

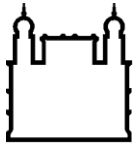
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**ESTUDO DOS MARCADORES DE EXAUSTÃO NO BAÇO DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania infantum***

TAINÃ LUÍS DE SOUZA

Rio de Janeiro
Março de 2018.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

TAINÃ LUÍS DE SOUZA

Estudo dos marcadores de exaustão no baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador (es): Prof^a. Dr^a. Elisa Cupolillo
Prof^a. Dr^a. Fernanda Nazaré Morgado

RIO DE JANEIRO

Março de 2018

Souza, Tainã Luís De.

Estudo dos marcadores de exaustão no baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* / Tainã Luís De Souza. - Rio de Janeiro, 2018.

xxi, 101 f.

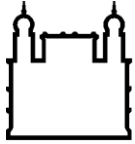
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2018.

Orientadora: Elisa Cupolillo.

Co-orientador: Fernanda Nazaré Morgado.

Bibliografia: f. 71-95

1. Leishmaniose Visceral. 2. Cão. 3. Baço. 4. Exaustão Celular. 5. *Leishmania infantum*. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: TAINÃ LUÍS DE SOUZA

**ESTUDO DOS MARCADORES DE EXAUSTÃO NO BAÇO DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania infantum***

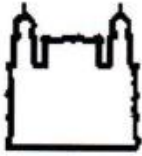
**ORIENTADOR (ES): Prof^a. Dr^a. Elisa Cupolillo
Prof^a. Dr^a. Fernanda Nazaré Morgado**

Aprovada em: 09/03/2018

EXAMINADORES:

**Prof. Dr^a. Fátima da Conceição Silva - Revisora e Presidente (FIOCRUZ/IOC/LIP)
Prof. Dr^a. Katia da Silva Calabrese (FIOCRUZ/IOC/LIMP)
Prof. Dr. Washington Luis Conrado dos Santos (FIOCRUZ Bahia/IGM)
Prof. Dr. Josué da Costa Lima Junior (FIOCRUZ/IOC/LIP)
Prof. Dr^a. Flávia Lima Ribeiro-Gomes (FIOCRUZ/IOC/LPM)**


Rio de Janeiro, 09 de março de 2018.




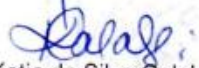
Ministério da Saúde


Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Biologia Parasitária de **Tainã Luís de Souza**, sob orientação da Dr^a. Elisa Cupolillo e coorientado pela Dr^a. Fernanda Nazaré Morgado. Ao nono dia do mês de março de dois mil e dezoito, realizou-se às dez horas, na Sala 14B do Pavilhão Hélio & Peggy Pereira, o exame da dissertação de mestrado intitulada: “: **Estudo dos marcadores de exaustão no baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum***” No programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa: Desenvolvimento de Métodos de Diagnóstico e Controle das Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Fatima da Conceição Silva - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Washington Luis Conrado dos Santos - IGM-FIOCRUZ/BA, Dr^a. Katia da Silva Calabrese - IOC/FIOCRUZ e como suplentes: Dr. Josué da Costa Lima Junior – IOC/FIOCRUZ e Dr. Flávia Lima Ribeiro Gomes – IOC/FIOCRUZ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVADO da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 09 de março de 2018


Dr^a. Fatima da Conceição Silva (Presidente da Banca):


Dr. Washington Luis Conrado dos Santos (Membro da Banca):


Dr^a. Katia da Silva Calabrese (Membro da Banca):


Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

Dedico este trabalho aos meus pais por sua integridade e todo o apoio para que eu alcançasse os meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as oportunidades que me foram dadas e pela força de ter chegado até aqui.

Às minhas orientadoras Dr^a Elisa Cupolillo e Dr^a Fernanda Morgado. Sempre pacientes, mas com a firmeza que me ajudava a ser objetivo nos momentos de dúvidas. Este agradecimento ultrapassa a orientação acadêmica, passa pela amizade, pelos ensinamentos em diferentes esferas e, principalmente, pela confiança depositada em mim que me incentivou a continuar no doutorado.

Ao Dr. Renato Porrozi, por todo o conhecimento compartilhado e pelas ricas sugestões que melhoraram o desenvolvimento do trabalho.

À minha família, meus pais José Luís e Gilvana, e meu irmão Natan, de quem recebi tanto carinho e apoio imensuráveis em todas as situações e por toda minha vida, mas especialmente durante o período do mestrado.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Parasitária pela oportunidade de realizar minha pesquisa e o suporte necessário para concluí-la.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Instituto Oswaldo Cruz (IOC) pelo auxílio financeiro e bolsa de mestrado concedida.

Às pesquisadoras Luiza Pereira, Mariana Boité e Patricia Cuervo, pelo apoio, orientação e amizade.

À Doutoranda Aurea Virgínia Andrade, que sempre esteve disposta a contribuir e me ensinar. Sem a sua ajuda tudo teria sido bem mais difícil! Além da amizade, sua colaboração e experiência foram essenciais.

À equipe Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos do INI pelo auxílio na obtenção do material biológico usado neste estudo.

Aos colegas e equipe do LPL: Bruna, Lucas, Leonardo, Renata, Matheus, Jonathan, Camila, Erika, Carol, Hellen, Nathália, Rosane, Carlos Henrique, Ricardo, Eduardo e Selma.

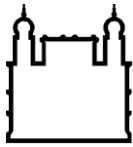
Aos grandes amigos que o Rio de Janeiro me deu: Paulo, Marina, Thalia, Thiago, Bruno e Maria. Amigos para qualquer hora, dando-me conforto nos momentos de dificuldade e apoiando-me nos momentos de vitória. Obrigado pela confiança!

Aos meus companheiros de moradia na cidade maravilhosa, Wellington, Ricardo e Alex, que me receberam tão bem, sempre me ajudando.

Muito obrigado a todos!

“O sucesso consiste em ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo.”

Winston Churchill



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

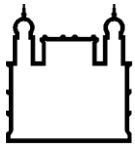
ESTUDO DOS MARCADORES DE EXAUSTÃO NO BAÇO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania infantum*

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Tainã Luís de Souza

Na leishmaniose visceral canina (LVC), o baço é um dos principais órgãos afetados e a desorganização da microarquitetura esplênica tem sido associada à progressão da doença, redução da expressão de citocinas e quimiocinas e falha no controle da carga parasitária, sendo este perfil compatível com a exaustão celular. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão *in situ* dos marcadores de exaustão e sua relação com a desorganização da microarquitetura esplênica e carga parasitária. Para tal, 41 cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* foram submetidos à quantificação da carga parasitária por PCR quantitativo do alvo *ssrRNA* em tecido esplênico. Além disso, foi feita a avaliação histopatológica a partir de cortes de baço corados com hematoxilina e eosina com o objetivo de avaliar o grau de desorganização da polpa branca esplênica (PBE). Os animais foram agrupados de acordo com a organização da PBE e carga parasitária como: 1- organizado/baixa carga parasitária (OB, n=10); 2- desorganizado/baixa carga parasitária (DB, n=22); 3- desorganizado/alta carga parasitária (DA, n=8). Células CD4, CD8, IFN- γ , IL-10, TIM-3 e CTLA-4 foram detectadas por imuno-histoquímica e as células apoptóticas pela técnica de TUNEL. A desorganização da PBE ocorreu juntamente com a redução dos folículos linfóides/mm², células CD4 e agravamento da doença. IFN- γ e células CTLA-4 foram detectadas nos cães OB havendo redução de acordo com o aumento da desorganização e carga parasitária. TIM-3 foi altamente expresso e similar entre os grupos. Apoptose foi detectada mesmo em cães organizados, aumentando em cães DB e reduzindo em DA. Houve correlações negativas entre TIM-3 e CTLA-4, negativas entre IFN- γ e células apoptóticas, e positivas entre CTLA-4 e células apoptóticas. Células B TIM-3⁺ foram detectadas por imunofluorescência em todos os grupos, não havendo diferença entre estes. A expressão gênica de PD-1, PD-L1, PD-L2 e LAG-3 foi identificada, onde a expressão foi menor nos grupos que apresentaram maior desorganização e carga parasitária no baço, sendo significativa esta diferença em PD-L1 e LAG-3. O conjunto de resultados indica que a exaustão em células T deve ocorrer nos estágios iniciais da infecção, uma vez que os animais OB apresentaram células TIM-3⁺, CTLA-4⁺, PD-1⁺, PD-L1⁺, PD-L2⁺ e LAG-3⁺. A apoptose é o mecanismo envolvido na redução de folículos linfóides, células CD4, CTLA-4 e IFN- γ . O presente estudo demonstra uma associação entre marcadores de exaustão, apoptose e desorganização esplênica, redução de linfócitos CD4, falha no controle da carga parasitária e piora da enfermidade.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

STUDY OF EXHAUSTION MARKERS IN THE SPLEEN OF DOGS NATURALLY INFECTED WITH *Leishmania infantum*

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Tainã Luís de Souza

In canine visceral leishmaniasis (LVC), the spleen is one of the main organs affected and the disorganization of the splenic microarchitecture has been associated with disease progression, reduced expression of cytokines and chemokines, and failure to control parasitic load, being this profile compatible with cellular exhaustion. The objective of this study was to evaluate the *in situ* expression of the markers of exhaustion and its relation with the disorganization of the splenic microarchitecture and parasitic load. To that end, 41 dogs naturally infected with *Leishmania infantum* were submitted to quantification of the parasite load by quantitative PCR of the *ssrRNA* target in splenic tissue. In addition, histopathological evaluation was performed from spleen sections stained with hematoxylin and eosin with the objective of evaluating the degree of disorganization of the splenic white pulp (SWP). The animals were grouped according to the organization of the SWP and parasitic load as: 1- organized/low parasitic load (OL, n=10); 2- disorganized/low parasitic load (DL, n=22); 3- disorganized/high parasitic load (DH, n=8). CD4, CD8, IFN- γ , IL-10, TIM-3 and CTLA-4 cells were detected by immunohistochemistry and apoptotic cells by the TUNEL technique. The disorganization of SWP occurred along with the reduction of lymphoid follicles/mm², CD4 cells and worsening of the disease. IFN- γ and CTLA-4 cells were detected in the OL dogs with reduction according to the increase of the disorganization and parasitic load. TIM-3 was highly expressed and similar between the groups. Apoptosis was detected even in organized dogs, increasing in DL dogs and reducing in DH. TIM-3⁺ B cells were detected by immunofluorescence in all groups, with no difference between them. The gene expression of PD-1, PD-L1, PD-L2 and LAG-3 was identified, the expression was lower in the groups that presented greater disorganization and parasitic load in the spleen, being significant this difference in PD-L1 and LAG-3. The set of results indicates that T cell exhaustion should occur in the early stages of infection, since OL animals had TIM-3⁺, CTLA-4⁺, PD-1⁺, PD-L1⁺, PD-L2⁺ and LAG-3⁺ cells. Apoptosis is the mechanism involved in the reduction of lymphoid follicles, CD4, CTLA-4 and IFN- γ cells. The present study demonstrates an association between exhaustion markers, apoptosis and splenic disorganization, reduction of CD4 lymphocytes, failure to control parasitic load and worsening of the disease.

ÍNDICE

RESUMO	X
ABSTRACT	XI
INTRODUÇÃO	1
1.1 Leishmanioses	1
1.1.1 Ciclo biológico	2
1.1.2. Epidemiologia	3
1.2 Leishmaniose Visceral Canina	5
1.2.1 O cão como reservatório urbano	5
1.2.2 Sinais Clínicos	5
1.2.3 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina	7
1.2.4 Controle	10
1.2.5 Imunopatogenia	12
1.3 O baço	15
1.3.1 Anatomia esplênica	15
1.3.2 O baço na LVC	19
1.3.3 Desorganização esplênica e falha no controle da carga parasitária	20
1.4 Exaustão celular	22
1.5 Justificativa	27
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Específicos	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Animais	30
3.2 Avaliação clínica dos animais	30
3.3 Aspectos éticos	30
3.4 Análise histopatológica	31
3.5 Extração de DNA em tecido esplênico	31
3.6 Determinação da carga parasitária por qPCR	32

3.7 Extração do RNA e Quantificação da Expressão Gênica de marcadores de exaustão (PD-1, PD-L1, PD-L2 e LAG-3) por qRT-PCR.....	33
3.8 Imuno-histoquímica.....	35
3.9 Imunofluorescência.....	36
3.10 TUNEL.....	36
3.11 Análise estatística.....	37
4 RESULTADOS	38
4.1 Análise dos sinais clínicos dos cães com Leishmaniose Visceral.....	38
4.2 Análise qualitativa e quantitativa do perfil de células CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e CD21 ⁺ de acordo com o escore clínico dos cães com Leishmaniose Visceral.....	42
4.3 Análise qualitativa e quantitativa da expressão de citocinas (IFN- γ e IL-10) e de proliferação (Ki-67) no baço de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> de acordo com o escore clínico.....	45
4.4 Análise qualitativa e quantitativa da expressão de marcadores de exaustão (TIM-3, CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3) no baço de cães naturalmente com <i>L. infantum</i> infectados de acordo com o escore clínico.....	47
4.5 Associação da análise histopatológica com carga parasitária.....	50
4.6 Análise qualitativa e quantitativa do perfil de células CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e CD21 ⁺ de acordo com a desorganização da polpa branca esplênica e carga parasitária.....	52
4.7 Análise qualitativa e quantitativa da expressão de citocinas (IFN- γ e IL-10) e de proliferação (Ki-67) no baço de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> de acordo com a desorganização da polpa branca esplênica e carga parasitária.....	54
4.8 Análise qualitativa e quantitativa da expressão de marcadores de exaustão (TIM-3, CTLA-4, PD-1, LAG-3, PD-L1, e PDL-2) no baço de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> de acordo com a desorganização da polpa branca esplênica e carga parasitária.....	54

4.9	Análise qualitativa da presença de células B exaustas (CD21 ⁺ TIM-3 ⁺) no baço de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i>	59
4.10	Análise quantitativa e qualitativa de células apoptóticas no baço de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i>	60
5	DISCUSSÃO	63
6	CONCLUSÕES	70
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
8	ANEXOS	96
8.1	Anexo 1- Correlação dos marcadores com o escore clínico. Dados representados como mediana (valores mínimo-máximo).....	96
8.2	Anexo 2- Correlação dos marcadores com a organização da polpa branca esplênica e carga parasitária. Dados representados como mediana (valores mínimo-máximo)	98
8.3	Anexo 3- Declaração da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida da <i>Leishmania spp.</i> Adaptado de Frézard, 2015.	3
Figura 2 - Status da endemicidade da leishmaniose visceral humana no mundo. Adaptado de WHO 2015.	4
Figura 3 - Papel da via PD-1 e seus ligantes na exaustão celular. Adaptado de Okazaki, 2013.	23
Figura 4 - Identificação por imunohistoquímica da presença de (A) CD4 ⁺ (B) CD8 ⁺ , (C) CD21 ⁺ no baço de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> . Células positivas coradas em castanho. Barra de aumento: 25µm.	43
Figura 5 - Perfil celular observado no baço de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> de acordo com o escore clínico: (A) Percentual de células CD4 ⁺ , (B) Células CD4 ⁺ /mm ² , (C) Percentual de células CD8 ⁺ , (D) Células CD8 ⁺ /mm ² , (E) Percentual de células CD21 ⁺ e (F) Células CD21 ⁺ /mm ² . Mann-Whitney e Kruskal Wallis: p>0,05.....	44
Figura 6 - Identificação por imunohistoquímica da presença de (A) IFN-γ ⁺ (B), IL-10 ⁺ , (C) Ki-67 ⁺ no baço de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> . Células positivas coradas em vermelho. Barra de aumento: 25µm.	45
Figura 7 - Perfil celular observado no baço de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> de acordo com o escore clínico: (A) Percentual de células IFN-γ ⁺ , (B) células IFN-γ ⁺ /mm ² (C) percentual de células IL-10 ⁺ , (D) células IL-10 ⁺ /mm ² , (E) percentual de Ki-67 ⁺ e (F) células Ki-67 ⁺ /mm ² . Mann-Whitney: (C) *p=0,0409; **p=0,0205. Kruskal Wallis: (C) p=0,026.....	46
Figura 8 - Identificação por imunohistoquímica da presença de (A) TIM-3 ⁺ e (B) CTLA-4 ⁺ no baço de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> . Células positivas coradas em vermelho. Barra de aumento: 25µm.	47

