP disorganization (18–20).

Hamsters are known to develop a progressive form of VL that can be fatal, recapitulating many aspects of the disease observed in susceptible dogs and humans (21, 22). In addition to being associated with a mixed Th1 and Th2 response profile, susceptibility has also been linked to a failure to express the gene coding for nitric oxide synthase (*iNOS*), even in response to IFN- γ , which implies the inability of macrophages to control replication of intracellular parasites (23, 24). Although experimental infection in hamsters represents a suitable model for the study of lesions associated with severe forms of VL, the analysis of pathways involved in lesion development has been limited by a lack of compatible reagents. However, recent gene expression studies have substantially contributed to our understanding of mechanisms involved in immune response to VL (25, 26).

The present study demonstrates that *L. infantum* infection leads to disorganization of the spleen compartments in hamsters with severe clinical presentations of VL. We employ large-scale gene expression analysis to identify transcripts potentially involved in WP disruption. We propose that the histological changes seen during the course of infection correlated with the transcriptional differential gene expression and tissue distribution of T lymphocyte marker and DLK1 protein. We then corroborate our findings from experiments performed in hamsters using splenic transcriptomic profiles of severe human forms of VL.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement

All experimental procedures were approved by the Institutional Review Board of the Gonçalo Moniz Institute (IGM-FIOCRUZ,

license nos. 004/2013 and 017/2015 for experiments performed in hamsters, and 3.491.092 for humans), and were carried out in accordance with Brazilian legislation on ethical animal experimentation. All patients were informed and consented to participate in the study.

Hamsters and Infection Procedures

Golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) were obtained from a FIOCRUZ animal care facility. Male hamsters, 6–8 weeks old, weighing 114 ± 20.2 g, were kept in cages under a controlled physiological light and temperature conditions. Each hamster was individually identified by a subcutaneous chip that was recognized by compatible reader (Microchip Partners). Injections were performed by intraperitoneal route in 1 mL of either saline solution (control group) or a parasite suspension (infected group) containing 10^7 promastigotes of *L. infantum* (strain MHOM/BR2000/Merivaldo2). *L. infantum* virulence was maintained through passages in hamsters, and parasites were grown until reaching stationary phase *in vitro* in Schneider's complete medium (Schneider + 20% fetal bovine serum [FBS], Gibco, USA) in a B.O.D. incubator at 24°C. Hamsters were euthanized by anesthetic overdose (10 mg cetamin + 1 mg xylazine/mL) at 30, 60, 120 and 150 days post-injection (dpi). Animal spleens were collected, weighed, and fragmented into three pieces for histopathological analysis, parasite culturing and RNA extraction. For parasite detection, macerated spleen fragment was sown in biphasic culture medium (blood agar + complete Schneider medium) in a B.O.D. incubator at 24°C and examined for up to 4 weeks.

Clinical Signs, Serum Biochemistry and Hematology

Clinical signs of VL (presence of skin lesions, hair and weight loss, splenomegaly) were examined on a weekly basis. At the day of euthanasia, blood was collected by heart puncture. Blood was preserved in EDTA blood collection tubes and submitted to analysis of total red blood cell (RBC) counts and total and differential white blood cell (WBC) counts using an automated cell counter. For biochemical analysis, the blood was collected in serum collection tubes and centrifuged at 2,000 xg for 15 minutes at room temperature and serum was submitted to biochemical analysis of total serum protein, albumin and globulin fractions.

Human Spleens

Human spleen samples were obtained from the Natan Portella Tropical Disease Institute (Teresina, Piauí, Brazil) following therapeutic splenectomy in patients with severe VL, two of whom were also coinfecting with HIV. Both coinfecting VL-HIV patients had undetectable viral load. Splenic material from two males and one female, median age of 51 [range: 45 – 55] years, were included in the study. Spleen fragments were submitted to histopathological analysis and RNA extraction.

Histopathology and Morphometry

Spleen was collected during necropsy and fixed in an alcoholic acid formalin solution for 24–48h at room temperature. Tissues were paraffin-embedded prior to 3–4 mm sectioning and stained

in hematoxylin & eosin. All tissue specimens were examined by two pathologists (WLCdS and LARF) on a group-blinded basis to estimate the intensity of inflammatory infiltrate, fibrosis and cell degeneration, as previously described (27). Architectural organization was assessed in the spleen samples according to Hermida et al. (3). In brief, well-organized or type 1 spleen was considered when WP microenvironments were easily distinguished in lymphoid follicles, the germinal center, PALS, mantle zone and marginal zone; slightly disorganized or type 2, corresponded to the loss of some boundaries between the WP microenvironments due atrophic or hyperplastic alterations; extensively disorganized, or type 3, was considered when boundaries were poorly delimited between WP and RP regions, and lymphoid follicle atrophy was observed (3, 6). Morphometric evaluations were performed to estimate WP/RP ratios using ImagePro Plus (Media Cybernetics).

Immunohistochemistry and Morphometry

Spleen fragments were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin; 4 μ m-thick sections were obtained and mounted on silanized slides. The slides were then deparaffinized and rehydrated. For CD3 staining, the slides were immersed in a 10% ammonium hydroxide solution for 10 minutes to remove formaldehyde pigment, 3% hydrogen peroxide for 10 minutes to block endogenous peroxidase and in Tris-EDTA pH 9.0 for 30 minutes at 96°C to perform antigenic recovery. Slides were then cooled to room temperature for 20 minutes, and nonspecific staining was subsequently blocked by 5% bovine serum albumin for 20 minutes. For DLK1 staining, the slides were incubated with 20% ammonium hydroxide in 95% alcohol for 20 minutes, washed in running tap water, followed by washing in distilled water. Antigen recovery was performed by heating (115°C) in citrate buffer (pH 6.0) for 20 minutes. Endogenous peroxidase was blocked with 3% hydrogen peroxide in 3 incubations of 10 minutes, followed by washing with distilled water. Unspecific staining blocking was performed with horse serum (species of the secondary antibody) (Vector, 30022) for 15 minutes and washed in PBS, followed by permeabilization in PBS with 0.1% saponin for 5 minutes in 2 incubations. Afterwards, samples were incubated overnight with either anti-CD3 (1:300, ab16669, Abcam), rabbit anti-DLK1 (1:1000, ab21682, Abcam) or anti-CD20 (1:200, ab64088) primary antibodies, followed by incubation with the secondary antibody conjugated HRP (ab205718, Abcam) for 30 minutes for CD3 and CD20 staining, or anti-rabbit IgG polymer (Vector, 30026) for DLK1 staining. Staining was developed using a 0.02% 3,3'-diaminobenzidine solution for 5 minutes, followed by nuclei counterstaining in Harris hematoxylin (Sigma). Spleen sections for CD3 staining were scanned at 200x magnification using an Olympus VS110 virtual slide scanning system (Olympus America Inc, United States). CD3 measurements were estimated in the five largest WP regions in seven cases per group, without overlapping areas. The boundaries of WP and PALS were established according to previously described morphological criteria (28, 29), and confirmed by staining for CD20 to visualize lymphoid follicles in WP. Images of the three hotspot areas of DLK1 staining were obtained at 400x magnification using Olympus BX53 camera in Image-Pro Plus software (V. 4.5, Media Cybernetics) and

cell density was estimated. The same spleen specimens submitted to transcriptome analysis were used for DLK1 immunohistochemistry. Unfortunately, the specimens of 30 dpi timepoint, had a strong background that impaired the morphometric estimation. All measurements were morphometrically estimated using ImageJ software version 1.52 (National Institutes of Health, United States) following the delimitation of each respective region of interest. Additionally, the total area of CD3 staining was estimated in each compartment. DLK1 staining morphometry was estimated by two observers and the mean between the measures was represented. The means of cell density were used for statistical analysis.

RNA Isolations

Spleen fragments collected from hamster dissection and biopsied humans were stored at -80°C and dissociated in Trizol (Invitrogen). Total RNA isolation was performed using the aqueous phase of Trizol mixture followed by purification using RNeasy extraction kit (Qiagen, Inc.) according to the manufacturer's protocol, including an extra step of DNA lysis through the addition of DNase. Total RNA purity was determined by NanoDrop spectrophotometer (ThermoFischer) and the concentration of the material was measured in Qubit fluorimeter (Invitrogen). Total RNA integrity was evaluated on an automatized electrophoresis Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent) with RNA 6000 Nano kit (Agilent). Samples were considered of high quality when RNA integrity number (RIN)>7.

Hamster Spleen Transcriptomics

Large-scale expression data was obtained to identify the transcriptional response, including differentially expressed genes, between infected and non-infected animals in different time-points (30, 60, 120 and 150 days). Additionally, *L. infantum* RNA counts were also assessed. Once a total RNA was obtained that met the purity, concentration and integrity criteria, a contaminant depletion step (globins and ribosomal RNAs) was applied and the resulting sample was converted into cDNA and subjected to NextSeq platform (Illumina, Inc), according to the manufacturer's protocol. An average of 30,000,000 readings per sample was expected. The sequencing was performed using paired-end strategy with fragment library of size 2x75 bases using stranded protocol. Transcriptomic profiles from the experimental VL samples were obtained using three biological replicas for each group (control and infected) at each of the four timepoints studied. The sample selection for transcriptomic analysis was based on the disruption of the splenic WP throughout the follow-up of the infection. The quality of reads was assessed by FastQC (v0.10.1) in each sample, followed by summarization of the reports using MultiQC (30). Golden hamster (Genome ID 11998) or *Leishmania infantum* (Genome ID 249) reference genomes were obtained from the NCBI Genome database and then aligned using STAR (31). The number of reads per transcript were calculated by FeatureCounts. Gene annotation was performed and differential expression (DE) was determined using data from the GEO repository (NCBI). Differential expression analysis was conducted using edgeR (32). Wald's test was performed using DESeq2 (25). Functional analysis was carried out using IngenuityPathway Analysis (IPA) software (Qiagen, Inc.) considering a cut-off log fold change

(FC) value of 2, false discovery rate (FDR) <0.05 and absolute z score of ≥ 2 (26). Unsupervised analysis was employed at each timepoint for the evaluation of canonical pathways and enrichment of diseases and functions (Tables S1, S2). Enrichment analysis of differentially expressed genes was performed overlapping networks for each timepoint. To investigate transcripts associated with spleen morphology and WP organization, a supervised analysis was performed with the addition of a panel of transcripts, followed by an unsupervised network expansion to evaluate interaction pathways related to splenic organization.

Human Spleen Transcriptomics

Gene expression was assayed using nCounter platform (NanoString Technologies, Seattle, Washington), based on direct molecular bar codes coupled to target RNA transcripts using digital detection at the Genomics Core Leuven (VIB/KULeuven - Belgium). Two probes were employed, one that captures the mRNA of interest for the complementary sequence, while the other is connected to a fluorescent barcode that identifies the target by specific hybridization. The probes are mixed with the genetic material and transcripts of interest are identified by fluorescent barcodes. Samples from healthy spleen tissue were reanalyzed and obtained from the GTEx project (33), which performed whole-transcriptome profiling of multiple human tissues, including spleen. Three samples were included for this analysis, and raw reads from whole-transcriptome profiling were obtained from the SRA selector at <http://trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/study/?acc=phs000424>. These samples were chosen based on their age and gender profile similarity with our infected tissue human donors. Gene annotation was performed using the biomaRt library for R (34). Mapping of the raw reads against the human genome reference (GRCh38) was performed using STAR (31) at default parameters, and HT-seq count was used to assign and count mapped reads to annotated genomic features (35) using GENCODE v. 25 annotations. Nanostring expression was quantified by counting the amount of mRNA identified in a single reaction. The present study constructed a panel consisting of 9 genes for human analysis (Table S3). Raw data were preprocessed using nSolver 2.0 software (NanoString Technologies).

Statistical Analysis

The statistical analysis of transcriptomic data was performed as described above. Absolute numbers, means, medians and percentages are indicated in the text, tables and graphs. Comparisons between control and infected groups were performed using the t test or Mann-Whitney test as indicated. To perform comparisons between control and infected groups at each time point, ANOVA was used in combination with multiple comparisons by the Kruskal-Wallis test. Statistical significance was considered when $p < 0.05$.

RESULTS

Clinical Evaluation

The general characteristics of the animals are presented in Table 1. All infected animals presented positive spleen culture

throughout all time points, and RNA copies aligned to *Leishmania infantum* presented an increasing trend over time of infection. Clinical signs of disease were present after 120 dpi in two animals (one had a crust on the snout, and another presented an ulcer in the oral region) and more intense in two animals at 150 dpi (one had cachexia, irregular breathing, dehydration, an ulcer in the oral region and pleural effusion; another was emaciated and presented an ulcer in the oral region). Statistically significant differences in clinical presentation were observed between the groups at 150 dpi (Table 1).

While weight was consistently lower in infected animals compared to controls, significant differences were only seen at 30 and 150 dpi. Despite an absence of statistical significance, differences were detected at 150 dpi in hematological parameters, with decreasing trends observed in average red blood cells (RBC) counts, hemoglobin, hematocrit, RBC mean corpuscular volume (MCV) and white blood cell (WBC) counts in the infected animals. Upon necropsy, splenomegaly was observed at 120 and 150 dpi (Table 2).

Histological Evaluation of Spleen

Chronic perisplenitis was observed in 4/7 infected animals at 150 dpi (Table 2). Smaller proportion of WP were seen in the *L. infantum*-infected animals compared to controls after 60 dpi, with statistically significant differences observed between the groups at 120 dpi. At 150 dpi, despite a persistent trend towards decreased WP size in the *L. infantum*-infected group, controls also presented less WP, possibly due to aging (Table 2). The disruption of WP architecture was observed in 10 *L. infantum*-infected hamsters, considered slight (Type 2) in 5/7 (71.4%) animals at 120 dpi and in 3/7 (42.8%) animals at 150 dpi, and intense (type 3) in 2/7 (28.6%) hamsters at 150 dpi (Mann-Whitney test, $p = 0.03$) (Table 2 and Figure 1). WP disruption was associated with germinal center atrophy in 3/7 (43%) infected hamsters at 150 dpi (Table 2).

Exclusively in infected hamsters, small granulomas were found at discrete (2/7, 29%) or moderate (2/7, 29%) intensity at 120 and 150 dpi in both WP and RP (Table 2).

Transcriptomic Splenic Profiles

Based on the classification of WP organization, spleen tissues from uninfected ($n = 12$) and infected ($n = 12$) hamsters were submitted to RNA-seq analysis. Overall, the transcriptomic profile revealed an increase in differentially expressed (DE) transcripts during the course of infection (Figure S1A): 1040 (30 dpi); 1813 (60 dpi); 5874 (120 dpi) and 6512 (150 dpi). Principal component analysis pictures differential distributions in accordance with infection status and duration (Figure S1B). The distribution of groups along PC2 reflects some degree of splenic disorganization, while organized spleens are distributed along PC1 (Figure S1B). To investigate the functional effects of smaller groups of genes, an adjusted false discovery ratio (FDR) <0.05 and fold change (FC) of 2 were used to generate consistently expressed interaction networks at each time point. Under these parameters, only two transcripts were included in the analysis at 30 dpi, reflecting a lack of significant alterations in the histology of the spleen and the absence of clinical

TABLE 1 | Evidence of infection, clinical and laboratorial data from hamsters experimentally infected with *L. infantum*.