- Figura 9** - Perfil celular observado no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum* de acordo com o escore clínico: (A) Percentual de células TIM-3⁺, (B) TIM-3⁺/mm², (C) Percentual de células CTLA-4⁺, (D) Células CTLA-4⁺/mm². Mann-Whitney e Kruskal Wallis: p>0,05.....48
- Figura 10** - Expressão gênica de marcadores de exaustão no baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. Análise *ex vivo* por qPCR dos níveis de mRNA no baço de cães classificados de acordo com o escore clínico. Valores de expressão gênica normalizados para os genes constitutivos HPRT e GADPH. Anova: (A) p <0,022. (*) Mann-Whitney:(B) p <0,036.49
- Figura 11** - Figura ilustrativa da polpa branca esplênica de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Em (A) polpa branca esplênica (PBE) organizada. Em (B) PBE pouco desorganizada. Em (C) PBE com média desorganização. Em (D) PBE intensamente desorganizada. Barra de aumento 10 µm.51
- Figura 12** - Escore clínico observado de acordo com o grau de organização da polpa branca esplênica (PBE) em cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Mann-Whitney: * p=0,0235. PBE organizada: Animais com PBE organizada a pouco desorganizada. PBE desorganizada: animais com média a intensa desorganização da polpa branca esplênica.51
- Figura 13** - Perfil celular observado no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum* de acordo com a desorganização da polpa branca esplênica e carga parasitária: (A) Percentual de células CD4⁺, (B) Células CD4⁺/mm², (C) Percentual de células CD8⁺, (D) Células CD8⁺/mm², (E) Percentual de células CD21⁺, (F) Células CD21⁺/mm². Mann-Whitney: (A) *p=0,019; (B) *p=0,0036, **p=0,0383. Kruskal Wallis: (A) p=0,031; (B) p=0,021.53
- Figura 14** - Perfil celular observado no baço de cães naturalmente infectados por *L. infantum* de acordo com a desorganização da polpa branca esplênica e carga parasitária: (A) Percentual de células IFN-γ⁺, (B) Células IFN-γ⁺/mm², (C) Percentual de células IL-10⁺, (D) Células IL-10⁺/mm², (E) Percentual de células Ki-67⁺, (F) Células Ki-67⁺/mm². Mann-Whitney e Kruskal Wallis: p>0,05.....55

Figura 15 - Análise quantitativa de células exaustas no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum* de acordo com a desorganização da polpa branca esplênica e carga parasitária: (A) Percentual de células TIM-3⁺, (B) Células TIM-3/mm², (C) Percentual de células CTLA-4⁺, (D) Células CTLA-4⁺/mm². Mann-Whitney: (C) *p=0,00160. Kruskal Wallis (C) p=0,021.57

Figura 16 - Expressão gênica de marcadores de exaustão no baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. Análise *ex vivo* por qPCR dos níveis de mRNA no baço de cães classificados de acordo com a carga parasitária e desorganização esplênica. Valores de expressão gênica normalizados para os genes constitutivos HPRT e GADPH. Anova: (B) p=0,01; (D) p= 0,01. Teste de Tukey (*): (B) p <0,05; (D) p <0,05.58

Figura 17 - Identificação por imunofluorescência da presença de células CD21⁺ e TIM-3⁺ no baço de cães naturalmente infectados por *L. infantum* apresentando polpa branca esplênica organizada (A-C) e desorganizada (D-F). Em A e D observa-se a presença de células CD-21⁺/linfócitos B (Vermelho PE). Em B e E a presença de células TIM-3⁺ (verde FITC). Em C e F imagens sobrepostas (vermelho PE/verde FITC/azul DAPI). Setas amarelas indicam células CD21⁺ expressando TIM-3⁺. Barra de aumento: 25 µm.59

Figura 18 - Identificação por TUNEL da presença de células apoptóticas no baço de cães naturalmente infectados por *L. infantum* apresentando polpa branca esplênica organizada (A-B) e desorganizada (C-D). Barra de aumento: 25 µm.61

Figura 19 - Análise quantitativa de células em apoptose no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum* de acordo com a desorganização da polpa branca esplênica e carga parasitária. Mann-Whitney: *p=0,00662

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Dados clínicos coletados dos cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> e incluídos no estudo.....	42
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Genes alvos e respectivas sequências utilizados na quantificação da carga parasitária. S, senso; AS, anti-senso, pb, pares de bases.33

Tabela 2: Genes alvos e desenho dos iniciadores para cDNA. S, senso; AS, anti-senso, pb, pares de bases.34

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADAM-10	Proteína 10 contendo domínio de desintegrina e metaloproteinase
AEC	3-amino-9-etil-carbazol
APRIL	Ligante indutor de proliferação
BAFF	Fator de ativação das células B
B7-DC	Morte celular programada 1 ligante 2
B7H1	Ligante de morte programada 1
CCL19	Ligante de quimiocina (motivo C-C) 19
CCL21	Ligante de quimiocina (motivo C-C) 21
CCR7	C-C receptor de quimiocina tipo 7
CD25	Grupamento de diferenciação 25
CD274	Grupamento de diferenciação 274
CD28	Grupamento de diferenciação 28
CD3	Grupamento de diferenciação 3
CD4	Grupamento de diferenciação 4
CD8	Grupamento de diferenciação 8
CD40	Grupamento de diferenciação 40
CD80	Grupamento de diferenciação 80
CD86	Grupamento de diferenciação 86
CTLA-4	Antígeno 4 do linfócito T citotóxico
CXCL12	Ligante de quimiocina (motivo C-X-C) 12
CXCL13	Ligante de quimiocina (motivo C-X-C) 13
CXCL5	Ligante de quimiocina motivo C-X-C) 5
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DC	Célula Dendrítica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Gal-9	Galectina-9

GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos e monócitos
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
IFN- γ	Interferon gama
IgC	Domínio constante de imunoglobulina
IgM	Imunoglobulina M
IgV	Domínio variável de imunoglobulina
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
ITIM	Motivo de inibição do imunorreceptor baseado em tirosina
ITSM	Motivo de troca do imunorreceptor a base de tirosina
Ki-67	Antígeno Ki-67
LAG-3	Gene 3 de ativação de linfócitos
LPS	Lipopolissacarídeo
LSECtin	Lectina tipo C de fígado e linfonodos de células endoteliais sinusoides
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MEC	Matriz extracelular
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
MMP-2	Metaloproteinase da matriz 2
MMP-9	Metaloproteinase da matriz 9
NK	Célula exterminadora natural
NNN	Meio de cultura Neal, Novy, Nicolle
OCT	Composto OCT (temperatura ótima de corte)
PALS	Bainha linfóide periarteriolar
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos

PBMC	Célula mononuclear de sangue periférico
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD-1	Proteína de morte celular programada 1
Pdcd1	Proteína de morte celular programada 1
Pdcd1lg2	Ligante 2 da proteína de morte programada 1
PD-L	Ligante de morte programada
PD-L1	Ligante de morte programada 1
PD-L2	Ligante de morte programada 2
PE	Ficoeritrina
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
S1P1	Receptor de esfingosina-1-fosfato 1
S1P3	Receptor de esfingosina-1-fosfato 3
ssrRNA	Pequena subunidade ribossomal de ácido ribonucleico
STAT-5	Transdutor de sinal e ativador transcricional 5
TCR	Receptor de células T
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
Th1	Linfócito T auxiliar 1
Th2	Linfócito T auxiliar 2
Th17	Linfócito T auxiliar 17
TILs	Linfócitos infiltradores de tumores
TIM-3	Domínios de mucina e imunoglobulina de célula T
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF- β	Fator de necrose tumoral beta
TR-DPP	Teste rápido <i>Dual Path Platform</i>
Treg	Linfócito T Regulatório
TUNEL	Marcação de “ <i>nicks</i> ” por dUTP e deoxinucleotidil terminal transferase

INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças tropicais e subtropicais causadas por parasito intracelular do gênero *Leishmania*, que é transmitido aos seus hospedeiros vertebrados pelo repasto sanguíneo de flebotomíneos, principalmente dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. São encontradas em todos os continentes com exceção da Antártida, e são endêmicas em áreas geográficas circunscritas no nordeste da África, no sul da Europa, Oriente Médio e na América do Sul e Central (Alvar et al., 2012). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose é considerada uma das sete doenças tropicais mais importantes, representando um grave problema de saúde mundial, apresentando um amplo espectro de manifestações clínicas. A doença apresenta uma diversidade de manifestações clínicas, agrupadas em duas categorias: Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV) (WHO, 2010).

A LV, também conhecida como kala-azar, é a forma mais grave de leishmaniose, sendo em alguns casos fatal se não tratada a tempo. Geralmente apresenta um período de incubação de 3 a 8 meses (Piscopo e Mallia, 2007), apesar de existirem relatos de até 34 meses (Stone et al., 1952). A população em risco inclui crianças menores de 5 anos, pacientes imunocomprometidos e pessoas que apresentam desnutrição (Silva et al., 2005; Cruz et al., 2006; Maciel et al., 2008). Os sintomas podem iniciar gradualmente ou de forma súbita. Produz lesões em órgãos do sistema fagocítico mononuclear e manifesta-se com adenomegalias, hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia, hipergamaglobulinemia, febre (intermitente), perda de peso, astenia, pigmentação cutânea, assim como áreas hipopigmentadas na boca, nas mãos e na linha central do abdômen (Berman, 1998). Estes sintomas derivam da invasão dos órgãos alvos: baço, fígado, medula óssea, etc. As espécies que causam a LV pertencem ao complexo *Leishmania donovani*: *Leishmania donovani* na Índia e na África Oriental e *Leishmania infantum* nas demais regiões endêmicas (Alvar et al., 2012). A LV antroponótica causada por *L. donovani* encontra-se presente no leste da África e na Índia afetando pessoas de todas as idades, ainda que outras espécies como *L. tropica* possam visceralizar ocasionalmente (Sacks et al. 1995).

1.1.1 Ciclo biológico

Conforme revisto por Bates (2007), os parasitos são transmitidos através do repasto sanguíneo dos vetores fêmeas de flebotomíneos infectados (*Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo). O ciclo de vida complexo das espécies do gênero *Leishmania* começa com os promastigotas procíclicos extracelulares flagelados no intestino dos vetores, onde se multiplicam por divisão binária. Os parasitos sofrem metaciclogênese, tornando-se promastigotas metacíclicos. Estas formas podem ser identificadas próximas à válvula do estomodeu. Elas possuem um corpo celular pequeno, flagelo longo e não se dividem. São parasitos altamente móveis e livres que podem migrar ao longo do intestino anterior e alcançar a faringe, cibário e probócide. Através da regurgitação, os flebotomíneos introduzem parasitos juntamente com fatores imunomoduladores e componentes salivares durante a alimentação nas áreas expostas da pele dos hospedeiros, introduzindo moléculas como apirase, com ação anti-agregação plaquetária e maxadilan, com ação na ativação de macrófagos (Ribeiro et al., 1986; Rogers e Titus, 2003). Tais parasitos são internalizados por fagócitos, como neutrófilos, células dendríticas e, especialmente, macrófagos em tecido dérmico. A eferocitose dos neutrófilos pelos macrófagos é também a origem da invasão celular do parasito em macrófagos (Handler et al., 2015; Kaye e Scott 2011; Ribeiro-Gomes e Sacks 2012).

Dentro de macrófagos, há uma transformação para outro estágio parasitário, as formas amastigotas (formas com flagelos não aparentes). Estas formas são capazes de multiplicar no interior de macrófagos dérmicos e também em outras células de diferentes tecidos do sistema fagocítico mononuclear, como os linfonodos e o fígado (Barsky et al., 1978). O ciclo reinicia quando as fêmeas de flebotomíneos ingerem células infectadas durante a alimentação no hospedeiro infectado. Dentro dos vetores, os parasitos tornam-se promastigotas assim que atingem o intestino posterior ou o intestino médio (dependendo do subgênero de *Leishmania* spp.), onde se multiplicam para migrar novamente para as glândulas salivares dos vetores, perpetuando assim seu ciclo de vida (Kaye e Scott 2011; Ribeiro-Gomes e Sacks 2012; Frézard, 2015) (figura 1).

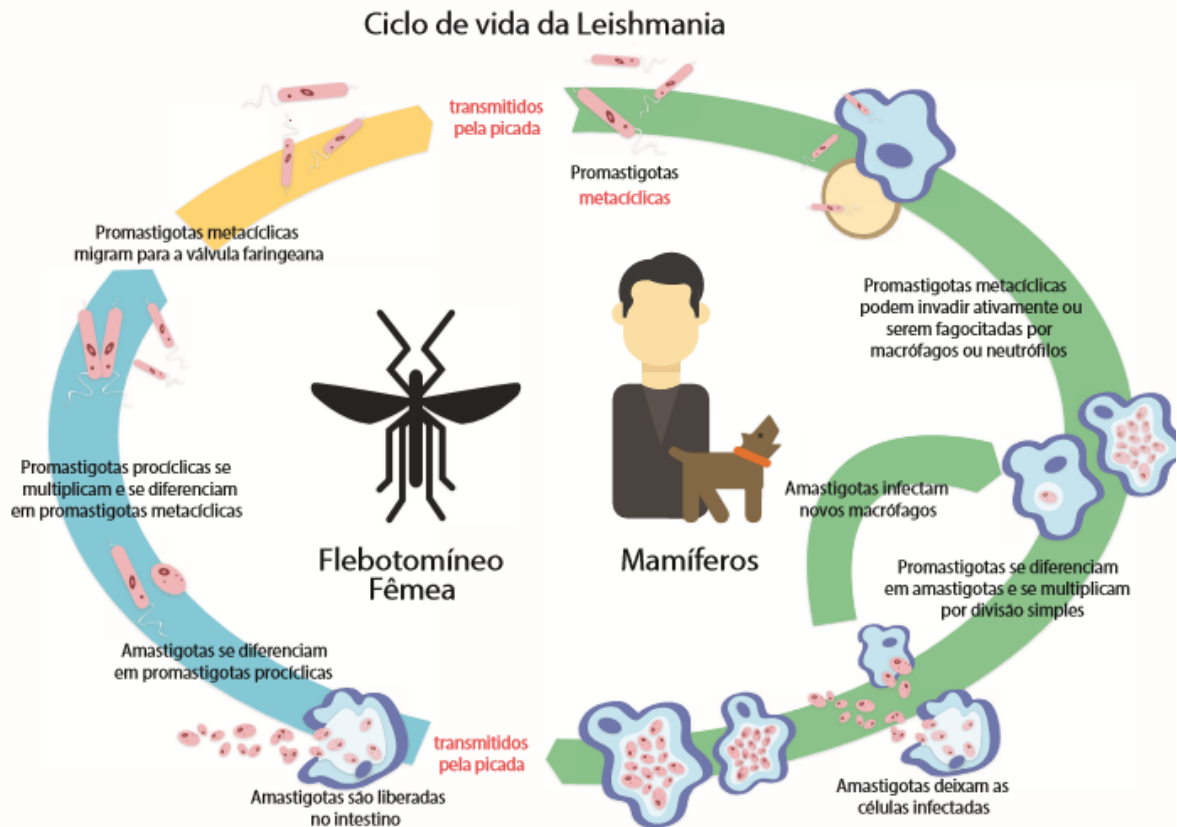


Figura 1 - Ciclo de vida da *Leishmania* spp. Adaptado de Frézard, 2015.

1.1.2. Epidemiologia

A epidemiologia da LV é variada (figura 2), sendo o resultado de interações associadas entre o vetor (biomassa, espécie, capacidade vetorial, comportamento, etc.), o hospedeiro (biomassa, espécie, estrutura etária, raça, tipo de reprodução, medidas de controle), o parasito (biomassa, zimodema) e fatores ecológicos (como temperatura, higrometria, nichos ecológicos do vetor, principalmente larvas, etc.) (Ready, 2008). Os padrões epidemiológicos da infecção por *L. infantum* são dinâmicos, com uma clara tendência para a extensão geográfica, um aumento das espécies hospedeiras e vetoriais listadas e a descrição de novos zimodemas (Chaara et al., 2014).

No ambiente silvestre no Brasil, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*), enquanto que na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção (Brasil, 2014). O estilo de vida do cão é muito importante, uma vez que os cães que vivem ao ar livre ou não têm proteção baseada em inseticidas (principalmente coleiras

antiparasitárias) estão mais expostos (Fraga et al., 2012). A distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) corresponde à distribuição de seus vetores. Esta doença está presente em 50 países na Europa, África, Ásia e América (WHO, 2010), incluindo novas áreas endêmicas onde ocasionalmente são relatados surtos, como Estados Unidos (Freeman et al., 2010) e Canadá (Schantz et al., 2005). Nos Estados Unidos, a LVC é considerada uma doença emergente em cães (Petersen, 2009). De modo geral, nas áreas endêmicas, o número de cães infectados é muito maior do que o número de casos clínicos. Este aspecto conduz a epidemiologia desta infecção, uma vez que os cães assintomáticos são os importantes reservatórios dos parasitos. O principal ciclo epidemiológico da LVC é doméstico; está concentrado em regiões suburbanas, enquanto o ciclo silvestre é críptico. Os gatos também podem expressar sinais clínicos de leishmaniose visceral. Em um estudo composto por 200 gatos, dois animais apresentaram sinais clínicos, especificamente lesões crostosas na região cervical dorsal juntamente com hepatoesplenomegalia (Costa et al., 2010), mas seu papel como reservatórios ainda é desconhecido e precisa ser explorado (Martín-Sanchez et al., 2007; Solano-Gallego et al., 2007; Figueiredo et al., 2009.).

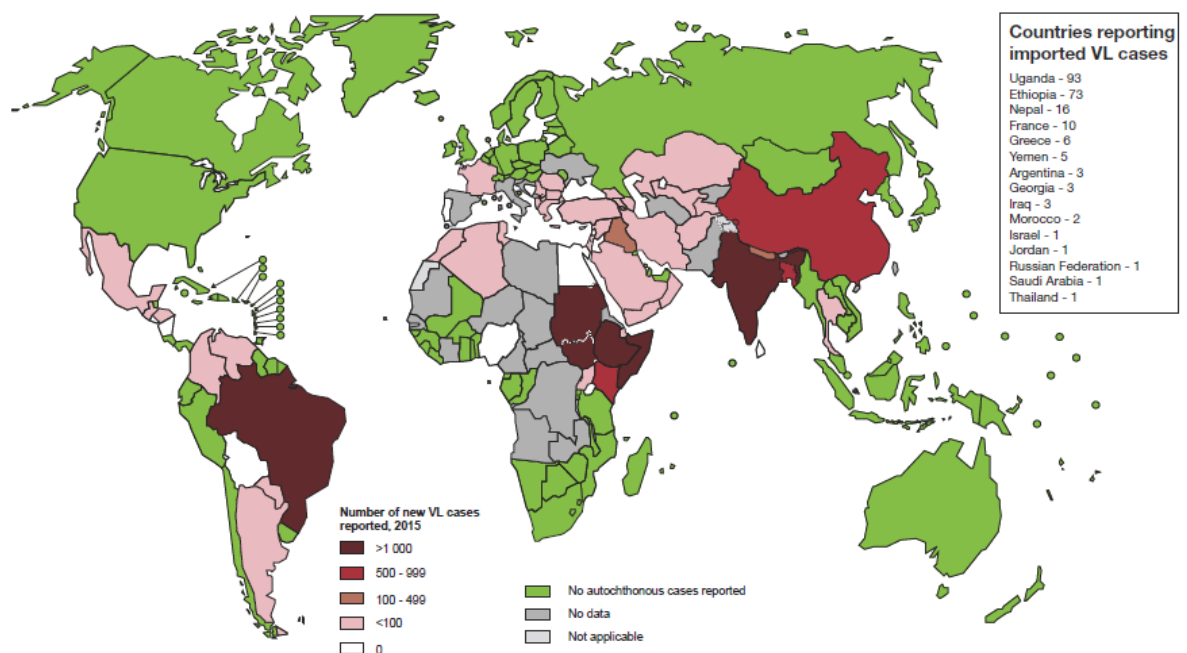


Figura 2 - Status da endemicidade da leishmaniose visceral humana no mundo. Adaptado de WHO 2015.

1.2 Leishmaniose Visceral Canina

1.2.1 O cão como reservatório urbano

O cão tem sido implicado como principal reservatório urbano do parasito e fonte de infecção para o vetor *Lutzomyia longipalpis*, uma vez que estes mamíferos apresentam intensa carga parasitária na pele e sangue (Borja et al., 2016). Além disso, nestes canídeos a doença é fatal devido à escassez de fármacos eficazes para uso em animais, sendo adotado o procedimento de eutanásia de animais infectados, visto que para humanos, a presença de cães infectados oferece risco para a aquisição da LV (Aslan et al., 2016). Embora na forma assintomática os cães apresentem um padrão de resposta celular do tipo I, isto é, baixa carga parasitária, ausência de sinais clínicos, formação de granuloma, presença de células T, macrófagos e células dendríticas e elevada expressão de IFN- γ , tais cães também são eutanasiados uma vez que é frequente a conversão da forma assintomática para sintomática com alta carga parasitária (Saporito et al., 2013).

Moreno e Alvar (2002) descreveram que cães são excelentes modelos para o entendimento da imunopatogenia da LV e têm sido considerados reservatórios do parasito dentro do ambiente urbano devido a sua relação com humanos e seu papel na manutenção do ciclo do parasito (Moreno e Alvar, 2002; Brasil, 2014). Tanto cães naturalmente infectados como experimentalmente infectados são utilizados nos estudos da LV, o que muito tem contribuído para os avanços nas pesquisas de fármacos e insumos para composição de vacinas, uma vez que este modelo é considerado adequado para o entendimento da LV (Goto e Lindoso, 2004).

1.2.2 Sinais Clínicos

Na LVC, os sinais clínicos mais comuns são: onicogribose, anorexia, dermatite, linfadenopatia, alopecia e ceratoconjuntivite (Lima et al., 2014; Cavalcanti et al., 2015). Pode haver também o acometimento de tecidos como rins, linfonodos, fígado, trato gastrointestinal, além do sistema nervoso central e medula óssea (Silva et al., 2013). O acometimento de múltiplos órgãos se dá através do tropismo observado em algumas espécies de *Leishmania* sp. para vísceras, além de co-infecções, que facilitam a visceralização de espécies dermatrópicas devido a

imunodepressão, assim caracterizando a LV como uma infecção multissistêmica (Oliveira et al., 2013; Morgado et al., 2016).

A LVC é geralmente uma doença crônica e, como resultado da complexidade das interações imunopatogênicas, a diversidade dos tecidos e órgãos afetados e a cepa do protozoário, os sinais clínicos são muito polimórficos e, em muitos casos, podem levar a um diagnóstico errado (Ciaramella et al., 1997; Greene, 2012; Rallis et al., 2005).

Os sinais da LVC começam com uma reação no local da picada do flebotomíneo, também conhecido como “cancro de inoculação” (Killick-Kendrick et al., 1994). Esta é uma lesão ulcerativa única, que regride após um número variável de dias, dando lugar a um período "silencioso". A expressão clínica da infecção começa com sinais clínicos leves, mas progressivos, que ganham gravidade: insensibilidade e aumento da relutância ao exercício físico, má condição corporal, hiporexia, perda de peso e amiotrofia localizada (cabeça) e generalizada. No entanto, os estágios iniciais da doença não estão associados a sinais gerais claros. O sinal mais frequente na LVC é o aumento dos linfonodos, que se tornam móveis e indolores (Ciaramella et al., 1997). Este aumento ocorre no início durante o curso da doença e, em alguns casos, pode ser o único sinal clínico. A esplenomegalia pode ser detectada, mas é inconsistente (Baneth et al., 2008).

Os sinais dermatológicos são a segunda manifestação mais comum da LVC (Greene, 2012; Baneth et al., 2008; Martinetti, 2013; Koutinas et al., 2010). Eles podem ser os únicos sinais detectáveis ou podem estar associados a outros tipos de lesões (Papadogiannakis et al., 2005). Os sinais dermatológicos variam em tipo e intensidade, mas não estão associados com prurido. A alopecia difusa pode não estar associada à seborreia seca, que pode ser localizada (principalmente na região dorso-lombar) ou disseminada em todo o corpo. O cão apresenta queratose folicular e, em alguns casos, paraqueratose com infiltrado inflamatório, às vezes associado a histiócitos, plasmócitos e macrófagos, podendo as formas amastigotas de *Leishmania* sp. estarem presentes (Cosmo et al., 2017). A hiperqueratose pode aparecer na cabeça, na região nasal e nos coxins. As úlceras cutâneas ou mucosas multifocais podem estar associadas à necrose das camadas epidérmicas e dérmicas. Existe infiltrado polimórfico ao redor da necrose, constituída por uma mistura de histiócitos e linfócitos. Pode haver hiperqueratose no nariz do cão com plasmócitos e macrófagos infectados por amastigotas de *Leishmania* sp. e frequentemente, são relatadas infecções bacterianas (principalmente

Staphylococcus spp.) ou fúngicas (*Malassezia pachydermatis*), que induzem a uma dermatite pustulosa caracterizada pela presença de um infiltrado histiolinfoplasmocítico inflamatório (Blavier et al., 2001).

Um aumento no comprimento das unhas (onicogrifose) pode tornar-se aparente. Podem ocorrer também nódulos, que podem assumir várias formas, desde pápulas simples até nódulos semelhantes a tumores com linfadenopatia periférica. Os nódulos podem ser generalizados ou localizados no espaço interdigital. Em alguns casos, os nódulos podem se tornar ulcerados (Blavier et al., 2001). A dermatite nodular com infiltrado inflamatório, contendo macrófagos com altos níveis de parasitos e alguns linfócitos e plasmócitos, foi relatada. A forma nodular é mais frequentemente vista na raça boxer (Vidor et al., 1991). Podem ocorrer lesões cutâneas atípicas e raras: com despigmentação (principalmente nasal), paniculite e hiperqueratose nasal. Estas lesões também podem ser encontradas nos coxins (Blavier et al., 2001).

Em relação aos sinais oculares, estes são polimórficos e incluem: conjuntivite ornodular difusa; blefarite esfoliativa, ulcerativa ou nodular; esclerite nodular ou difusa; uveíte anterior ou posterior, que pode ser granulomatosa ou difusa; glaucoma; panoftalmia e ceratoconjuntivite (Baneth et al., 2008; Solano-Gallego et al., 2009; Amara, 2003).

Várias outras formas atípicas são relatadas na LVC, como dermatite pustular estéril devido à foliculite supurativa; claudicação devido à poliartrite, resultante da hipersensibilidade do tipo III (Greene, 2012) e, mais raramente, miosite granulomatosa (Blavier et al., 2001).

1.2.3 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina

A leishmaniose é uma doença de notificação compulsória, apresentando características clínicas de evolução grave, desta forma o diagnóstico deve ser feito de forma precisa e o mais precocemente possível (Brasil, 2014). Por muito tempo os testes mais utilizados no diagnóstico de LV no Brasil eram a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), sendo considerados, sobretudo este último, testes de escolha para inquéritos populacionais (Gontijo e Melo, 2004).

A RIFI apresenta especificidade de 78 a 92% e sensibilidade de 82 a 95%, porém requer condições de laboratório sofisticadas que inviabilizam sua utilização

em campo (Assis et al., 2008). A técnica consiste na aderência de antígenos constituídos de promastigotas de *Leishmania* em lâminas de microscopia para fluorescência, onde é processada a reação com o soro a ser testado e a ligação antígeno-anticorpo é visualizada com o auxílio de um conjugado fluorescente. De acordo com o Ministério da Saúde, o resultado da imunofluorescência é expresso em títulos do soro, considerando animais soropositivos na RIFI aqueles com títulos iguais ou superiores a 1:40 (Brasil, 2014).

O ELISA constitui-se na reação de anticorpos presentes nos soros com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* spp. (Engvall e Perlmann, 1971). A visualização da reação ocorre quando adicionada uma anti-imunoglobulina de cão marcada com a enzima peroxidase, que se ligará aos anticorpos específicos, resultando em um produto com coloração que poderá ser quantificado por espectrofotometria. O resultado é considerado sororreagente a partir da apresentação do valor da densidade óptica igual ou superior a media mais 3 desvios-padrões do resultado dos soros controles negativos (ponto de corte - Cut-Off) (Brasil, 2014).

Atualmente, os métodos de diagnóstico sorológico da LVC recomendados pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral para os órgãos de saúde pública no Brasil são o teste rápido imunocromatográfico (TR-DPP®, Biomanguinhos) como triagem e o ELISA como confirmatório, utilizados na rotina e nos inquéritos de cães em municípios onde já houve registro da doença (Brasil, 2014).

De acordo com Grimaldi e colaboradores (2012), o TR-DPP®, que une dois antígenos recombinantes (rK39 e rK26), mostrou potencial promissor. Contudo, apresentou elevada sensibilidade apenas em cães sintomáticos (98%), sendo baixa (47%) nos assintomáticos. Indicando a necessidade da inserção de mais antígenos no teste rápido para tornar a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* mais eficaz na fase inicial ou assintomática da enfermidade.

O isolamento em meio de cultura é considerado padrão ouro no diagnóstico, pois atua confirmando o diagnóstico clínico e também preserva o parasito isolado para o uso em outras pesquisas, como identificação de espécies de *Leishmania* por técnicas imunológicas, bioquímicas ou moleculares (Vega-López, 2003; Ihalamulla et al., 2005).