N	DAYS POST-INFECTION							
	30		60		120		150	
	CT 7	INF 7	CT 7	INF 7	CT 7	INF 7	CT 7	INF 7
Evidence of infection:								
Spleen culture	0/7 (0%)	7/7 (100%)	0/7 (0%)	7/7 (100%)	0/7 (0%)	7/7 (100%)	0/7 (0%)	7/7 (100%)
Parasite RNA counts	76 [73–80]	53 [49–5180]	83 [50–112]	4162 [364–37669]	99 [75–145]	1046 [483–4845]	110 [99–119]	11509 [4766–403131]
Clinical signs of disease:								
Present	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	2/7 (29%)	0/7 (0%)	2/7 (29%)
Number of signs*	0 [0–0]	0 [0–0]	0 [0–0]	0 [0–0]	0 [0–0]	0 [0–1]	0 [0–0]	4 [2–4] ^a
Body weight (A)	8.6 ± 2.2	0.3 ± 6 ^b	29.9 ± 11.1	20.9 ± 5.3	41.2 ± 12.1	25.9 ± 12.7	38.8 ± 12.4	0.7 ± 22.2 ^b
Laboratory parameters:								
RBC	8.2 × 10 ⁵ ± 3.5 × 10 ⁵	8.4 × 10 ⁵ ± 4.5 × 10 ⁵	8.3 × 10 ⁵ ± 3.6 × 10 ⁵	8.3 × 10 ⁵ ± 1.9 × 10 ⁵	8.1 × 10 ⁵ ± 5.6 × 10 ⁵	8.6 × 10 ⁵ ± 6 × 10 ⁵	7.8 × 10 ⁵ ± 5.2 × 10 ⁵	6.9 × 10 ⁵ ± 9.5 × 10 ⁵
Hemoglobin	14.7 ± 0.6	15.5 ± 0.4	15.3 ± 0.5	15.4 ± 0.6	13.9 ± 1.8	14.8 ± 1.3	13.6 ± 0.7	11.7 ± 1.7
Hematocrit	44.2 ± 2	45.8 ± 1.6	45 ± 2.1	44.3 ± 1.3	44.8 ± 3.4	44.8 ± 3.4	41.5 ± 2.6	35 ± 5.5
MCV	54.2 ± 0.4	54.8 ± 1.4	53.8 ± 0.8	53.8 ± 0.7	55 ± 1.8	54.2 ± 0.4	53.5 ± 2.4	51 ± 1.7
Platelets	7.4 × 10 ⁵ ± 7.8 × 10 ⁴	6.7 × 10 ⁵ ± 6.2 × 10 ⁴	6.1 × 10 ⁵ ± 5.1 × 10 ⁴	6.8 × 10 ⁵ ± 6.3 × 10 ⁴	9.6 × 10 ⁵ ± 1 × 10 ⁵	5.5 × 10 ⁵ ± 2.1 × 10 ^{5c}	3.8 × 10 ⁵ ± 6.7 × 10 ⁴	4 × 10 ⁵ ± 2.3 × 10 ⁵
WBC	2120 ± 739.6	1600 ± 367.4	3260 ± 427.8	2600 ± 784.9	3367 ± 1145	3457 ± 1261	4040 ± 945	1300 ± 519.6
Eosinophils	45.4 ± 49.8	60 ± 16.7	51 ± 15.6	45.3 ± 17.8	41.8 ± 13.4	41.8 ± 13.4	49.8 ± 26.2	13 ± 5.1
Neutrophils	972.2 ± 343.4	711.8 ± 156.6	1414 ± 251.4	1104 ± 359.3	1366 ± 474.1	1429 ± 564.3	1482 ± 383.3	475 ± 164.8
Lymphocytes	1069 ± 353.6	791.8 ± 214.7	1740 ± 231.5	1406 ± 432.8	1926 ± 649.4	1937 ± 668.2	2148 ± 567.8	799 ± 344.8
Monocytes	33 ± 11.8	33.2 ± 15.6	76.4 ± 26.4	44.8 ± 15	33.6 ± 11.4	50 ± 31.4	80.2 ± 35.2	13 ± 5.1
Total serum proteins	6.7 ± 0.5	6.8 ± 1	4.6 ± 1	4.5 ± 0.9	8.1 ± 0.6	8.4 ± 0.7	6.3 ± 0.9	6.8 ± 1.5
Albumin	3 ± 0.4	2.7 ± 0.4	1.9 ± 0.1	1.8 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.2 ± 0.3	3.4 ± 0.2	3.4 ± 0.6
Globulin	3.7 ± 0.3	4 ± 0.9	2.7 ± 0.8	2.6 ± 0.6	4 ± 0.5	4.2 ± 0.5	2.8 ± 0.8	3.3 ± 0.9
Albumin/globulin	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.09	1 ± 0.1	1 ± 0.1	1.2 ± 0.3	1 ± 0.2

Data presented as means ± standard deviation. CT, Control; INF, Infected; RBC, red blood cells; MCV, mean corpuscular volume; WBC, white blood cells. *Median and interquartile range of the number of clinical signs of VL (fevers, anorexia, cachexia, irregular breathing, dehydration, pleural effusion). A, difference between initial weight (prior to infection) and final weight (day of euthanasia). Statistical differences: ^acontrol and infected group at 150 dpi, Kruskal-Wallis test (p,0.03), ^bcontrol and infected groups at 30 dpi (p,0.01) and 150 dpi (p,0.004), Mann Whitney test. ^ccontrol and infected group at 120 dpi, t test (p,0.001).

presentation at 30 dpi. However, at all remaining time points, higher numbers of transcripts were included making it feasible to build interaction networks. At 60 dpi, a set of overexpressed genes were predicted as regulator effectors for the functions of leukocyte trafficking and inflammatory process (Figure 2A). At this timepoint, genes related to granulocyte recruitment were also found to be overexpressed. At 120 dpi, the granulocyte recruitment remained activated, with a greater number of genes included (Figure 2B). At this time point the quantity of ion metal became altered, primarily stimulated by *SPP1*, *CCL5*, *IFN γ* , *LEP* and *CXCL10*. This effect was enriched to the last time point (150 dpi), revealing an increased number of associated transcripts (Figure 2C). Systemic alterations as in hemorrhagic disease and behavior were predicted in response to the set of transcripts expressed at this stage of the infection. Part of the differential expression of transcripts involved in the functional analysis was shared between time points 60 and 120 dpi (Figure 2D) and between 120 and 150 dpi (Figure 2E), reflecting a kinetics in the molecular signature.

Transcriptomic Kinetics Processes

Given the importance of analyzing biological processes along the course of infection, we overlapped transcripts identified as differentially expressed onto enriched networks to elucidate key

processes (Figure 3). At 30 dpi, as only two differentially expressed transcripts were identified after the functional analysis (FDR < 0.05, FC of 2), only Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1 – *DLK1* was observed to be differentially expressed in common with the remaining timepoints. At 30 dpi, *DLK1* was observed to be upregulated (Figure 3A, 30 dpi). This expression pattern was reversed at 150 dpi (the latest stage of infection), when the downregulation of *DLK1* occurred (Figure 3A, 150 dpi). We performed an antibody-based validation of this transcript of *DLK1* in the splenic tissue at 60, 120 and 150 dpi (Figure 3B). Cells expressing *DLK1* were distributed around perivascular area. The density of *DLK1*-expressing cells decreased at each timepoint (p = 0.0002), correlating with the decreasing expression of *DLK1* mRNA found in the transcriptomic analysis (Figure 3C) of the spleen of *Leishmania*-infected hamsters. With regard to gene expression analysis by overlapping along infection, transcripts deemed relevant to VL, such as *ARG1* and *IDO1*, exhibited high expression at 60, 120 and 150 dpi (Figure 3D).

T Lymphocytes and Spleen Disorganization

Splenic T lymphocytes identified by CD3 staining were found on decreasing trend in area percentages of PALS in infected hamsters from 60 dpi (Figures 4A, B). Strikingly, when we

TABLE 2 | Morphological changes in the spleens of hamsters experimentally infected with *L. infantum*.

N	DAYS POST-INFECTION							
	30		60		120		150	
	CT 7	INF 7	CT 6	INF 7	CT 7	INF 7	CT 7	INF 7
Spleen weight (g) ^a	0.2 ± 0.05	0.1 ± 0.04	0.2 ± 0.07	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.05	0.5 ± 0.09 ^f	0.2 ± 0.03	0.5 ± 0.2 ^f
Perisplenitis	0/4 (0%)	0/7 (0%)	0/6 (0%)	1/7 (14%)	0/6 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	4/7 (57%) ^d
White pulp:								
Relative size ^a	22 ± 4.7	22 ± 8.5	19 ± 4.9	17.4 ± 4.1	22 ± 8.5	11.4 ± 3.8 ^a	12.7 ± 4.2	9.2 ± 4.4
Disruption:								
None	4/4 (100%)	7/7 (100%)	6/6 (100%)	7/7 (100%)	5/6 (86%)	2/7 (29%)	6/7 (86%)	2/7 (29%)
Present	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/6 (0%)	5/7 (71%)	1/7 (14%)	3/7 (43%)
Intense	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	1/6 (14%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	2/7 (29%)
Lymphoid follicles:								
Normal	4/4 (100%)	4/7 (57%)	1/6 (17%)	4/7 (57%)	3/6 (50%)	3/7 (43%)	4/7 (57%)	1/7 (14%)
Hyperplastic	0/4 (0%)	2/7 (29%)	2/6 (33%)	2/7 (29%)	1/6 (17%)	3/7 (43%)	0/7 (0%)	2/7 (29%)
Atrophic	0/4 (0%)	1/7 (14%)	3/6 (50%)	1/7 (14%)	2/6 (33%)	1/7 (14%)	3/7 (43%)	4/7 (57%)
Size score ^b	0 [0 - 0]	0 [0 - 1]	-0.5 [-1 - -1.2]	0 [-0.2 - -1.2]	0 [-1 - -0.2]	0 [0 - 1]	0 [-1 - 0]	-1 [-1 - 1]
Germinal center:								
Normal	4/4 (100%)	5/7 (71%)	1/6 (17%)	2/6 (33%)	4/6 (67%)	5/7 (71%)	6/7 (86%)	2/7 (29%)
Hyperplastic	0/4 (0%)	2/7 (29%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	2/6 (33%)	2/7 (29%)	1/7 (14%)	1/7 (14%)
Atrophic	0/4 (0%)	0/7 (0%)	1/6 (17%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	3/7 (43%)
Size score ^b	0 [0 - 0]	0 [0 - 2]	1 [-0.2 - 1]	1 [0 - 1]	0 [0 - 1]	0 [0 - 1]	0 [0 - 0]	0 [-3 - 1]
Granuloma:								
Presence	0/4 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	4/7 (57%)	0/6 (0%)	7/7 (100%)	0/7 (0%)	7/7 (100%)
Intensity score ^b	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	1 [0 - 2]	0 [0 - 0]	2 [2 - 3] ^g	0 [0 - 0]	3 [2 - 3] ^g