Em diversos meios de cultura, o parasito cresce relativamente bem à temperatura ambiente (Gontijo e Carvalho, 2003). Os meios mais empregados para

o isolamento de amostras são bifásicos, compostos por uma fase sólida de ágar sangue e uma líquida dispostos em tubo de vidro (Ihalmulla et al., 2005). O meio geralmente empregado para isolamento é o ágar-sangue de Novy e McNeal modificado por Nicolle - NNN, acrescido de meio líquido Schneider, suplementado com soro fetal bovino (Gontijo e Carvalho, 2003).

A demonstração pelo isolamento do parasito e a demonstração direta dos parasitos nas lesões de pacientes são difíceis por diversas razões, como o tamanho limitado da amostra (aspirados ou biópsias), o pequeno número de parasitos presentes e especialmente a contaminação secundária por fungos e bactérias (Palomino et al., 1983).

Em relação ao diagnóstico molecular, a MLEE (Eletroforese de Enzimas Multilocos) permite a identificação das diferentes espécies e cepas de *Leishmania*. Para isto deve-se fazer um cultivo axênico com o objetivo de obter um grande número de parasitos e posteriormente analisar catorze isoenzimas diferentes mediante eletroforese (Talmi-Frank et al., 2010). A MLEE baseia-se na variação da mobilidade eletroforética das enzimas nas diferentes espécies de *Leishmania* (Talmi-Frank et al., 2010). Com base na análise do perfil de isoenzimas obtido é possível determinar a cepa e espécie de *Leishmania* (Zhang et al., 2006). Este método resulta alta demanda técnica e consome muito tempo, podendo requerer até dois meses (Zhang et al., 2006). Enquanto que a detecção de DNA do parasito em amostras sanguíneas, medula óssea e produtos de biópsias mediante a reação de polimerização em cadeia (*polimerase chain reaction* - PCR) é promissora para o diagnóstico da LVC, demonstrando elevada sensibilidade e especificidade, superando resultados obtidos pelas técnicas de ELISA, RIFI e cultura na detecção de animais infectados por *Leishmania* sp. (Reale et al., 1999; Solano-Gallego et al., 2001a; Miró et al., 2008). Manna e colaboradores (2004) analisaram diferentes tecidos de cães naturalmente infectados, obtendo elevada sensibilidade e especificidade: em 94% das amostras sanguíneas, 99% das amostras de linfonodos e 95% das biópsias de pele foi possível a detecção do DNA do parasito. O método de PCR em tempo real apresenta as mesmas dificuldades da técnica convencional, tem sensibilidade comparável, mas pode ser útil no acompanhamento da carga parasitária durante o tratamento (Lachaud et al., 2000).

1.2.4 Controle

O controle da LVC é importante devido à gravidade da doença em cães infectados e seu caráter zoonótico. A prevenção é muito mais importante do que o tratamento devido às restrições associadas ao tratamento e ao seu alto custo. Além disso, as medidas de controle individuais apresentam pouco impacto na epidemiologia da doença, uma vez que uma alta proporção da população canina nunca será afetada por tais medidas (ou seja, uma grande proporção de cães errantes, semi-domiciliados e canídeos selvagens). Antes de escolher qualquer opção de controle, é importante considerar alguns fatores como o padrão epidemiológico da região alvo, se a infecção ocorre em padrões esporádicos, enzoóticos ou padrões hiperzoóticos e o impacto da LVC na saúde humana na área alvo (Gharbi et al., 2015).

Em 2016, em Nota Técnica conjunta, nº 001/2016, os Ministérios da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e da Saúde (MS) autorizaram o registro do produto Milteforan[®], principal droga utilizada no tratamento da LVC na Europa e que não é utilizada no tratamento da doença humana no Brasil. No entanto, o Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), adverte para as consequências da incorporação da miltefosina como tratamento no Sistema Único de Saúde para a Leishmaniose Tegumentar (LT) humana. O princípio ativo é o mesmo do único medicamento autorizado no país para o tratamento da Leishmaniose Visceral Canina (LVC), e a adoção da substância no tratamento de humanos pode impactar diretamente no registro da droga para uso veterinário (CFMV, 2018). A miltefosina é administrada em cães por via oral (2 mg/kg uma vez por dia por um mês) em associação com alopurinol (Farca et al., 2012). No entanto estudos têm mostrado que *L. infantum* desenvolve rapidamente resistência à miltefosina (Choudhury et al., 2008; Mondelaers et al., 2016).

Desta forma, ainda há necessidade de desenvolvimento de protocolos para o tratamento de cães que não incluam drogas utilizadas para o tratamento de casos de LV humana. Um fator importante é a capacidade e/ou a vontade do proprietário de cumprir o protocolo de tratamento. Em primeiro lugar, as funções do rim e do fígado do cão devem ser investigadas, se estes forem afetados, a eutanásia é indicada. Cada animal tratado deve usar um colar inseticida durante a estação da atividade vetorial para evitar a reinfecção e abolir o papel do cão como reservatório (Gharbi et al., 2015). Uma vez que uma pequena população de parasitos

permanecerá em todos os cães tratados, o monitoramento sorológico e clínico deve continuar durante toda a vida do animal (Gharbi et al., 2015).

Apesar da sua importância na medicina veterinária, a vacinação contra a LVC só entrou em operação durante a última década (Otranto e Dantas, 2013). A Leishmune® é uma vacina de segunda geração que utiliza a subunidade fucosemanose ligante (FML), foi licenciada no Brasil em 2003 para proteger cães contra leishmaniose visceral e sua eficácia contra o parasito foi de 76%, com uma taxa de proteção de 92%, mas o Ministério da Saúde brasileiro não adotou a Leishmune® como uma ferramenta para prevenir a leishmaniose em caninos, por não atender completamente os requisitos para estudos de fase 3, que deveriam comprovar a sua eficácia. (Wylie et al., 2014). A vacina Leish-Tec® contém antígeno A2 recombinante de amastigotas de *Leishmania* e usa saponina como adjuvante, foi licenciada em 2008, faltando ainda evidências que confirmem a eficácia desta vacina comercial (Wylie et al., 2014). Outra vacina é a Canileish® (LiESP/QA-21) que foi licenciada em vários países europeus em 2011. Ela contém um sobrenadante de cultura de promastigotas de *L. infantum* (LiESAp), constituído por uma proteína excretada de 54-kilodalton (kDa) de *L. infantum* com dipeptídeo muramil (MDP), sendo a eficácia desta vacina contra *L. infantum* de 68,4%, com uma taxa de proteção de 92,7% (Wylie et al., 2014). Após a exposição à infecção natural por *L. infantum*, a probabilidade de os cães vacinados serem PCR positivos era semelhante à dos cães em um grupo controle, mas entre os cães com PCR, a probabilidade de voltar a um estado negativo da PCR foi maior nos vacinados do que no grupo de animais de controle (Wylie et al., 2014; Oliva et al., 2014).

Em áreas endêmicas, um dos métodos utilizados no controle da transmissão é a realização de triagem em massa e eutanásia dos cães infectados (Brasil, 2014). No entanto, o programa de controle brasileiro não conseguiu controlar a enfermidade através da eutanásia dos cães infectados, uma vez que um modelo matemático mostrou que essa falha se deve à alta incidência e à gravidade da infecção entre a população de cães, a baixa sensibilidade do teste de diagnóstico e os atrasos no tempo entre o diagnóstico e a eutanásia (Courtenay et al., 2002). Além disso, para um efetivo controle outras medidas deveriam ser associadas como, por exemplo, o uso de coleiras impregnadas com inseticidas, a posse responsável, o manejo ambiental e limpeza do peridomicílio evitando a aproximação de animais reservatórios silvestres e vetores, assim como o controle vetorial (Sevá et al., 2016).

O uso de deltametrina em coleiras inseticidas reduz o risco de infecção por cães nas regiões endêmicas. Manzillo e colaboradores (2006) realizaram um estudo de campo durante dois anos sobre cães errantes em canis em áreas onde a LVC é altamente endêmica. Esses autores mostraram que os sinais clínicos de LVC ocorreram significativamente mais frequentes (90% contra 36%) em cães que não usaram coleira do que em cães que a utilizaram e que a infecção progrediu mais rapidamente naqueles que não fizeram o uso. Mas, na ausência de outros inseticidas efetivos, a resistência à deltametrina poderá emergir eventualmente.

O controle vetorial é um desafio quando se trata de flebotomíneos, uma vez que os abrigos dos estádios imaturos são difíceis de identificar e as imagos estão espalhadas por um vasto ambiente. Drenagem ou o tratamento de água parada não são eficazes no controle destes vetores, visto que as formas imaturas não são aquáticas (Gharbi et al., 2015).

As recomendações para conseguir bons resultados no controle dos flebotomíneos são dependentes de estudos epidemiológicos e entomológicos em cada localidade, juntamente com o controle químico realizado nas áreas de transmissão e no período em que a população de flebotomíneos tende a crescer (Brasil, 2014). Medidas ambientais também são importantes no combate ao vetor, como limpeza de terrenos e do peridomicílio, evitando-se o acúmulo de material orgânico e, conseqüentemente a reprodução de flebotomíneos. Assim como a educação em saúde que é uma medida fundamental para que haja a conscientização da população (Pirajá e Lucheis, 2014).

1.2.5 Imunopatogenia

O modelo murino de leishmaniose por infecção experimental de *Leishmania major* foi o primeiro modelo em que a dicotomia T helper 1 e 2 foi estudada e mostrou-se associada à resistência e susceptibilidade a uma doença infecciosa (Scott et al., 1988). Atualmente é amplamente aceito que a imunidade protetora contra os parasitos de *Leishmania* spp é mediada por respostas imunes de tipo 1 (McMahon-Pratt et al., 2004). No entanto, a infecção de linhagens de camundongos consanguíneos de *L. major*-susceptíveis com o parasito visceralizante *L. donovani*, manifestou um padrão misto de citocinas Th1 e Th2, resultando em resistência (Miralles et al., 1994).

Além disso, os pesquisadores não conseguiram associar claramente uma resposta Th2 com não-cicatrização, reativação ou leishmaniose sistêmica em seres humanos. Curiosamente, a gravidade da leishmaniose visceral humana (LVH) não foi associada com níveis aumentados de IL-4, mas de IL-10, que também foi detectada no baço de pacientes infectados (Kenney et al., 1998). Da mesma forma, níveis elevados de IFN- γ foram encontrados em biópsias de baço, linfonodos e medula óssea de indivíduos infectados (Karp et al., 1993; Ghalib et al., 1993; Kenney et al., 1998), indicando que um prognóstico da doença desfavorável em humanos não está relacionado a um defeito na resposta Th1, mas sim a uma expressão simultânea da citocina IL-10. A IL-10 pode ser produzida por macrófagos, e por células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ (Treg) de ocorrência natural em lesões de camundongos C57BL/6 infectados com grande dose de *L. major*. Esta citocina parece ser responsável pela supressão da imunidade Th1 específica a *Leishmania* e pela prevenção da cura estéril neste modelo (Belkaid et al., 2001).

Compreender a resposta imune celular dos cães infectados com parasitos de *Leishmania* é crucial para o desenho e desenvolvimento de vacinas. Também será fundamental na descoberta de modalidades de tratamento eficientes que podem diminuir a prevalência da LVC. A expressão do RNAm de IL-4 foi encontrada na medula óssea de alguns cães sintomáticos (Quinnell et al., 2001), e foi significativamente maior a expressão de IL-4 em lesões de pele de cães infectados com *L. infantum* (Brachelente et al., 2005). A expressão de IFN- γ em lesões cutâneas e na medula óssea de cães infectados mostrou-se elevada (Brachelente et al., 2005; Chamizo et al., 2005; Quinnell et al., 2001; Strauss-Ayali et al., 2005).

O papel crítico das quimiocinas e seus receptores no desenvolvimento da imunidade contra uma grande variedade de agentes patogênicos tornou-se um foco de interesse nos últimos anos (Brenier-Pinchart et al., 2001; Teixeira et al., 2006). As quimiocinas são muitas vezes induzidas diferencialmente em resposta a vários estímulos ou agentes patogênicos como reflexo de sua variada habilidade para ativar células T e macrófagos, influenciar a diferenciação de células T e recrutar células efetoras adequadas ao local da inflamação (Rollins, 1997; Mantovani, 1999). O envolvimento de quimiocinas na leishmaniose foi investigado principalmente usando modelos murinos de leishmaniose (Cotterell et al., 1999; Rousseau et al., 2001; Zaph e Scott, 2003). Alguns estudos examinaram as respostas das quimiocinas localmente na pele ou nas células mononucleares do sangue periférico em humanos com leishmaniose (Hailu et al., 2004; Ritter et al., 1996), destacando

que as quimiocinas são responsáveis pelo recrutamento de macrófagos e células T em leishmaniose cutânea e visceral.

Em cães, tem sido descrito o acometimento de linfonodos, fígado, baço, medula óssea além de sistema nervoso central e órgãos genito-urinários (Oliveira et al., 2012; Melo et al., 2013; Oliveira et al., 2013; Mendes et al., 2014). A resposta imunológica em cães apresenta dois perfis, o perfil de células Th1 e Th2 (Chamizo et al., 2005). No perfil Th1 observa-se a expressão de citocinas como TNF- α , IFN- γ e IL-2, além da ativação da ação microbicida de macrófagos e produção de óxido nítrico que agem no controle da carga parasitária estando associado à resistência a infecção observada principalmente em cães assintomáticos (Pinelli et al., 1994; Manna et al., 2012). No entanto em cães sintomáticos, onde pode ser observada a progressão da doença, há o marcante perfil de resposta Th2, associado à suscetibilidade a infecção (Reiner e Locksley, 1995). Durante o desenvolvimento da resposta Th2 há a expressão de citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β além de uma marcada produção de imunoglobulinas e imunossupressão, não sendo esta resposta humoral eficaz contra o parasito intracelular, favorecendo sua replicação e aumento da carga parasitária (Rodríguez-Cortés et al., 2016). Além disso, cães sintomáticos apresentam alto parasitismo tissular, sendo fonte do parasito para o inseto vetor (Silva et al., 2016). O papel do Th17 na imunopatologia da LVC foi recentemente demonstrado (Hosein et al., 2015). Os autores observaram uma redução nas células Th17 acompanhada de progressão da doença, o que sugere a importância dessas células no controle da carga do parasito. Além disso, a redução da expressão de IL17A na LVC foi correlacionada com a expressão reduzida de IFN- γ e iNOS. Nascimento e colaboradores (2015) sugeriram que uma resposta mista de Th1/Th17 pode desempenhar um papel na restrição do crescimento do parasito através da ativação do iNOS e melhorar a resistência dos cães à LVC.

Os cães apresentam alterações clínicas, patológicas e imunológicas semelhantes as que são observadas em humanos, como febre, hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia e hiperglobulinemia e por isso têm sido um ótimo modelo para fornecer conhecimento sobre a imunopatologia da LV tanto humana como canina (Porrozzi et al., 2014). É importante destacar que a aplicação de cães como modelo de estudo para o entendimento da imunopatologia da LV fornece a possibilidade de estudar a infecção em modelo natural, que apresenta influência do meio ambiente, como demais co-infecções e desnutrição abrangendo assim vários aspectos imunológicos da infecção (Moreno e Alvar, 2002; Goto e

Lindoso 2004; Alves et al., 2010). Além dos sintomas, as condições ambientais, a idade e o estado nutricional são fatores que influenciam a intensidade da infecção do indivíduo (Caldas et al., 2002; Bern et al., 2007).

Em relação à resposta imune celular nos linfonodos, Alves e colaboradores (2009) descreveram que animais assintomáticos apresentaram maior expressão de IFN- γ , IL-12 e TNF- α , que são citocinas envolvidas na resposta imune mediada por células e eficazes para o controle da carga parasitária. Nestes mesmos animais, a carga parasitária foi menor quando comparada aos animais sintomáticos, nos quais a expressão de IL-10 foi maior, inclusive quando comparada ao grupo controle. Esses dados juntos reforçam a hipótese de que nos linfonodos a resposta imune celular efetora está diretamente envolvida no controle da carga parasitária e na progressão ou não da doença.

1.3 O baço

1.3.1 Anatomia esplênica

O baço possui como localização o hipocôndrio esquerdo da cavidade abdominal, ao longo da curvatura maior do estômago, na camada superficial do omento maior, apresenta textura maciça e é um órgão com intensa vascularização, de coloração vermelho vivo ou violáceo, tendo formato alongado e curvilíneo e tamanho variável dependendo da espécie (Mebius e Kraal, 2005). Ademais, este órgão é envolto por uma camada de tecido conectivo, formando ramificações por dentro da polpa vermelha, desenvolvendo as estruturas trabeculares que dão sustento ao tecido altamente vascularizado. Os ramos de menor calibre da artéria aferente são envoltos por tecido linfóide que formam a polpa branca esplênica. Os ramos das artérias podem passar ao longo da polpa branca e chegar à polpa vermelha, formando o sistema de vascularização da polpa vermelha (Mebius e Kraal, 2005). O baço também possui uma matriz extracelular altamente especializada que forma o sustento estrutural deste órgão (Mebius e Kraal, 2005; Lokmic et al., 2008).

O parenquima deste órgão é anatômica e funcionalmente dividido em polpa vermelha e polpa branca. A polpa vermelha é composta por sinusóides capilares, células estromais, hemácias, macrófagos e células dendríticas (DC), que

colaboram no processo de filtração do sangue, destruição de eritrócitos e eliminação de imunocomplexos através do sistema venoso ricamente distribuído por todo tecido esplênico (Mebius e Kraal, 2005; Lokmic et al., 2008; Abbas, 2011). O baço também é dividido em polpa branca, estrutura compartimentalizada em zona de células T ou bainha linfóide periarteriolar (PALS), região de células B, centro germinativo rico em linfócitos B plasmocitóides e zona marginal. Vale ressaltar a presença da arteríola folicular, uma ramificação da arteríola central que por sua vez se origina da ramificação da artéria trabecular (Mebius e Kraal, 2005; Lokmic et al., 2008; Abbas, 2011). Os dois compartimentos funcionais esplênicos não divergem somente no quantitativo de células, mas também pela constituição da matriz extracelular, estrutura que gera sustentação aos diferentes compartimentos esplênicos. As fibras reticulares da polpa vermelha possuem diâmetro menor do que as fibras reticulares da polpa branca (30-50nm, 1-2 µm respectivamente) (Mebius e Kraal, 2005). A polpa vermelha também é formada por componentes da membrana basal como colágeno IV, perlecan, nidogênio e laminina. Além dessa membrana basal há a membrana microfibrilar composta por fibrilina 2 e colágeno IV. Estes constituintes da matriz extracelular da polpa vermelha colaboram para a função de retenção de eritrócitos (Lokmic et al., 2008). A polpa vermelha apresenta função complementar à polpa branca, porém esta diverge na sua composição de matriz extracelular. A polpa branca é isolada da polpa vermelha pela zona marginal, composta por membrana basal contendo redes de fibras reticulares grossas e densas. É possível observar na zona marginal linfócitos T e B além de macrófagos e células dendríticas (Lokmic et al., 2008).

A polpa vermelha é a zona de maior extensão no baço e nela estão localizadas diversas células, vasos e estruturas como as trabéculas. Na polpa vermelha ocorre a filtração do sangue a partir da remoção de antígenos, debris celulares, assim como eritrócitos senescentes (Cesta, 2006). A estrutura da polpa vermelha apresenta uma forma de árvore composto por cordas e sinusóides. Ademais, as cordas esplênicas na região da polpa vermelha estabelecem o sustento estrutural composto por fibras reticulares tais como microfibrilas, fibras de colágeno, elastina entre outras proteínas, células reticulares como os miofibroblastos e fibroblastos, macrófagos e células dendríticas que estão presentes na membrana intersticial (Saito et al., 1988; Cesta, 2006). Ainda que o baço seja altamente compartimentalizado, cada compartimento, seja a polpa vermelha ou polpa branca, não apresenta somente função individualizada, mas também complementar. A polpa vermelha apresenta

função na filtração do sangue arterial que chega a essa região após saírem da arteríola central chegando à polpa vermelha através das cordas esplênicas, um sistema aberto formado por fibroblastos e redes reticulares, formando um sistema sem a presença de tecido endotelial, onde a presença dessas redes reticulares cria uma pressão na região das cordas, de modo que o sangue fique retido neste local que por sua vez é rico em macrófagos e DCs e desta forma o sangue é filtrado. Depois desse processo de filtração, o sangue filtrado entra nos seios venosos onde migra para o sistema de circulação sanguínea corporal. Macrófagos ou células dendríticas infectados tendem a permanecer no baço (Saito et al., 1988; Mebius e Kraal, 2005; Cesta, 2006).

O baço é um órgão linfóide secundário que apresenta vasta diversidade celular e microambiente altamente compartimentalizado. Neste órgão é o local de início da resposta imunológica adaptativa frente a patógenos recolhidos do sangue e possui função na hematopoiese e na hemocaterese. Este órgão alberga as células necessárias para o desenvolvimento da resposta imune, segregadas em áreas específicas e regiões de interação e apresentação antigênica (Santana et al., 2008; Mebius e Kraal, 2005). É um órgão que possui grande vascularização que tem como função central a eliminação de células senescentes, eritrócitos e partículas como, por exemplo, imunocomplexos e microorganismos opsonizados. A função do baço juntamente com a sua estrutura tecidual altamente compartimentalizada confere a característica de órgão fundamental para o desenvolvimento da imunidade reativa contra diversos microorganismos presentes no sangue (Mebius e Kraal, 2005).

Mebius e Kraal (2005) mostraram que a contínua migração de células hematopoiéticas oriundas do sangue em direção aos órgãos linfóides secundários é um eficiente caminho para a captura de antígenos e patógenos, destacando a importância da zona marginal, relatando que a mesma é um local importante de transição para o sangue que sai da corrente sanguínea para entrar na polpa branca. A zona marginal possui contato íntimo com a polpa vermelha e a PALS na polpa branca, havendo importância deste contato para o processamento e apresentação de antígenos (Kuper et al., 2002; Mebius e Kraal, 2005; Cesta, 2006). A zona marginal possui uma vasta gama de células especializadas na apresentação antigênica, como macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. Uma característica que diverge os linfócitos B da zona marginal dos linfócitos B do centro germinativo e polpa branca é o seu fenótipo IgM+/IgD-. Os macrófagos da zona marginal expressam o receptor MARCO, um receptor para colágeno. Este receptor é

empregado para reter os linfócitos B dentro da zona marginal. Porém, na zona marginal a expressão de receptores S1P1 e S1P3 para esfingosina-1-fosfato é maior do que noutras regiões. Tais receptores nos linfonodos têm sido implicados na migração de linfócitos T. Eles são altamente expressos no baço por linfócitos B IgM+ /IgD-, propondo que tal linfócito possa circular entre a polpa vermelha e a polpa branca especialmente para a região de linfócitos B dentro do folículo (Chen et al., 2005; Mebius e Kraal, 2005).

Outra estrutura esplênica apresenta distintas compartimentalizações divergindo da polpa vermelha e da zona marginal, denominada como polpa branca. Este nome é devido ao acúmulo de células brancas (leucócitos), principalmente linfócitos B e T. Nos folículos, os linfócitos B se diferenciam em plasmocitóides, células especializadas em expressão de anticorpos no seu citoplasma. As células plasmocitóides possuem citoplasma com coloração diversa quando comparados aos demais linfócitos, formando assim na polpa branca um anel com coloração arroxeadada quando observadas nos cortes corados com hematoxilina e eosina. A polpa branca possui compartimentalização na região da PALS que está localizada em torno da arteríola central, região de folículo de linfócitos B e centro germinativo (Mebius e Kraal, 2005). A polpa branca esplênica tem seus compartimentos preservados pela expressão de quimiocinas como CXCL13 (ligante do receptor CXCR5) fundamental para a migração e chegada de linfócitos B na área folicular, e quimiocinas CCL19 e CCL21 (ligantes do receptor CCR7) importantes para a migração e manutenção dos linfócitos T e células dendríticas na região da PALS da polpa branca. Estas quimiocinas são expressas pelas células estromais presentes no baço (Mebius e Kraal, 2005; Manzo et al., 2007; Bekiaris et al., 2009). Na região PALS há subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (Steiniger et al., 2006). A forma e a disposição de cada compartimento da polpa branca são diferentes para cada espécie analisada. Resumidamente, é constituída por uma arteríola central que é delimitada por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, fibroblastos reticulares (FRCs), células dendríticas e macrófagos, assim como os linfócitos B que se organizam como um anel em volta do centro germinativo e, por fim, a zona marginal que delimita todo o folículo/polpa branca (Steiniger et al., 2015). Outra estrutura de grande relevância para a manutenção dos compartimentos da polpa branca esplênica é o sistema de conduítes. É formado pela membrana basal, camada microfibrilar, colágeno IV e fibroblastos reticulares (Lokmic et al., 2008). Diversos autores sugerem a presença desta estrutura somente na polpa branca. Esse sistema participa da distribuição das

quimiocinas e também auxilia na migração dos linfócitos e demais células, visto que os fibroblastos que revestem estas estruturas interagem com linfócitos e células apresentadoras de antígenos sendo popularmente conhecido como “corrimão” para a migração celular (Lokmic et al., 2008; Gretz et al., 2000; Steiniger et al., 2015).

1.3.2 O baço na LVC

Como descrito anteriormente, o baço é um dos principais órgãos acometidos na LV tanto canina como humana. Ademais, este órgão apresenta importante papel no desenvolvimento da resposta imune celular. A desorganização da matriz extracelular esplênica na LVC tem sido descrita na literatura (Strauss-Ayali et al., 2007; Lokmic et al., 2008; Santana et al., 2008; Lima et al., 2014; Cavalcanti et al., 2015). Ao longo do processo infeccioso, a matriz extracelular (MEC) esplênica sofre intenso processo de remodelamento onde seus componentes estruturais como laminina, fibronectina e colágeno são degradados por metaloproteinases e collagenases, por exemplo, MMP-2, MMP-9 e ADAM-10 e, macrófagos, fibroblastos, linfócitos e células endoteliais são as células predominantes que expressam tais enzimas (Hopps e Caimi, 2012). Desta forma, já foram descritos altos níveis de MMP-9 e MMP-2 no soro de cães infectados por *Leishmania (L.) infantum* (Melo et al., 2011; Oliveira et al., 2013).

Ao longo do processo infeccioso é essencial a migração de células para o sítio acometido. Nessa acepção, a matriz extracelular esplênica gera suporte para a migração celular. A matriz extracelular é um componente altamente dinâmico, que contribui na apresentação antigênica e na montagem de sítios para a infiltração celular e formação de granulomas, resposta imune celular eficiente na eliminação do parasito intracelular. O granuloma é composto por macrófagos infectados e ativados que são envolvidos por outros macrófagos não infectados, fibroblastos e proteínas como fibras colágenas e outras substâncias do tecido conjuntivo (Lemos, 2010). Podem ocorrer na MEC diversos processos dinâmicos, que podem resultar na degradação dos seus componentes que constituem a membrana basal e intersticial. Ademais da degradação, a inflamação geraria o estímulo para a deposição destes mesmos componentes e resultaria no remodelamento da matriz extracelular esplênica, podendo haver alteração da microarquitetura do baço e resultando na alteração dos compartimentos da polpa branca, polpa vermelha e zona marginal

gerando o aspecto microscópico de desorganização da polpa branca do baço (Lu et al., 2011).

1.3.3 Desorganização esplênica e falha no controle da carga parasitária

Tem sido relatada a desorganização da polpa branca esplênica em cães naturalmente infectados (Santana et al., 2008; Silva et al., 2012; Lima et al., 2014; Cavalcanti et al., 2015). Todavia, sabe-se pouco sobre o período em que tem início a desorganização, se ocorre no princípio do processo infeccioso, ou se ocorre em uma etapa avançada da infecção. Ainda não se tem conhecimento se esta desorganização é provocada diretamente pelo parasito ou pela resposta imune gerada, onde as moléculas de matriz extracelular sofrem modificações na sua deposição ao longo deste processo. A manutenção da microarquitetura esplênica e de suas áreas de segregação apresenta importância para a ativação de linfócitos efetores e de uma resposta imune ativa (Reis et al., 2009; Rodríguez-Cortés et al., 2016).

No que diz respeito à deposição dos componentes da matriz extracelular, tem sido relatada a deposição de fibronectina, laminina e colágeno no fígado de cães infectados (Melo et al., 2009; Kulkarni et al., 2011; Silva et al., 2013). O colágeno tem sido considerado o maior componente da MEC envolvido neste processo. Houve correlação positiva entre a deposição de laminina e fibronectina com a carga parasitária. A degradação de laminina e fibronectina fornece fragmentos com domínios de interconexão que ao se ligarem aos macrófagos podem reduzir a sua atividade, e também podem aumentar a capacidade de infecção de novas células (Kulkarni et al., 2011; Melo et al., 2009; Silva et al., 2013). Devido à redução da atividade de macrófagos pode haver a diminuição da expressão de IFN- γ , IL-12 e TNF- β prejudicando diretamente a resposta imune celular do tipo Th1. A deposição de laminina e fibronectina correlacionada com a carga parasitária obteve correlação positiva no fígado, sendo descrita por Melo e colaboradores (2009) e pode ser justificada pela diminuição da atividade de macrófagos. Assim, a existência de macrófagos M2 no baço de cães naturalmente infectados já foi relatada (Moreira et al., 2016). Macrófagos que são estimulados em presença de PAMPs ou DAMPs (Padrões moleculares associados a patógenos) e em meios com a predominância de citocinas expressas por linfócitos do tipo Th1, quando ativados expressam citocinas deste perfil imunológico sendo agrupados como M1 (Aggarwal et al., 2014).

Igualmente ocorre para macrófagos M2 que são ativados em presença de citocinas do perfil Th2 e atualmente tem sido demonstrado que macrófagos M17 ativados em presença de IL-17, apresentam função regulatória (Gordon e Martinez, 2010; Konttinen et al., 2014). Estudos em infecção experimental e natural em caninos com *L. infantum*, têm relatado a capacidade destes animais em fornecer uma resposta inicial pró-inflamatória com expressão de IFN- γ , entretanto ainda assim o parasito sobrevive ao ambiente inflamatório e persiste no organismo dos cães (Strauss-Ayali et al, 2007; Quinnell et al., 2001).