CT, Control; INF, Infected. Data presented as absolute and relative frequencies. ^amean ± standard deviation. ^bmedian and 1st and 3rd quartiles. Statistical differences: ^ccontrol and infected hamsters at 120 and 150 dpi ($p < 0.0001$), ANOVA test. ^dcontrol and infected groups at 150 dpi ($p = 0.003$), ANOVA test. ^econtrol and infected groups at 120 dpi ($p = 0.02$), Kruskal-Wallis test. ^fcontrol and infected groups ($p = 0.006$), Kruskal-Wallis test. ^gcontrol and infected groups at 120 dpi ($p = 0.0002$) and 150 dpi ($p = 0.0009$), Kruskal-Wallis test.

performed an unsupervised enrichment of biological processes, chemotaxis of T lymphocytes emerged with the highest score in the dataset and consistently presented a pattern of differential expression over the course of infection (Figure 4C). The upregulation of the T lymphocyte chemotaxis pathway observed at 60 dpi decreased to the next timepoint (120 dpi), concomitant with decreases in PALS and WP areas. Impaired T lymphocyte chemotaxis persisted until 150 dpi and in association with statistically significant lower PALS area, indicating a potential transcriptomic mechanism linked to profound WP disorganization at later stages of disease. Genes associated with T lymphocyte chemotaxis included *SPPI1*, *IL-21*, *CXCL9*, *IFN- γ* , *CXCL11*, *CCL5*, *CCL24* and *CXCL10*, which exhibited upregulation, as well as *CCL21* and *IL12B* which appeared downregulated (Figure 4D). Except for *CCL17* and *CCL21* that were not included in the nCounter target panel, all the transcripts involved in T lymphocyte chemotaxis were validated in the splenic transcriptome in human VL, of which included two organized (type 1) and one disorganized spleen (Type 3) (Figure 4D). Relevant correlations between tissue expression of CD3 and transcripts of the genes in the T lymphocyte chemotaxis pathway were observed, indicating a genetic regulation of splenic organization (Figure 4E).

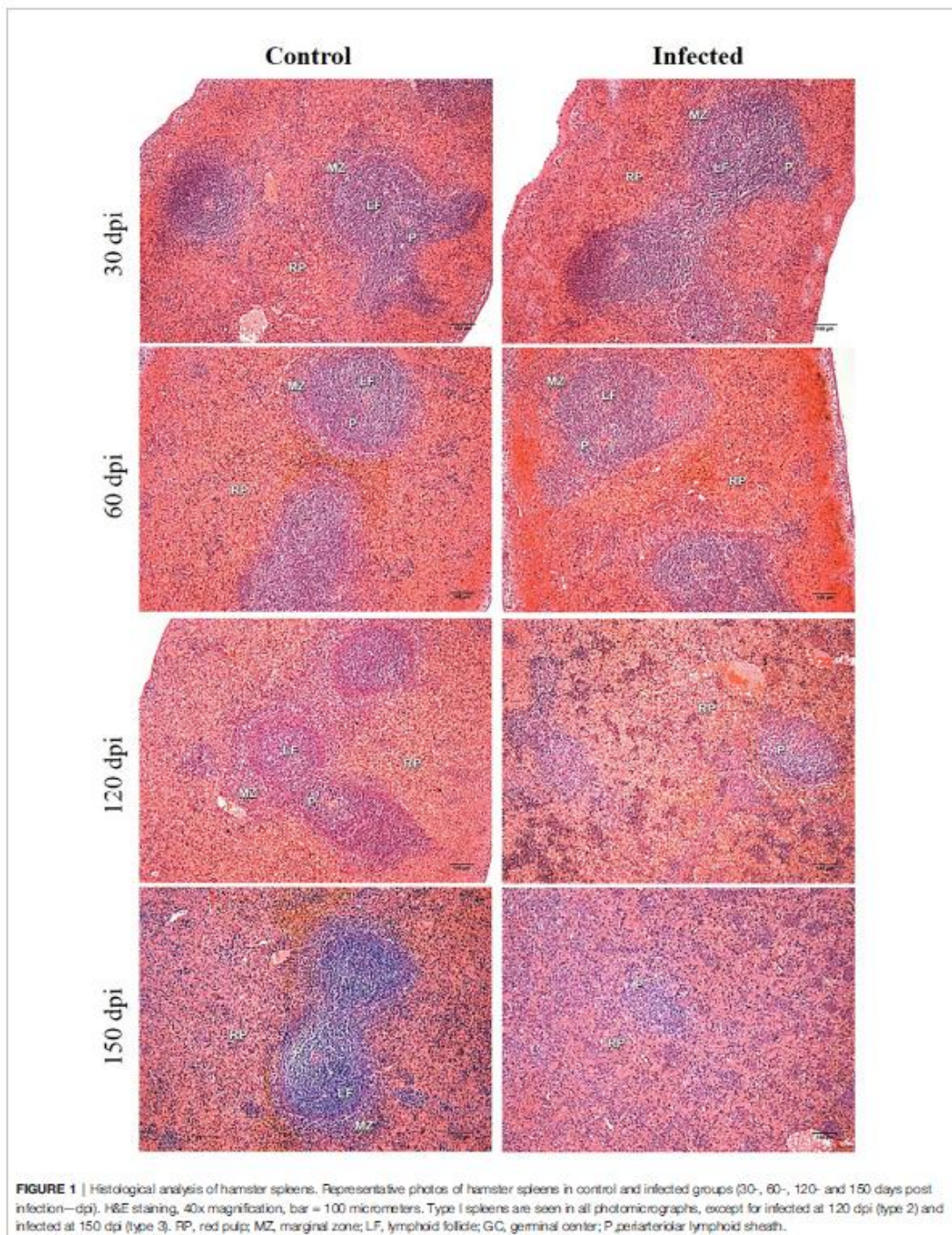
Cell Cycle Arrest and Spleen Disorganization

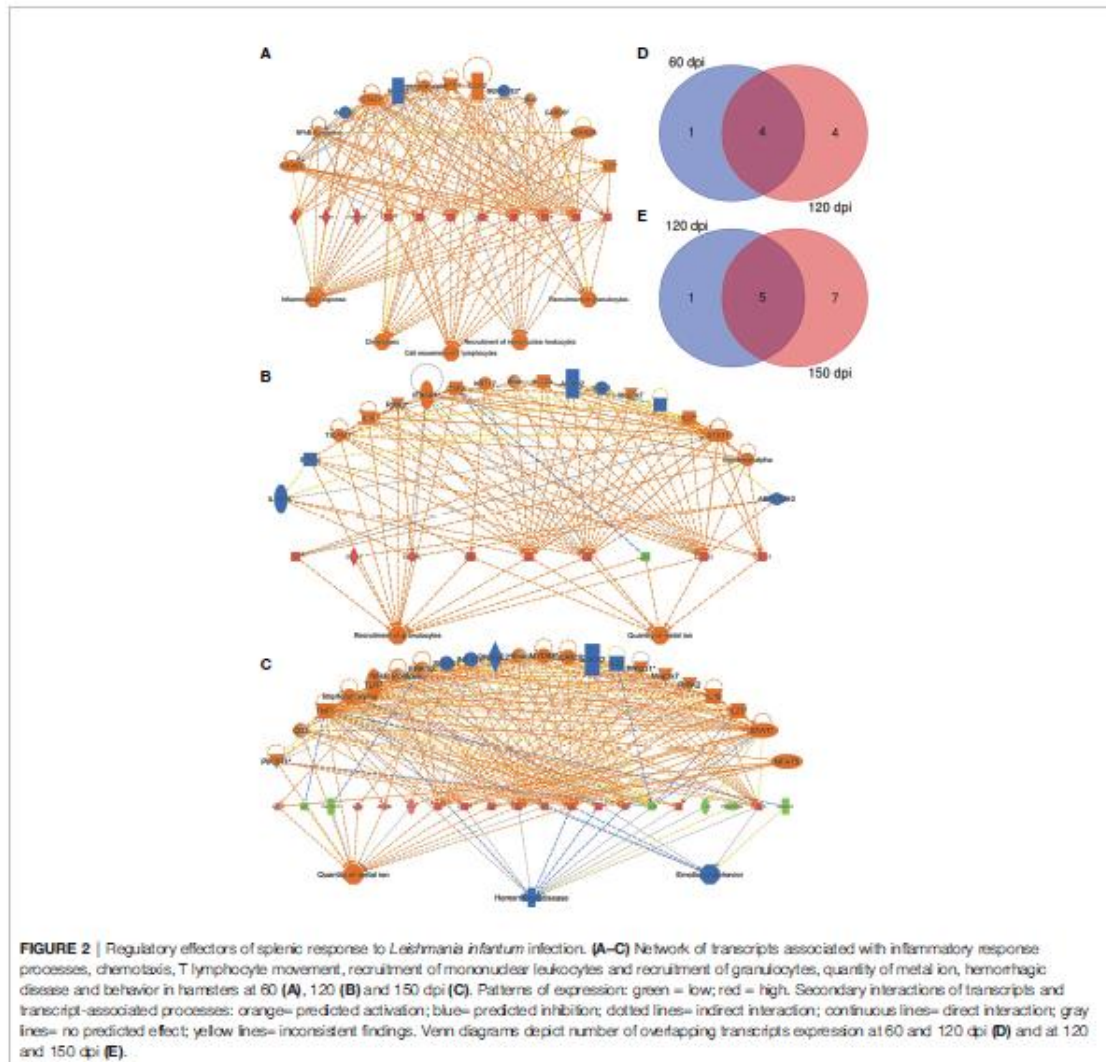
In light of concurrent findings regarding impaired leukocyte recruitment and the histological disruption of spleen microenvironments, we then investigated expression patterns