Tem sido descrito que no baço há a presença de processo inflamatório crônico em regiões como polpa vermelha, polpa branca e região de cápsula, bem como a diminuição da quantidade celular em torno da arteríola central, região conhecida como PALS onde se concentram os linfócitos T (Silva et al., 2013). Foi relatado que em cães infectados por *L. infantum* há redução das regiões de linfócitos T, a baixa formação de granuloma, a hipertrofia da polpa branca e vermelha e acentuado processo inflamatório na região de cápsula (Santana et al., 2008). Porém, somente a deposição de colágeno mostrou correlação positiva com o aumento da carga parasitária (Silva et al., 2013). Não obstante, a LV é apontada como uma doença inflamatória de caráter crônico com intensa formação de fibrose (Silva et al., 2013). Já é sabido que durante o processo inflamatório há o remodelamento da matriz extracelular do baço. Entretanto, não se sabe em que momento o processo inflamatório influencia o remodelamento da matriz extracelular esplênica fazendo com que haja a perda da homeostase desta matriz, alteração na agregação natural dos seus componentes levando a desorganização do tecido esplênico. Pergunta-se também qual seria o impacto desta desorganização na mediação da resposta imune das células, visto que para o desenvolvimento desta é necessária a adequada compartimentalização da polpa branca do baço. Cavalcanti e colaboradores (2015) relataram o aumento correlacionado da carga parasitária e a ruptura da polpa branca esplênica, evidenciando que tais processos podem ser complementares e que há falha no controle da carga parasitária. Ademais, os autores mostram um possível processo de imunossupressão provocado pela redução de diversas citocinas tanto do fenótipo celular Th1, IFN- γ , IL-12, TNF e IL-6 perfil pró-inflamatório, quanto do fenótipo Th2, TGF- β e IL-10 perfil anti-inflamatório/regulatório.

Outras pesquisas relatam o envolvimento da LV com a desorganização dos compartimentos esplênicos e atrofia, redução da expressão de mRNA de quimiocinas como CXCL13 e CCL19, principais quimiocinas para a manutenção das

áreas de linfócitos B e T nas regiões da polpa branca do baço (Silva et al., 2012). Também tem sido descrita a depleção de linfócitos T CD4⁺ quando comparados os animais assintomáticos com animais sintomáticos e grupos controle. A depleção de linfócitos, redução na expressão de citocinas e quimiocinas são alterações compatíveis com a exaustão celular.

1.4 Exaustão celular

As moléculas de coestimulação são glicoproteínas fundamentais na comunicação dos linfócitos T com as outras células do sistema imune. O modelo de coestimulação foi descrito por Lafferty et al, em meados da década de 70 (Lafferty e Cunningham, 1975), quando foi demonstrado que o processo de ativação das células T requeria dois sinais, um inicial de alta especificidade, mediada pelo reconhecimento de um antígeno através do receptor da célula T (TCR) no contexto do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e de um segundo sinal, também chamado coestimulador, que permitia a expansão clonal e o desenvolvimento de uma resposta efetora específica.

Uma molécula coestimuladora define-se como aquela molécula de superfície que por si mesma não é capaz de ativar funcionalmente as células T, mas que é capaz de amplificar ou reduzir de forma significativa a sinalização induzida pelo complexo do TCR. O PD-1 (do inglês, *Programmed cell death protein 1*) é uma molécula de coestimulação que dá um sinal inibidor, é um importante regulador negativo da ativação das células T e participa na manutenção da tolerância periférica (Okakazi et al., 2006; Parry et al., 2005). Foi descoberto em 1992 por sua alta expressão durante a apoptose em um modelo de hibridoma de células T (Ishida et al., 1992), sendo expressa em células T e B ativadas e em timócitos (Liang et al., 2003).

O PD-1 é uma proteína de 288 aminoácidos composta por um domínio globular extracelular, um domínio transmembranar e um domínio intracelular de aproximadamente 95 aminoácidos que contém um motivador de inibição do imunorreceptor baseado na tirosina (ITIM) e um motivador de mudança do imunorreceptor baseado na tirosina (ITSM) que permite a união de moléculas adaptadoras com domínios SH2 como a proteína IA com domínio SH2 (SH2DIA) (Okazaki et al., 2013). Foram descritos dois ligantes: PD-L1 e PD-L2 (também

denominados B7-H1 e B7-DC, respectivamente), ambos são glicoproteínas transmembranais tipo I com domínios extracelulares tipo IgC e IgV. O PD-L1 consta de 290 aminoácidos codificados pelo gene Cd274 localizado no cromossoma 9 em humanos e no 19 em murinos; PD-L2 codifica-se no gene Pcdcl1g2 adjacente ao gene Cd274 (Freeman et al, 2000; Ishida et al., 2002; Latchman et al., 2001).

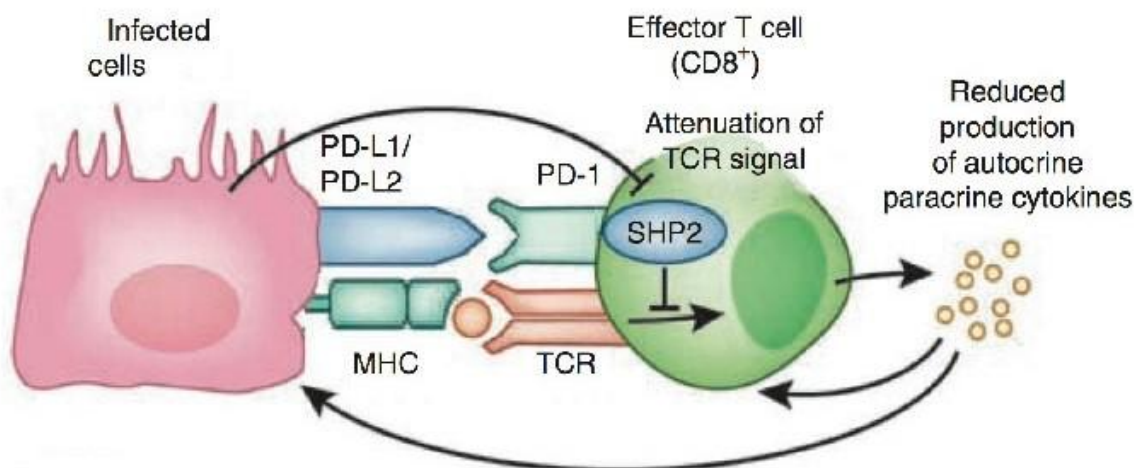


Figura 3 - Papel da via PD-1 e seus ligantes na exaustão celular. Adaptado de Okazaki, 2013.

Uma vasta gama de tecidos expressa normalmente os transcritos de ambos ligantes, com elevados níveis de expressão na placenta, coração, pulmão e fígado e são observados baixos níveis de expressão no baço, linfonodos e timo; sem expressão destes no cérebro (Freeman et al., 2000; Carter et al., 2002; Dong et al., 1999; Tseng et al., 2001). Contudo, a quantidade destes transcritos nem sempre está correlacionada com a quantidade das suas proteínas, especialmente da proteína de PD-L2 que se detecta raramente em condições normais em órgãos não linfoides, o que sugere uma regulação postranscricional da mesma (Latchman et al., 2001).

A expressão de PD-L1, tanto em tecidos linfoides como em não linfoides, sugere que a via PD-1/PD-L1 pode modular as respostas imunes seja em órgãos linfoides secundários como nos órgãos alvos (Goldberg et al., 2007). A expressão dos ligantes do PD-1 já foi avaliada em modelos murinos, e de acordo com os dados relatados, o PD-L1 expressa-se constitutivamente em células B e T, em macrófagos e DCs. A expressão do PD-L1 é regulada em resposta a vários estímulos como anticorpos anti-IgM, anti-CD40, anti-CD3, LPS, IFN- γ , IL-4, IL-12 e fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (Loke e Allison, 2003; Agata et

al., 1996; Yamazaki et al., 2002). O PD-L2 é expresso em raras ocasiões nas células em repouso, porém, é induzido nas células T, B, nos macrófagos e nas células dendríticas (Loke e Allison, 2003; Agata et al., 1996; Yamazaki et al., 2002; Brown et al., 2003).

A molécula PD-1 ao interagir com seus ligantes envia sinais intracelulares que se traduzem na diminuição da produção de citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-2 (Figura 3), da proliferação, da diferenciação e sobrevivência celular pela inibição antecipada dos sinais de ativação através de CD28 ou de maneira indireta, por meio de IL-2. Ambos, o CD28 e a IL-2 promovem a expansão e sobrevivência natural através de efeitos anti-apoptóticos sobre o ciclo celular e sobre a ativação dos genes de citocinas (Carter et al., 2002).

Alguns micro-organismos que causam infecções crônicas desenvolveram sofisticados mecanismos para evadir a resposta imune do hospedeiro favorecendo assim, a persistência da infecção. Um mecanismo mediante o qual consegue esta evasão da resposta imune é através da via PD-1/PD-L (Hofmeyer et al., 2011). A infecção por vírus de coriomeningite linfocítica em modelo murino de infecção experimental demonstrou, pela primeira vez, a deficiência na resposta efetora das células T vírus-específicas, para gerar uma resposta antiviral eficiente (Barber et al., 2006; Wherry et al., 2004). A exaustão das células T caracteriza-se por uma perda gradual das funções efetoras, entre elas a baixa produção de TNF- α e IFN- γ , a diminuição na proliferação e na citotoxicidade (Martinic e Von Herrath, 2008).

O uso de antagonistas da via PD-1/PD-L vinculou-se com a restauração da resposta citotóxica mediada pelas células T CD8, incluindo a capacidade proliferativa, a produção de citocinas (IFN- γ TNF- α) e uma maior capacidade para controlar a replicação viral (Martinic e Von Herrath, 2008). Em um estudo de infecção viral crônica em camundongos foram identificadas duas subpopulações de células T CD8 exaustas (Blackburn et al., 2008). Um subconjunto de células T CD8 em exaustão é recuperado pelo bloqueio de "PD-L1", enquanto o outro subconjunto aparece mais diferenciado terminalmente e responde mal ao bloqueio de PD-1: PD-L (Blackburn et al., 2008). O estudo funcional desta e outras vias de controle da resposta imune, mediada pelas células T apresenta grande importância para o entendimento da imunorregulação no controle no curso das infecções crônicas, e seu possível vínculo com o desenvolvimento de doenças de etiologia inflamatória e autoimune. Apresentam também implicações para prever as respostas clínicas às

intervenções terapêuticas baseadas em PD-1 e para a compreensão da dinâmica das células T durante infecções persistentes.

O CTLA-4 (do inglês, *Cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) é um membro da superfamília das imunoglobulinas e é expressa por células T ativadas juntamente com a proteína co-estimuladora CD28 das células T. Ambas as moléculas se ligam ao CD80 e CD86 nas DCs, mas CTLA-4 se liga com maior afinidade e avidéz do que a CD28. Enquanto CD28 transmite um sinal estimulador (Harding et al., 1992), CTLA-4 é capaz de superar o CD28 para CD80 e CD86 para inibir as funções das células T (Krummel e Allison, 1995), onde a expressão de CTLA-4 em células T efetoras é aumentada somente após a ativação de células T mediada pelo TCR e mediada por CD28.

O TIM-3 (do inglês, *T cell immunoglobulin and mucin-containing protein 3*), é uma proteína de membrana do tipo I, e foi identificada inicialmente em células Th1 diferenciadas terminalmente (Monney et al., 2002). A identificação de galectina-9 (Gal-9) como um ligante para TIM-3 estabeleceu a interação Gal-9-TIM-3 como um importante regulador da imunidade Th1 induzindo a apoptose das células Th1 (Zhu et al., 2005; Sánchez-Fueyo et al., 2003). O TIM-3 também é encontrado nas células Th17 e T citotóxicas 1. TIM-3 atua como uma molécula reguladora para suprimir as respostas imunes mediadas por células e promover a tolerância imune (Flecken e Sarobe, 2015). Além de ser encontrado em células T, TIM-3 também é encontrado em células imunes inatas, incluindo mastócitos, macrófagos, DCs e células NK (Flecken e Sarobe, 2015; Freeman et al., 2010). TIM-3 não serve apenas como marcador de ativação celular ou maturação, mas também suprime a citotoxicidade de células NK, visto que um aumento na abundância da superfície celular de TIM-3 em células NK leva a disfunção de células NK durante infecções virais crônicas (Jost et al., 2013; Ju et al., 2010). Portanto, TIM-3 exerce diversos efeitos regulatórios nas células NK em diferentes contextos imunes, envolvendo numerosos processos patológicos e fisiológicos.

O LAG-3 (do inglês, *Lymphocyte-activation gene 3*) também é um membro da superfamília das imunoglobulinas que desempenha um papel crucial na homeostase dos linfócitos. É expresso na superfície de células T e NK ativadas, mas também foi detectado na superfície de células B, células dendríticas, TILs e Tregs (Okamura et al., 2012). Sua sequência é aproximadamente 20% idêntica ao CD4 e a ligação ao MHC-II, com maior afinidade do que o CD4 rege negativamente a função das células T CD4⁺ e CD8⁺, células NK e Tregs (He et al., 2016). Outro ligante de LAG-3 é a

LSECtin que pertence à superfamília do receptor de lectina do tipo C e é altamente expressa nas células do fígado (Liu et al., 2004). No melanoma, LSECtin regula negativamente a resposta específica do tumor mediada por células T LAG-3⁺ por inibição da secreção de IFN- γ (Xu et al., 2014). Um estudo pré-clínico mostrou que o bloqueio de LAG-3 aumentou significativamente a proliferação e função de células T CD4⁺ de uma maneira que dependia da presença de IL-2 e do transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT)-5, onde o bloqueio LAG-3 afetou as células T CD4⁺, promovendo uma diferenciação de Th1 e inibindo a indução de Treg (Durham et al., 2014). Os anticorpos anti-LAG-3 provaram ser efetivos na ativação de efetores T e na resposta imune. Em particular, Burova et al. (2016) mostraram que o tratamento com uma combinação de PD1 anti-humano e LAG-3 anti-humano em ratos (PD-1 x LAG-3 humanizados) aumentou a eficácia antitumoral. Além disso, foram notificados dados farmacocinéticos e de segurança favoráveis para o anticorpo anti-hLAG-3 em macacos (Burova et al., 2016). Além disso, Gray et al. (2016), demonstraram que a adição de anticorpos dirigidos contra fosfatidilserina para a terapia com LAG-3⁺ PD-1 poderia aumentar ainda mais a eficácia da combinação em comparação com tratamentos únicos e combinados (Gray et al., 2016).

O estudo funcional desta e outras vias de controle da resposta imune, apresenta grande importância para o entendimento da imunorregulação no curso das infecções crônicas, e seu possível vínculo com o desenvolvimento de doenças de etiologia inflamatória e autoimune.

1.5 Justificativa

Já é bem conhecido que o cão doméstico apresenta importante papel como reservatório urbano da leishmaniose visceral. Há tempos, diversas estratégias de controle da doença com foco no controle animal vêm sendo analisadas, desenvolvidas e implementadas, inclusive com a produção de vacinas caninas já em comercialização ou mesmo tratamentos diversos. Em longo prazo, a eficácia de qualquer um destes métodos utilizados deverá ser avaliada utilizando como base as informações relacionadas ao sistema imunológico destes animais e sua relação com a resistência à doença e a redução da carga parasitária. Desta forma, conhecer aspectos da imunopatogenia da leishmaniose visceral canina e sua relação com a carga parasitária trará subsídios para o estudo de eficácia de vacinas caninas ou tratamentos alternativos.

A relação com estudos do bloqueio de receptores ou ligantes envolvidos no processo de exaustão (PD-1, CTLA-4, PD-L1, PD-L2, TIM-3, LAG-3) que apresentam potencial para novos meios de imunomodulação, com possível aplicação para os casos graves humanos reforça a relevância do presente estudo. Até o momento não há a descrição de análise de TIM-3 e LAG-3 em cães com leishmaniose visceral. As expressões de PD-1 ou CTLA-4 *in situ* também não foram avaliadas nestes animais, porém em infecção experimental em camundongos, demonstrou-se que o bloqueio da via de exaustão PD-1/B7-H1 levava à redução da carga parasitária, apesar de não mostrar efeitos na expressão de citocinas. A possibilidade de tratamentos alternativos em caninos, que não utilizem medicamentos usados no tratamento humano (proibidos para cães no Brasil), e que levem à redução da carga parasitária a ponto de o cão deixar de servir como fonte de infecção para o flebotomíneo, seria promissor na história da leishmaniose visceral canina e merece ser avaliada.

Além disso, muitos aspectos clínicos e imunológicos na leishmaniose visceral canina se assemelham à leishmaniose visceral humana, e por este motivo, muitos trabalhos consideram o cão como modelo da doença humana. Assim, os dados produzidos neste estudo poderiam ser aplicados ou servir como base para o estudo da leishmaniose visceral humana utilizando o cão como modelo da doença. Neste sentido, não poderíamos descartar a possibilidade de os dados produzidos neste estudo revelarem possíveis alvos para o acompanhamento ou tratamento da leishmaniose visceral humana, cuja expansão e aumento da taxa de letalidade nos

últimos anos têm preocupado às autoridades e agências de saúde (Brasil 2014, WHO 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar marcadores de exaustão no baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*, correlacionando com a avaliação clínica dos animais, com a organização da polpa branca esplênica e com a carga parasitária.

2.2 Específicos

- Realizar análise histopatológica do baço de cães naturalmente infectados levando em consideração a organização do tecido linfoide esplênico.
- Avaliar a carga parasitária tecidual.
- Analisar qualitativamente e quantitativamente, nos diferentes compartimentos do baço (polpa vermelha, zona marginal, bainha linfoide periarteriolar e folículo linfoide), os perfis:
 1. Celular (linfócitos CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺);
 2. Exaustão (CTLA-4, TIM-3, PD-1, PD-L1, PD-L2 e LAG-3);
 3. Funcional/proliferação (IFN- γ , IL-10 e Ki-67):
- Analisar qualitativamente e quantitativamente células em apoptose no baço através da técnica de TUNEL.
- Correlacionar os dados obtidos com o escore clínico, a organização da polpa branca esplênica e a carga parasitária.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Quarenta e um cães provenientes da cidade de Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, com diagnóstico confirmado de leishmaniose visceral e encaminhados para a eutanásia compulsória no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (FIOCRUZ-RJ) foram avaliados. A eutanásia foi realizada pelos médicos veterinários do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO-INI-FIOCRUZ), utilizando 1,0% (1,0 mL/kg) de Thiopental (Thiopentax®, Cristália) intravenoso. Após a detecção de ausência de reflexo córneo, induzido por anestesia profunda, foram administrados 10 mL de cloreto de potássio 19,1% (Isofarma) intravenoso. O material avaliado foi obtido durante a necropsia dos animais, momento em que foram coletadas as amostras do baço e sangue periférico, assim como os dados clínicos.

3.2 Avaliação clínica dos animais

A avaliação clínica foi realizada por dois médicos veterinários, considerando os 6 sinais clínicos típicos da LVC: dermatite, onicogribose, conjuntivite, emagrecimento, alopecia e linfadenopatia. Cada sinal clínico foi avaliado em uma escala variando de 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado) a 3 (grave) pontos segundo Quinnell et al., (2001). A classificação final foi dada pela soma dos pontos obtidos, podendo o animal ter baixo escore clínico (0 a 2 pontos), médio (3 a 6) e alto (7 a 18).

3.3 Aspectos éticos

As amostras biológicas utilizadas neste estudo são oriundas de necropsias realizadas pelo Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO, INI, FIOCRUZ) de cães diagnosticados como leishmaniose visceral e encaminhados para a eutanásia. As amostras foram obtidas de necrópsias, portanto, o presente estudo foi encaminhado para avaliação ética e

segundo orientação do Comitê de Ética em Uso de Animais da Fiocruz e de acordo com a lei brasileira 11794/08 não houve necessidade de aprovação (anexo 3).

3.4 Análise histopatológica

Fragmentos teciduais do baço foram fixados em solução tamponada de formol 10% (Merck, Darmstadt, Alemanha) e inseridos em parafina (Synth, Diadema, Brasil). Cortes com 5 μm de espessura foram afixados em lâminas de microscopia e corados com hematoxilina e eosina (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido) para posterior análise em microscópio óptico (Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Organização do tecido linfóide esplênico da polpa branca, zona marginal e polpa vermelha foram analisados como descrito por Santana et al., (2008). Os parâmetros avaliados foram periesplenite (ausência, pouco, médio, intenso), presença de granulomas (ausência, pouco, médio, intenso) e grau de organização da polpa branca. Neste último caso foi considerada organizada a polpa branca que apresentou bainha periarteriolar, centro germinativo, zona do manto e zona marginal distintos. Pouco desorganizada, aquela com alguma mudança hiperplásica ou hipoplásica levando a perda de definição de alguma das regiões da polpa branca. Moderadamente desorganizadas, aquelas com polpa branca evidente, porém suas regiões são pouco individualizadas ou indistintas. Intensa desorganização quando a estrutura folicular foi pouco distinguível da polpa vermelha e da área de células T. Realizou-se também a quantificação do número de folículos linfóides e número de granulomas por mm^2 de tecido. A avaliação considerou a presença ou ausência e o número de folículos linfóides e granulomas por campo.

3.5 Extração de DNA em tecido esplênico

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

3.6 Determinação da carga parasitária por qPCR

A carga de parasitos foi estimada por PCR em tempo real em amostras de baço como previamente descrito por Cavalcanti e colaboradores (2015). Utilizaram-se iniciadores HPRT (Tabela 1) para normalizar as concentrações de DNA canino em cada amostra. Para quantificar o número de cópias do DNA referente aos parasitos, os iniciadores SSrRNA (Tabela 1) descritos por Prina et al. (2007) foram utilizados para amplificar o gene que codifica o RNA de subunidade menor ribossomal (ssrRNA, multy-copy gene). As reações de qPCR foram realizadas no equipamento Step One (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc., Foster City, EUA) utilizando o sistema de detecção Power Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc., Foster City, EUA). Adicionou-se 2 µL do DNA total purificado (100 ng) a um volume final de reação de PCR de 20 µL contendo Power Sybr Green 1X, 300 nM de cada iniciador para HPRT ou 500 nM para ensaios de PCR de ssrRNA. O qPCR foi realizado com uma etapa de ativação a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação e anelamento/extensão (95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto e 68°C durante 30 segundos). Realizou-se uma curva padrão para cada alvo específico. Todas as reações foram realizadas em duplicata para cada alvo e ambos os alvos foram executados na mesma placa para a mesma amostra.

As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de cães não infectados e culturas em massa de promastigotas de *Leishmania infantum* (MCAN/BR/2007/CG-1) foram determinadas utilizando um contador de células (Z1™ COULTER COUNTER®, Beckman Coulter, Fullerton, EUA). O DNA total foi extraído a partir de $1,0 \times 10^6$ células PBMC e $1,0 \times 10^7$ de promastigotas. As curvas padrão para os genes HPRT e ssrRNA foram preparadas utilizando diluições em série de 10 vezes de 10^{-2} a 10^7 de DNA purificado total. Os animais foram agrupados como carga parasitária alta ou baixa como descrito por Cavalcanti et al., (2015).

Tabela 1: Genes alvos e respectivas sequências utilizados na quantificação da carga parasitária. S, senso; AS, anti-senso, pb, pares de bases.

Gene Alvo	Nº de acesso ou referência		Sequência (5'-3')	Tamanho em pares de bases (pb)
HPRT Alvo canino	NW_003726126.1	S	AAAACAATGCAGACTTTGCT	58
		AS	CCTTGACCATCTTTGGATTA	
SsrRNA Alvo parasita <i>Leishmania infantum</i> (L).	Prina et al. (2007)	S	TACTGGGGCGTCAGAG	153
		AS	GGGTGTCATCGTTTGC	

3.7 Extração do RNA e Quantificação da Expressão Gênica de marcadores de exaustão (PD-1, PD-L1, PD-L2 e LAG-3) por qRT-PCR

O RNA total foi extraído de fragmentos teciduais de baço pelo método Trizol® (Invitrogen, Grand Island, NY) e RNeasy kit (Qiagen), de acordo com protocolo dos fabricantes. O RNA foi quantificado por espectrofotometria em Nanodrop TM 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, EUA) e 2 µg de RNA foram tratados com RNase-free DNase® (Ambion, Grand Island, NY). A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada com High Capacity cDNA Syntesis kit (Applied Biosystems). Como controle de contaminação de DNA genômico, uma alíquota antes da transcrição reversa (no-RT) foi testada para cada amostra com um gene constitutivo.

As reações de qPCR foram realizadas utilizando o sistema Power Sybr Green Master MIX® (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc) no equipamento ViiA 7 (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc). Foram preparadas reações com volume final de 10 µL contendo iniciadores (de acordo com a tabela 2), 5 µL de SYBR 2X e 1µL de cDNA. O ciclo térmico consistiu em uma etapa de ativação a 95°/10 min, seguida de 45 ciclos de desnaturação a 95°C/15 seg e anelamento/extensão a 60°C/1 min. Uma curva de dissociação (95°C/15 seg, 60°C/1

min e 95°C/15 seg) foi realizada para avaliação de amplificação inespecífica. Para os alvos PD-1 e LAG-3 uma etapa de leitura foi adicionada a 80°C e 78°C, respectivamente, logo após a etapa de anelamento/extensão. Os produtos desenhados para este estudo serão ainda sequenciados. A quantificação relativa dos genes de interesse foi determinada pelo método do ddCT (Pfaffl, 2001; Hellemans et al, 2007), onde HPRT e GAPDH (Cavalcanti et al, 2015) foram utilizados como referências. As eficiências foram determinadas experimentalmente por diluições seriais de cDNAs de cão. Todas as reações foram realizadas em duplicata e controles negativos foram incluídos em todos os ensaios.

Tabela 2: Genes alvos e desenho dos iniciadores para cDNA. S, senso; AS, anti-senso, pb, pares de bases.

Gene Alvo	Nº de acesso		Sequência (5'-3')	Tamanho em pares de bases (pb)
HPRT	NW_003726126.1	S	AAAACAATGCAGACTTTGCT	58
		AS	CCTTGACCATCTTTGGATTA	
GAPDH	XM_003434387.2	S	ATGCCCAACATTGGTTATGG	103
		AS	CTCTTTCCACGATGGCTTTG	
PD-1	XM_022409577.1	S	TCCACGAACACTCAGAAGCC	136
		AS	TTCCTACTCCCCTTCAGGCA	
PD-L1	AB_850883.1	S	CCGCCAGCAGGTCACTTC	139
		AS	CCATTGTCACATTGCCACCA	
PD-L2	XM_014117874.2	S	CCTTGAAGTGGTGTGGCAGA	132
		AS	TGCACTCCCAGGCTCAAAT	
LAG-3	XM_005637438.2	S	AGTCATCACAGTACTCCA	132
		AS	GAACCTCGCCAAGACTGCTT	

3.8 Imuno-histoquímica

Fragmentos teciduais do baço foram congelados em resina OCT TissueTek® (Sakura, Alphen aan den Rijn, Holanda). Cortes de baço com 5 µm de espessura foram fixados com acetona P.A. (Merck) em lâminas silanizadas (Dako, Carpinteria, CA, EUA). Hidratou-se em PBS durante 10 minutos, seguido da inibição da peroxidase endógena com solução contendo peróxido de hidrogênio 3% (Dako) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Os cortes foram submetidos a duas lavagens em PBS durante 5 minutos cada. Para a inibição de ligações inespecíficas os cortes foram incubados em solução contendo 0,4% BSA por 20 minutos a temperatura ambiente. O excesso de solução de bloqueio foi descartado e foram adicionados os anticorpos primários para detecção de células CD4⁺ (clone YKIX302.9), CD8⁺ (clone YCATE55.9), CD21⁺ (clone CA2.1D6) (Bio-Rad AbD Serotec, Hercules, EUA), citocinas IFN-γ (clone CC302) e IL-10 (CC318) (Bio-Rad AbD Serotec); proliferação Ki-67 (clone SolA15) (eBioscience, San Diego, EUA) e marcadores de exaustão PD-1 (clone NAT105), LAG-3 (11E3), PD-L1, CTLA-4 (clone BNI3) e TIM-3 (policlonal) (Abcam, Cambridge, Reino Unido) por 18 horas à 4°C. O controle da reação foi realizado pela supressão do anticorpo primário em pelo menos um dos cortes teciduais. Ao término da incubação, foram realizadas 2 lavagens em solução PBS, 5 minutos cada, seguido de incubação com o anticorpo secundário biotilado (Dako) por 25 minutos, e mais 2 lavagens com PBS. Os cortes foram incubados com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase por 25 minutos. Após 2 lavagens com PBS, revelou-se com o kit AEC (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Após a visualização da marcação em microscópio óptico, a reação foi interrompida com água tipo II, e foi feita a contracoloração com hematoxilina de Meyer (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) seguido da montagem em Faramount medium (Dako). Os cortes foram avaliados em microscópio óptico, 5 lâminas por animal e quantificados na polpa vermelha esplênica em campos alternados (um sim e dois não) no aumento de 40 vezes. Os resultados foram expressos em percentual de células positivas e células/mm² através da marcação das células positivas por imuno-histoquímica e contagem manual.

3.9 Imunofluorescência

O tecido esplênico foi crio-seccionado a 5 µm, os fragmentos colocados em lâminas silanizadas (Dako, Carpinteria, CA, EUA) e fixados com acetona P.A. (Merck) durante 10 minutos. Para a inibição de ligações inespecíficas os cortes foram incubados em solução contendo 0,4% BSA por 20 minutos a temperatura ambiente. O excesso de solução de bloqueio foi descartado e foram adicionados os anticorpos primários para detecção de células CD21⁺ (Bio-Rad AbD Serotec) e marcador de exaustão TIM-3 (Abcam) por 18 horas à 4°C. A reação foi revelada por anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugado a ficoeritrina (PE-vermelho) e anti-IgG de coelho conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC). A incubação com os anticorpos secundários foi feita em câmara escura por 30 minutos e temperatura ambiente. As lâminas foram montadas utilizando-se o meio Fluoromount-g contendo DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (Thermo Fisher Scientific). A leitura da reação foi realizada em microscópio de fluorescência. As imagens foram processadas e sobrepostas em programa ImageJ (NIH, EUA).