among the following set of genes known to participate in spleen compartment organization: *CXCL13*, *CXCR5*, *LTA*, *CCR7*, *CCR6*, *CCL19*, *CCL21*, *CXCL12* and *MKI67*. To evaluate transcripts associated with spleen morphology and WP organization, we employed unsupervised network expansion to evaluate interaction pathways related to the function of splenic organization. After enrichment with 20 unknown connecting transcripts, a network associated with the regulation of spleen organization was constructed. While *Cydin* dependent kinase inhibitor 2 A (*CDKN2A*) was found to be upregulated at 150 dpi (Figure 5A), *CXCL13*, *CCR5*, *CCL19*, *CCR6*, *CCR7* and *LTA* were downregulated, suggesting an inhibitory role played by *CDKN2A*. Interestingly, in our unsupervised analysis of canonical pathways, the consistent upregulation of *CDKN2A* indicated its involvement in the down-modulation of cell cycle regulation (Figure 5B).

DISCUSSION

The present work employed an experimental model of *L. infantum* infection in hamsters to evaluate sequential changes in spleen architecture during the course of VL. Hamsters are known to develop severe chronic disease, with similar clinicopathological changes that parallel those observed in human and canine VL. Here we show that these changes take place concurrently with the differential expression of regulatory transcripts that may interfere with leukocyte recruitment and could provoke cell cycle arrest. Our results suggest that *DLKI*



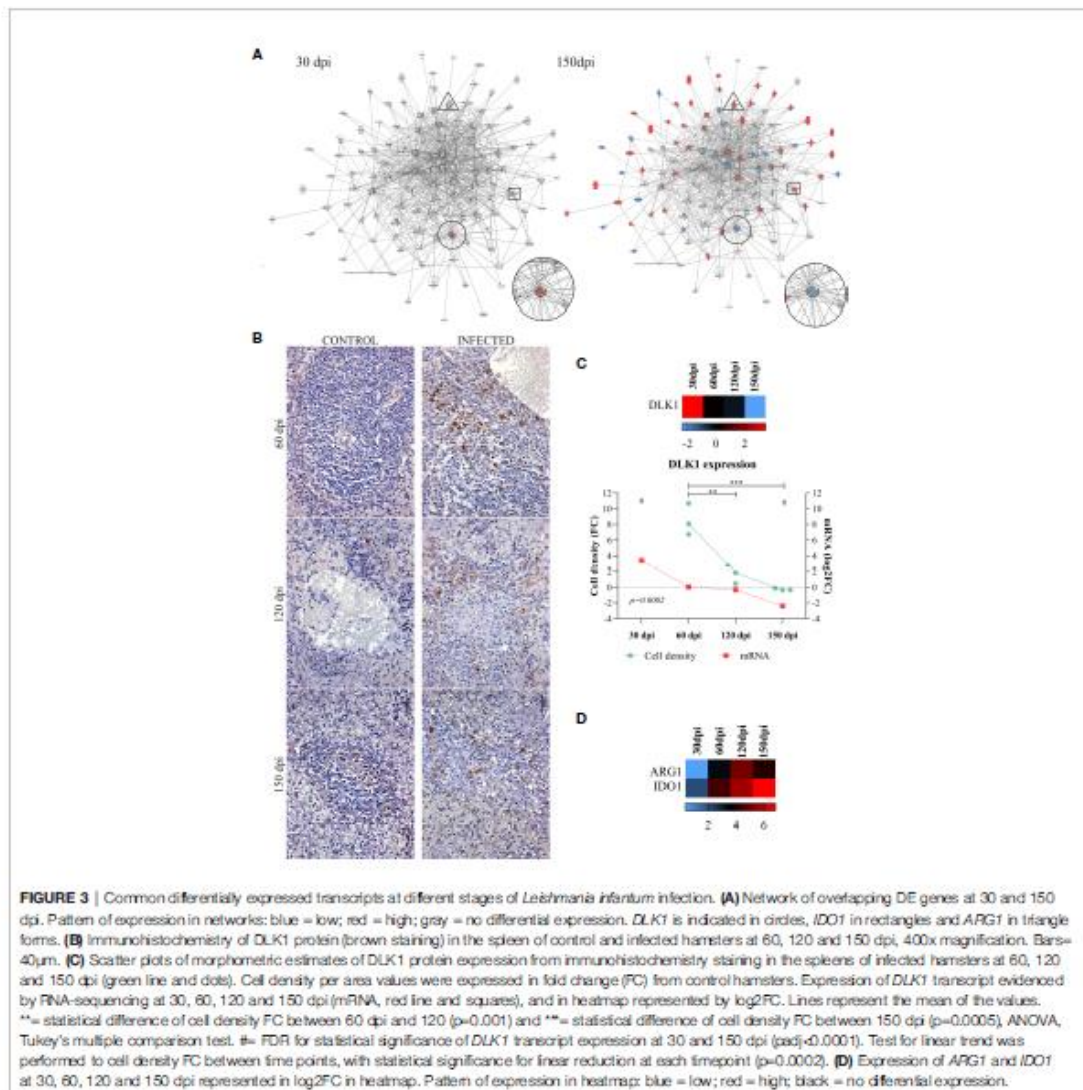


and *CDKN2A* could both play central roles in the spleen disorganization observed in severe forms of VL. The data presented herein together with that previously published in the literature expands the observations to a chronic phase of VL, from 30 dpi to 150 dpi and enlighten about the possible pathways leading ultimately to spleen disorganization (5, 13, 18–20, 27, 36–38).

Infection by *L. infantum* Induced Morphological Changes Leading to Spleen Disorganization in Hamsters

Several experimental animal models of infection have been used to study changes brought about by VL. In mice and hamsters,

Veress et al. (11) observed the hyperplasia of lymphoid follicles during the progression of disease (11). In BALB/c mice, substantial tissue remodeling and changes in cell populations were found following infection by *L. infantum* or *L. donovani* (22, 27, 36, 38–40). However, the marked changes of the WP observed by other authors at early stages of infection did not progress to WP disruption at later stages of infection in mice (22, 27, 36, 38–40). In contrast, hyperplasia followed by atrophy and white pulp disruption was observed at later timepoints in the present experimental model involving hamsters. Veress et al. (22) observed complete WP disruption at around 120 days of infection, accompanied by extensive RP replacement by amyloid deposition (22). Herein, intense WP disruption was observed

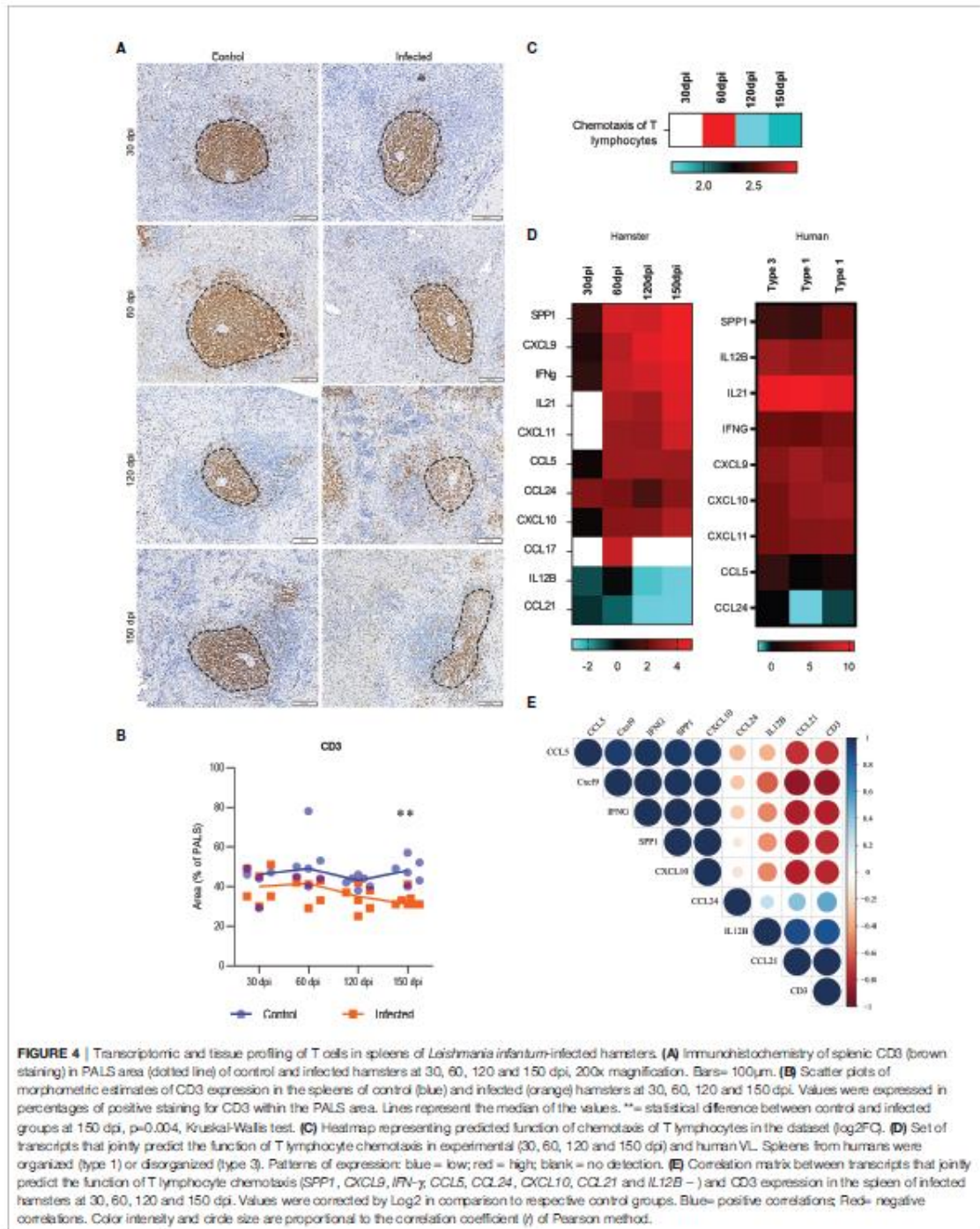


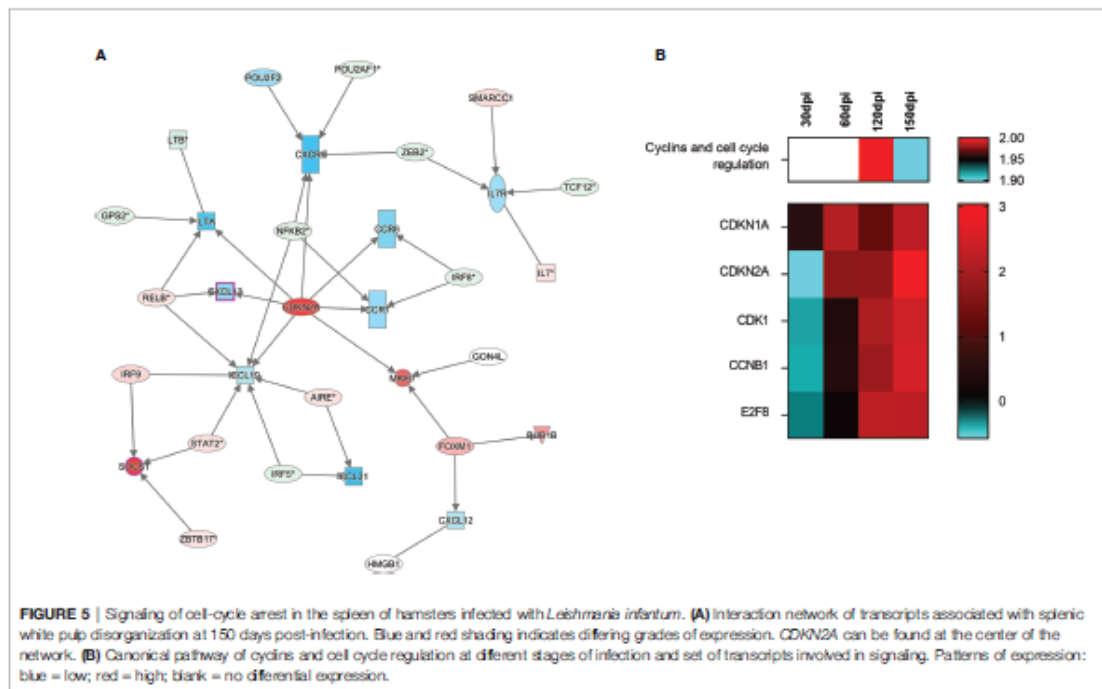
only at 150 dpi in the absence of amyloidosis. These differences may be associated with the *Leishmania* strain and inoculum size used in experimentation (38). Despite the sample size of seven animals per group, and the fact that hamster model is susceptible to severe forms of VL, not all the infected animals developed complete disruption of the WP during the time course of this study. In fact, in canine and human VL not all the individuals develop spleen disorganization, as reported by Veress et al. (22) and Santana et al. (6). Nevertheless, the *L. infantum* infection successfully induced splenic disorganization in 5 out of 7 animals at 120 dpi, and 3 out of 7 at 150 dpi. Further, 2 out of 7 animals

had extensive disruption of the WP at 150 dpi. Our data indicate more exacerbated clinical VL manifestations at later stages of disease, as evidenced by weight loss, splenomegaly and a greater frequency and intensity of clinical signs.

Transcript Expression Kinetics Uncovers *DLK1* Deregulation

The clinical and histological changes identified herein were found to be correlated with different transcriptomic signatures in accordance with the progression of infection. A normal resting spleen presents with balanced expression of genes involved in the





maintenance of splenic compartments. Following infection, at 30 dpi, *DLK1* was found to be significantly differentially expressed concomitant with the histological detection of lymphoid hyperplasia. Previous studies have shown important events, such as cell population losses or mobilization from the usual environment between 14 and 30 days after experimental infection in mice (8, 12, 36). Along the course of the present experimental infection model, we observed a progressive decrease in *DLK1* expression, with WP disruption taking place by 150 dpi. Immunohistochemical staining for *DLK1* corroborated the transcript expression and spleen disorganization. We chose an antibody-based validation for this finding, to reflect its biological relevance in the protein synthesis. As we show herein, cells expressing *DLK1* decreases in density in the spleen over the course of infection. The *DLK1* gene is a member of a family of growth factors that regulate cell differentiation, and is highly expressed by CD34+ hematopoietic cells (41). *DLK1* has also been implicated in the differentiation of several cell types regulated by the Notch gene family (42). The absence of *DLK1* expression in *DLK1*^{-/-} mice was shown to lead to decreased frequency of B cells in the lymphoid follicles, an increased presence of B cells in the MZ and greater IgG1 production (37). We therefore speculate that losses in follicular B cell populations, the accumulation of IgG-producing plasma cells in the RP and associated hypergammaglobulinemia previously reported by other authors may in fact be associated with alterations in *DLK1* expression as observed herein during the progression of infection (6, 13). Downregulation of *DLK1* was reported in mice infected with *L.*

donovani at 21 and 42 days of infection (26). Although no correlation with spleen remodeling was investigated, it was shown that morphological changes in the spleen of mice with VL take place as early as 14 dpi. However, the spleen disorganization seems not to progress at later time points of the infection (8, 12, 27, 39, 40). In sum, correlations between changes in *DLK1* expression and the remodeling of splenic microenvironments seem to suggest the participation of this transcript in the regulation of B cell differentiation, likely leading to WP disruption and possibly even the accumulation of plasma cells in the RP.

Splenic Transcriptomic Signatures Are Associated With Biological Functions of Leukocyte Trafficking and Granulocyte Recruitment

Transcriptomic processes involved in inflammatory response, leukocyte migration, granulocyte recruitment and lymphocyte chemotaxis were identified concomitantly with the detection of granulomas at 60 dpi. The establishment of infection at this stage could occur in response to the high expression of *IDO1* and *ARG1*. *IDO1* is induced by IFN γ and has been associated with the polarization of M2 macrophages in hamsters with VL (25). In *Leishmania* infection, *IDO1* also shows a function of suppressing innate immunity through regulatory stimulation of dendritic cells, and adaptive through the generation of regulatory T lymphocytes (43, 44). *ARG1* expression is induced in macrophages by *Leishmania*, which competes with iNOS for

arginine and produces nutrients that favor parasite survival, such as urea, as well as decreasing the production of parasitotoxic nitric oxide (45). Altogether, these observations provide evidence of an inflammatory process at 60 dpi, which likely induced the T lymphocyte chemotaxis observed in the transcriptome at this stage.

T lymphocyte chemotaxis is notably high between 30 and 60 dpi, and granulocytes recruitment is increased, associated with differential expression of the genes presented in the **Figures 2, 4**. Previous data from our group demonstrated that normal RP cellularity becomes replaced by high numbers of plasma cells in association with the elevated expression of *BAFF*, *APRIL* and *CXCL12* (3, 13). In fact, it is possible that granulocyte recruitment may be related to the presence of eosinophils in the splenic compartment, which could supply factors promoting the survival and maintenance of plasma cells at later times of infection (46).

A significant downmodulation in lymphocyte chemotaxis associated with the decreased expression of *IL12b* and *CCL21* was identified at 120 dpi, which correlated with the observation of moderate disorganization of splenic lymphoid tissue. Other authors previously reported a highly inflammatory environment in the spleen of hamsters infected by *L. donovani* (25). *IL12b* expression is associated with the polarization of a Th1 response against pathogens in the spleen, whereas *CCL21* expression is important for the retention of T lymphocytes in the periarteriolar zone of WP (29, 47). Alterations in the expression of these transcripts were correlated with decreasing tissue expression of CD3 in the PALS area, supporting a genetic regulation of splenic placement of T lymphocytes in the progression of the disease. Besides providing a validation of the alteration on splenic T lymphocytes found in the transcriptome at the cellular level, we further sought to provide insights on translation of the hamster model to the human disease. Using the nCounter method for deep-genome and multiplexed profiling, the same molecular signature was found in human VL. At 150 dpi we found profound disorganization of the spleen and decreased expression of transcripts involved in the organization of splenic microenvironments. The reduction of PALS in splenic tissue has been associated with decreased expression of *CCL19* and *CCR7*, the ligand of both *CCL19* and *CCL21* (40, 48). We also detected a progressive reduction in the expression of *LT α* , *CXCL13* and its receptor, *CXCR5*, along the course of infection. *LT α* is produced by stromal cells and is involved in WP formation during embryogenesis (29). In mice, the development of VL was marked by decreased number of stromal cells and impaired migration of dendritic cells within spleen compartments, both associated with low expression of *CCL19* and *CCL21* and attributed to a defective function of *CCR7* (48). In canine VL, despite the absence of alterations in *CCL19* and *CCL21* expression, splenic disorganization was found to be associated with a decreased frequency of CD3 T lymphocytes (18), T lymphocyte apoptosis (19) and T cell exhaustion (20). Moreover, a reduction in B cell density in lymphoid follicles was accompanied by a decreased *CXCL13* expression in dogs with VL and disorganized spleens (18).

Transcriptomic Signature of Spleen Disorganization Is Associated With Cell Cycle Arrest

At the final stage of infection (150 dpi), the observed differentially expressed transcripts formed a network of gene regulation associated with spleen disorganization. When an unsupervised network expansion involving these transcripts was performed, a central link was identified with *CDKN2A*. Throughout the kinetics of gene expression shown herein, *CDKN2A* expression was observed to change from reduced (30 dpi) to an increased state at all timepoints after 60 dpi, coinciding with the development of an immunosuppressive environment in the spleen that resulted in poor immune response observed against *L. infantum*, and possibly other pathogens (49). Correspondingly, the expression of cytokines, chemokines and receptors associated with disorganization (*CXCL13*, *CCR5*, *CCL19*, *CCR6*, *CCR7* and *LTA*) predicted regulatory function by *CDKN2A* and was observed to significantly decline after 60 dpi. Immunohistochemistry staining corroborated the impairment of T lymphocyte chemotaxis between 120 and 150 dpi, leading to a reduction in PALS area, which may be potentially associated with the downregulation of *CDKN2A*-related genes as shown at 150 dpi. These changes are reflected on a tissue level, as evidenced by the fading of MZ, reduced PALS area and lymphoid follicle atrophy.

CDKN2A is known to transcribe information used in the production of proteins, such as p16 (INK4A) and p14 (ARF), both involved in cell cycle inhibition in the G1 phase (50). This transcript also plays a role in cell senescence and is involved in immune inflammatory events leading to type I diabetes and atherosclerosis, in addition to being associated with inflammatory bowel disease (51, 52). Taken together, the associations reported herein suggest a regulatory role for *CDKN2A* with respect to cytokine-producing cells. *CDKN2A* was previously found upregulated in both hamster and mouse experimental models of *L. donovani* infection at earlier time points in comparison to this study (25, 26). Importantly, this transcript has been extensively investigated as a biomarker in some types of cancer (50), and may also constitute an early marker of severe outcomes in VL.

The present work explores transcriptional pathways involved in leukocyte chemotaxis, cell cycle arrest and possible alterations in B cell differentiation, in association with histological and clinical changes during the course of VL. The differential gene expression correlated with the phenotypical changes in the T lymphocytes in the spleen, and a similar pattern of the expression of transcripts involved in the spleen remodeling was found in severe cases of human VL. The transcriptome of human VL is, however, limited due to the lack of paired controls. The acquisition of healthy splenic tissue is difficult, since this organ is not usually submitted to biopsy. In some cases it is obtained from splenectomy due to trauma. We made use of the GTEx database (33), which is well established and used by many others. Differential expression of *DLK1* and *CDKN2A* emerging with potential regulatory roles in spleen disorganization is novel in the field and requires further investigations to confirm its relevance.

Our results serve to affirm, on a transcriptomic and histological level, the central role played by the spleen in the establishment of infection and disease progression and stand in agreement with previous phenomenological observations associating a severe profile of VL with disorganization of the spleen.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, PRJNA695421.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Instituto Gonçalo Moniz IGM-FIOCRUZ. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study. The animal study was reviewed and approved by Instituto Gonçalo Moniz.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CM, MH and WS designed the animal experiments. CM, MH, JF, BM, and RB performed the experiments. RK, FG, PR, and GF designed the transcriptomic study and RK, FG, and CM conducted the analysis. LF, CC, and WS obtained the human

samples and conducted the histopathological analysis. CM and WS wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

The authors acknowledge the financial support provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (grant no. 400905/2013-2) and the research productivity scholarship provided to WS. We are also thankful for financial support from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (grant no. 2072_2013) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB (no. PET0053_2013).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Bruno de Menezes Valença and Patrícia Ramos Reboças Luz for project management and to Andris K. Walter for English language revision, critical analysis and manuscript copyediting assistance.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.716314/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Melby PC, Chandrasekar B, Zhao W, Coe JE. The Hamster as a Model of Human Visceral Leishmaniasis: Progressive Disease and Impaired Generation of Nitric Oxide in the Face of a Prominent Th1-Like Cytokine Response. *J Immunol* (2001) 166:1912–20. doi: 10.4049/jimmunol.166.3.1912
- Moreira N das D, Vitoriano-Souza J, Roatt BM, Vieira PM de A, Ker HG, Cardoso JM de O, et al. Parasite Burden in Hamsters Infected With Two Different Strains of *Leishmania (Leishmania) Infantum*: “Leishman Donovan Units” Versus Real-Time PCR. *PLoS One* (2012) 7:e47907. doi: 10.1371/journal.pone.0047907
- Hermida M d’El-R, de Melo CVB, Lima IDS, Oliveira GG de S, Dos-Santos WLC. Histological Disorganization of Spleen Compartments and Severe Visceral Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol* (2018) 8:394. doi: 10.3389/fcimb.2018.00394
- Lage DP, Ludolf F, Silveira PC, Machado AS, Ramos FF, Dias DS, et al. Screening Diagnostic Candidates From *Leishmania Infantum* Proteins for Human Visceral Leishmaniasis Using an Immunoproteomics Approach. *Parasitology* (2019) 146:1467–76. doi: 10.1017/S0031182019000714
- Lima IS, Silva JS, Almeida VA, Leal FG, Souza PAN, Lorangeira DF, et al. Severe Clinical Presentation of Visceral Leishmaniasis in Naturally Infected Dogs With Disruption of the Splenic White Pulp. *PLoS One* (2014) 9:e87742. doi: 10.1371/journal.pone.0087742
- Santana CC, Vassallo J, De Freitas LAR, Oliveira GGS, Pontes-De-Carvalho IC, Dos-Santos WLC. Inflammation and Structural Changes of Splenic Lymphoid Tissue in Visceral Leishmaniasis: A Study on Naturally Infected Dogs. *Parasite Immunol* (2008) 30:515–24. doi: 10.1111/j.1365-3024.2008.01051.x
- Cavalcanti AS, Ribeiro-Alves M, De OR, Pereira L, Mestre GL, Ferreira ABR, et al. Parasite Load Induces Progressive Spleen Architecture Breakage and Impairs Cytokine mRNA Expression in *Leishmania Infantum*-Naturally Infected Dogs. *PLoS One* (2015) 10:e0123009. doi: 10.1371/journal.pone.0123009
- Engwerda CR, Ato M, Kaye PM. Macrophages, Pathology and Parasite Persistence in Experimental Visceral Leishmaniasis. *Trends Parasitology* (2004) 20:524–30. doi: 10.1016/j.pt.2004.08.009
- Varma N, Naseem S. Hematologic Changes in Visceral Leishmaniasis/Kala Azar. *Indian J Hematol Blood Transfusion* (2010) 26:78–82. doi: 10.1007/s12288-010-0027-1
- dos-Santos WLC, Pagliari C, Santos LG, Almeida VA, e Silva TLV, Coutinho JdeJ, et al. A Case of Conventional Treatment Failure in Visceral Leishmaniasis: Leukocyte Distribution and Cytokine Expression in Splenic Compartments. *BMC Infect Dis* (2014) 14:1–7. doi: 10.1186/1471-2334-14-491
- Veress B, Omer A, Satir AA, El Hassan AM. Morphology of the Spleen and Lymph Nodes in Fatal Visceral Leishmaniasis. *Immunology* (1977) 33:607.
- Engwerda CR, Ato M, Cotterell SEJ, Mynott TL, Tschannerl A, Gorak-Stolinska PMA, et al. A Role for Tumor Necrosis Factor- α in Remodeling the Splenic Marginal Zone During *Leishmania* Donovanii Infection. *Am J Pathol* (2002) 161:429–37. doi: 10.1016/S0002-9440(02)64199-5
- Silva O’Hare J, De Oliveira IS, Klever T, Almeida VA, Oliveira GGS, Atta AM, et al. Disruption of Splenic Lymphoid Tissue and Plasmacytosis in Canine Visceral Leishmaniasis: Changes in Homing and Survival of Plasma Cells. *PLoS One* (2016) 11:e0156733. doi: 10.1371/journal.pone.0156733
- Fox CH, Cotter-Fox M. The Pathobiology of HIV Infection. *Immunol Today* (1992) 13:353–6. doi: 10.1016/0167-5699(92)90171-3

ANEXO A: Prospecto do anti-DLK1 disponibilizado pelo fabricante. Disponível em: <<https://www.abcam.com/dlk-1-antibody-ab21682.html>>. Acesso em: 22 junho. 2022




Product datasheet

Anti-DLK-1 antibody ab21682

★★★★☆ 5 Abreviews 27 References 1 Image

Overview

Product name	Anti-DLK-1 antibody
Description	Rabbit polyclonal to DLK-1
Host species	Rabbit
Tested applications	Suitable for: WB
Species reactivity	Reacts with: Mouse Predicted to work with: Rat, Cow, Human 
Immunogen	Synthetic peptide corresponding to Human DLK-1 aa 350 to the C-terminus (C terminal) conjugated to keyhole limpet haemocyanin. (Peptide available as ab23442)
Positive control	This antibody gave a positive signal in E18.5 Mouse Muscle Wild Type Tissue Lysate.
General notes	The Life Science industry has been in the grips of a reproducibility crisis for a number of years. Abcam is leading the way in addressing this with our range of recombinant monoclonal antibodies and knockout edited cell lines for gold-standard validation. Please check that this product meets your needs before purchasing. If you have any questions, special requirements or concerns, please send us an inquiry and/or contact our Support team ahead of purchase. Recommended alternatives for this product can be found below, along with publications, customer reviews and Q&As

Properties

Form	Liquid
Storage instructions	Shipped at 4°C. Store at +4°C short term (1-2 weeks). Upon delivery aliquot. Store at -20°C or -80°C. Avoid freeze / thaw cycle.
Storage buffer	pH: 7.40 Preservative: 0.02% Sodium azide Constituent: PBS Batches of this product that have a concentration < 1mg/ml may have BSA added as a stabilising agent. If you would like information about the formulation of a specific lot, please contact our scientific support team who will be happy to help.
Purity	Immunogen affinity purified

Clonality	Polyclonal
Isotype	IgG

Applications

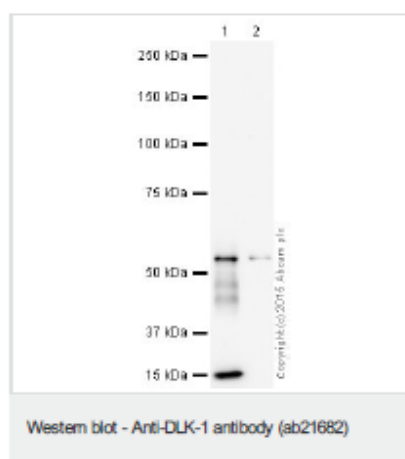
The Abpromise guarantee Our [Abpromise guarantee](#) covers the use of ab21682 in the following tested applications. The application notes include recommended starting dilutions; optimal dilutions/concentrations should be determined by the end user.

Application	Abreviews	Notes
WB		1/2000. Detects a band of approximately 45,48 kDa (predicted molecular weight: 41 kDa). Abcam recommends using milk as the blocking agent. Abcam welcomes customer feedback and would appreciate any comments regarding this product.

Target

Function	May have a role in neuroendocrine differentiation.
Tissue specificity	Found within the stromal cells in close contact to the vascular structure of placental villi, yolk sac, fetal liver, adrenal cortex and pancreas and in the beta cells of the islets of Langerhans in the adult pancreas. Found also in some forms of neuroendocrine lung tumor tissue.
Sequence similarities	Contains 6 EGF-like domains.
Post-translational modifications	N- and O-glycosylated.
Cellular localization	Membrane.

Images



All lanes : Anti-DLK-1 antibody (ab21682) at 1/2000 dilution ((5% Milk blocking))

Lane 1 : E18.5 Mouse Muscle Wild Type Tissue Lysate

Lane 2 : E18.5 Mouse Muscle DLK1 Knockout Tissue Lysate

Lysates/proteins at 5 µg per lane.

Secondary

All lanes : Goat polyclonal to Rabbit IgG - H&L - Pre-Adsorbed (HRP) at 1/5000 dilution

Developed using the ECL technique.

Performed under reducing conditions.

Predicted band size: 41 kDa

Observed band size: 45,48 kDa

Additional bands at: 15 kDa (possible cleavage fragment), 55 kDa. We are unsure as to the identity of these extra bands.

Exposure time: 3 minutes

This blot was produced using an 8% Tris-glycine gel under the Tris-glycine buffer system. The gel was run at 120V for 1 hour 15 minutes before being transferred onto a Nitrocellulose membrane at 30V for 70 minutes. The membrane was then blocked for an hour using 5% Milk before being incubated with ab21682 overnight at 4°C. Antibody binding was detected using an anti-rabbit antibody conjugated to HRP, and visualised using ECL development solution ab133406.

Abcam recommends using milk as the blocking agent. Abcam welcomes customer feedback and would appreciate any comments regarding this product and the data presented above.

Please note: All products are "FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES"

Our Abpromise to you: Quality guaranteed and expert technical support

- Replacement or refund for products not performing as stated on the datasheet
- Valid for 12 months from date of delivery
- Response to your inquiry within 24 hours

- We provide support in Chinese, English, French, German, Japanese and Spanish
- Extensive multi-media technical resources to help you
- We investigate all quality concerns to ensure our products perform to the highest standards

If the product does not perform as described on this datasheet, we will offer a refund or replacement. For full details of the Abpromise, please visit <https://www.abcam.com/abpromise> or contact our technical team.

Terms and conditions

- Guarantee only valid for products bought direct from Abcam or one of our authorized distributors