3.10 TUNEL

As lâminas silanizadas contendo cortes de baço foram fixadas em paraformaldeído 10% em solução salina tamponada por fosfato (PBS) por 15 minutos a temperatura ambiente. A seguir foram lavadas duas vezes em PBS, 5 minutos cada lavagem. A permeabilização celular foi realizada com Proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA, concentração final de 20 µg/mL) em Tris/HCl 10mM pH 8,0, reconstituída (10 mg/mL), diluída em 1:500 em PBS. Foram adicionados 100 µL da proteinase K (20 µg/mL) para cobrir o corte do tecido durante 10 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em PBS e o reagente de TUNEL (DeadEnd™ Fluorometric TUNEL assay, Promega Co., EUA) foi adicionado ao corte conforme instruções do fabricante. Este reagente permite a detecção da fragmentação do DNA através da marcação das porções terminais dos ácidos nucleicos. No controle negativo somente o tampão de equilíbrio foi adicionado. A incubação em câmara úmida foi realizada a 40°C por 90 minutos. Após esse período as lâminas foram lavadas em PBS por 5 minutos sob agitação constante e após a secagem foram montadas em Fluoromount-G com DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol)

(ThermoFisher Scientific, EUA). As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência Zeiss, onde as células apoptóticas marcadas foram quantificadas em toda sua extensão em campos alternados (um sim e dois não) no aumento de 40 vezes, quantificando também o número total de células marcadas com DAPI.

3.11 Análise estatística

O estudo utilizou amostras de conveniência, e para efeito de análise, os animais foram divididos em 3 grupos de acordo com os sinais clínicos: 1- baixo escore clínico; 2- médio escore clínico; 3- alto escore clínico. Também foi considerada para a análise, a organização do tecido linfóide esplênico e a carga parasitária: 1- organizado/baixa carga; 2- desorganizado/baixa carga; 3- desorganizado/alta carga. Foram utilizados os testes não paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal Wallis para amostras independentes e o teste de correlação de postos de Spearman utilizando o programa GraphPadPrism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para a análise de expressão gênica foram utilizados os testes de ANOVA e Tukey. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Os dados foram representados por mediana e intervalo interquartil.

4 RESULTADOS

4.1 Análise dos sinais clínicos dos cães com Leishmaniose Visceral

No presente estudo foram incluídos 41 cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Foram avaliados os seis sinais clínicos mais frequentemente observados na LVC: onicogribose, ceratoconjuntivite, dermatite, emagrecimento, linfadenopatia e alopecia. Os animais foram agrupados em baixo (n=13), médio (n=13) e alto escore clínico (n=15). Os dados clínicos de cada animal estão descritos no quadro 1.

Animal	Sinais Clínicos	Escore Clínico	Sexo	Ectoparasitos	Porte
001/2013	Alopecia Dermatite Hepatomegalia Ceratoconjuntivite Linfadenopatia Esplenomegalia Emagrecimento	Alto (7)	Macho	Carrapato	Médio
002/2013	Alopecia Dermatite Hepatomegalia Linfadenopatia Esplenomegalia Emagrecimento	Moderado (6)	Macho	Ausente	Pequeno
003/2013	Linfadenopatia	Baixo (1)	Fêmea	Pulga	Pequeno
004/2013	Alopecia Dermatite Onicogribose Emagrecimento	Moderado (6)	Fêmea	Pulga	Pequeno

001/2014		Baixo (0)	Fêmea	Carrapato	Médio
002/2014	Dermatite Onicogrifose	Moderado (6)	Fêmea	Pulga Carrapato	Médio
003/2014	Onicogrifose Esplenomegalia	Baixo (2)	Macho	Ausente	Médio
004/2014	Dermatite Onicogrifose Esplenomegalia Emagrecimento	Alto (9)	Macho	Ausente	Médio
005/2014	Dermatite	Baixo (2)	Fêmea	Carrapato Pulga	Grande
006/2014	Alopecia Dermatite Onicogrifose Emagrecimento	Moderado (5)	Fêmea	Carrapato Pulga	Médio
007/2014	Onicogrifose Emagrecimento	Moderado (3)	Fêmea	Carrapato Pulga	Médio
008/2014	Emagrecimento	Moderado (3)	Macho	Carrapato	Médio
009/2014	Dermatite Ceratoconjuntivite Onicogrifose Esplenomegalia Emagrecimento	Alto (9)	Fêmea	Carrapato Pulga	Médio
010/2014	Alopecia Dermatite Ceratoconjuntivite Onicogrifose	Moderado (5)	Macho	Pulga	Pequeno
011/2014	Alopecia Dermatite	Alto (8)	Macho	Pulga	Pequeno

	Onicogribose Emagrecimento				
012/2014	Alopecia Dermatite Hepatomegalia Onicogribose Esplenomegalia	Alto (7)	Macho	Pulga	Grande
013/2014	Onicogribose Esplenomegalia Emagrecimento	Baixo (2)	Macho	Carrapato Pulga	Médio
014/2014	Alopecia Dermatite Emagrecimento	Alto (4)	Macho	Carrapato Pulga	Médio
015/2014		Baixo (0)	Fêmea	Pulga	Médio
016/2014	Alopecia Emagrecimento	Moderado (6)	Fêmea	Carrapato Pulga	Médio
017/2014	Alopecia Dermatite Onicogribose Emagrecimento	Alto (7)	Macho	Carrapato Pulga	Médio
018/2014		Baixo (0)	Macho	Carrapato	Médio
019/2014	Esplenomegalia	Baixo (0)	Macho	Pulga	Pequeno
020/2014	Esplenomegalia	Baixo (0)	Macho		Grande
021/2014		Baixo (0)	Macho	Carrapato Pulga	Grande
022/2014	Dermatite Linfadenopatia Onicogribose Esplenomegalia	Alto (8)	Fêmea	Carrapato	Grande
023/2014	Dermatite Onicogribose Esplenomegalia	Baixo (1)	Fêmea	Pulga	Médio
024/2014	Dermatite	Moderado	Macho	Ausente	Pequeno

(3)					
	Onicogrifose				
025/2014	Alopecia Dermatite Ceratoconjuntivite Onicogrifose Esplenomegalia	Alto (8)	Fêmea	Ausente	Pequeno
026/2014	Hepatomegalia Onicogrifose Esplenomegalia	Baixo (2)	Fêmea	Carrapato Pulga	Grande
027/2014	Dermatite Ceratoconjuntivite Linfadenopatia Onicogrifose	Alto (8)	Fêmea	Carrapato	Grande
028/2014	Dermatite Linfadenopatia Esplenomegalia	Moderado (5)	Fêmea	Pulga	Médio
029/2014	Alopecia Dermatite Linfadenopatia Onicogrifose Esplenomegalia Emagrecimento	Alto (9)	Fêmea	Pulga	Médio
030/2014	Dermatite Onicogrifose Emagrecimento	Moderado (4)	Macho	Ausente	Médio
031/2014	Dermatite Onicogrifose Esplenomegalia	Moderado (5)	Fêmea	Carrapato	Médio
032/2014	Esplenomegalia	Baixo (0)	Fêmea	Carrapato	Médio
033/2014	Alopecia	Alto (9)	Macho	Carrapato	Médio

	Dermatite Ceratoconjuntivite Onicogribose Emagrecimento				
034/2014	Dermatite Hepatomegalia Ceratoconjuntivite Linfadenopatia Onicogribose Esplenomegalia Emagrecimento	Alto (9)	Fêmea	Carrapato Pulga	Médio
035/2014	Alopecia Dermatite Onicogribose	Moderado (6)	Fêmea	Pulga Carrapato	Pequeno
036/2014	Alopecia Dermatite Linfadenopatia Onicogribose Esplenomegalia Emagrecimento	Alto (12)	Macho	Pulga	Pequeno
037/2014	Alopecia Dermatite Onicogribose Emagrecimento	Alto (10)	Fêmea	Pulga Carrapato	Médio

Quadro 1 - Dados clínicos coletados dos cães naturalmente infectados por *L. infantum* e incluídos no estudo

4.2 Análise qualitativa e quantitativa do perfil de células CD4⁺, CD8⁺ e CD21⁺ de acordo com o escore clínico dos cães com Leishmaniose Visceral

Foram detectadas através da técnica de imunohistoquímica células CD4⁺, CD8⁺ e CD21⁺ nas polpas vermelha e branca do baço (Figura 4). As quantificações celulares foram realizadas na polpa vermelha, visto que para a quantificação por mm² e percentual de área marcada, o tamanho do folículo poderia

ser um fator que influenciaria nestas contagens e nas futuras análises. O tamanho folicular pode apresentar variação inclusive no mesmo campo analisado e muitos animais não apresentaram folículos nos campos analisados. Além disso, a polpa vermelha foi levada em consideração uma vez que é uma área de transição celular e o local onde se concentram os macrófagos parasitados. Não houve diferenças significativas quanto ao perfil celular quando estes grupos foram comparados (Figura 5).

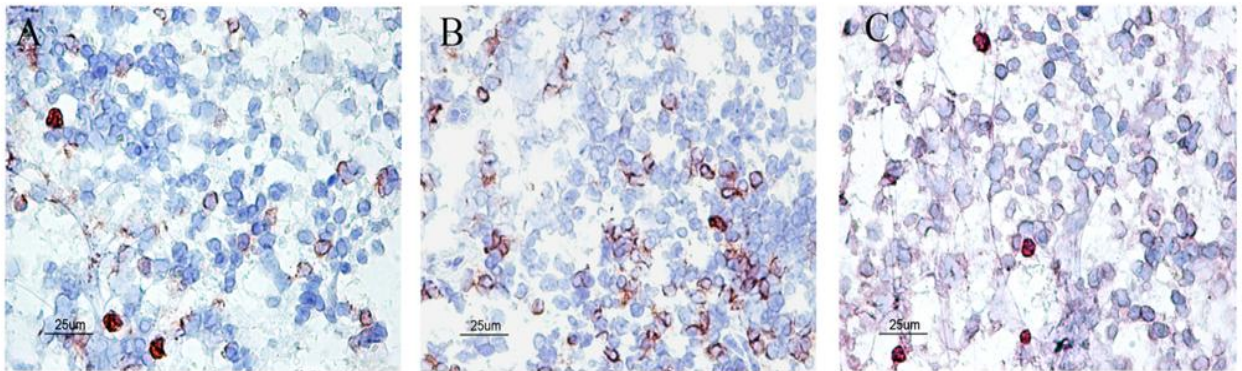
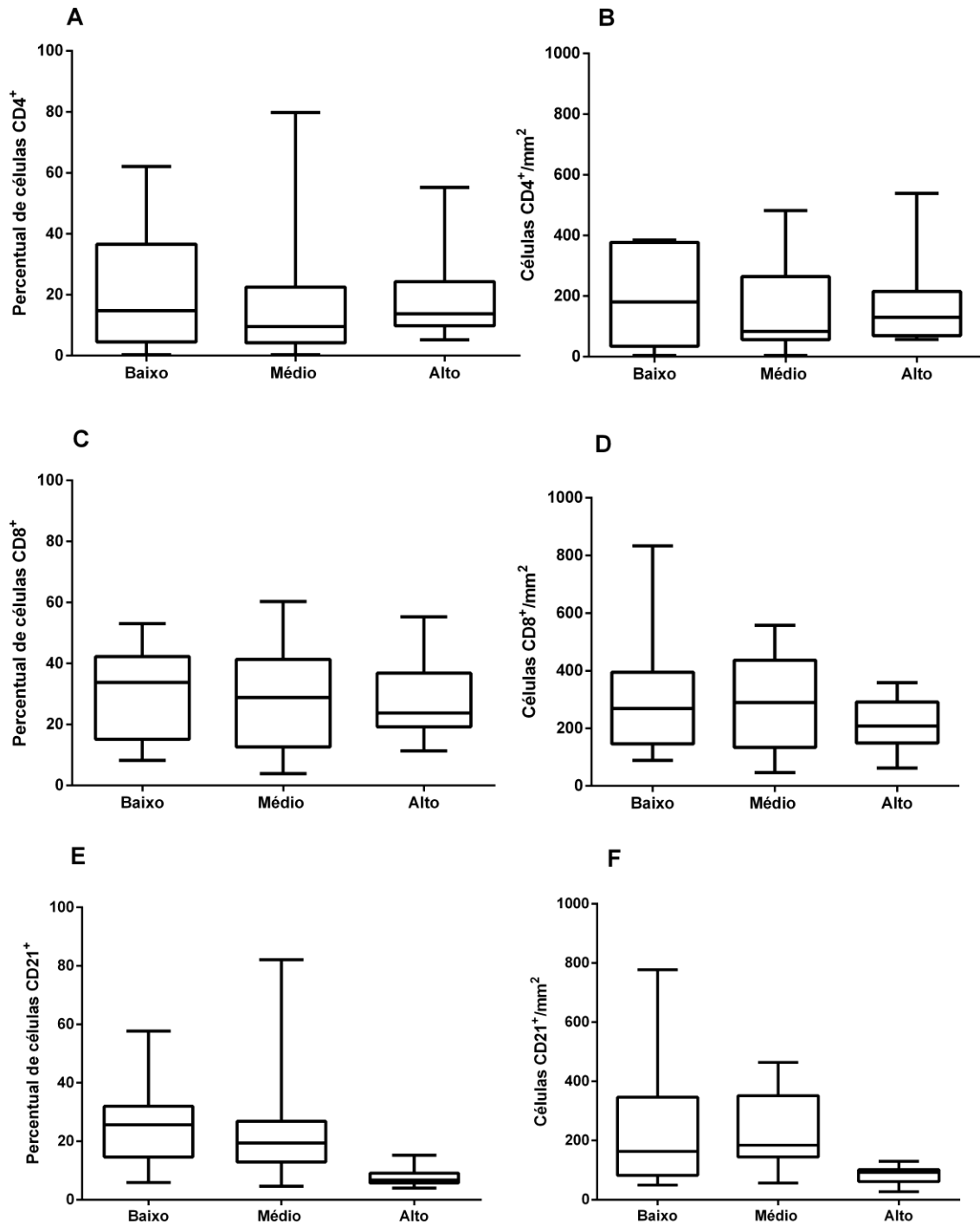


Figura 4 - Identificação por imunohistoquímica da presença de (A) CD4⁺ (B) CD8⁺, (C) CD21⁺ no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Células positivas coradas em castanho. Barra de aumento: 25µm.



Escore Clínico

Figura 5 - Perfil celular observado no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum* de acordo com o escore clínico: (A) Percentual de células CD4⁺, (B) Células CD4⁺/mm², (C) Percentual de células CD8⁺, (D) Células CD8⁺/mm², (E) Percentual de células CD21⁺ e (F) Células CD21⁺/mm². Mann-Whitney e Kruskal Wallis: p>0,05.

4.3 Análise qualitativa e quantitativa da expressão de citocinas (IFN- γ e IL-10) e de proliferação (Ki-67) no baço de cães naturalmente infectados por *L. infantum* de acordo com o escore clínico

Foram detectadas células IFN- γ^+ , IL-10 $^+$ e Ki-67 $^+$ no baço de cães naturalmente infectados (Figura 6). Estas células estavam presentes homogeneamente na polpa vermelha esplênica e foram pouco identificadas na polpa branca esplênica. Quando os grupos foram comparados, não houve diferença em relação ao número de células IFN- γ^+ (Figura 7A-B). No entanto, foi observada menor quantidade de células IL-10 $^+$ nos animais que apresentavam maior escore clínico (Figura 7C-D).

Apesar de não significativa, a quantidade de células Ki-67 $^+$ foi menor nos animais que apresentavam maior escore clínico (Figura 7 E-F). Foi observada correlação inversa entre a intensidade de escore clínico e a expressão de Ki-67 ($p=0,033$; $r=-0,346$).

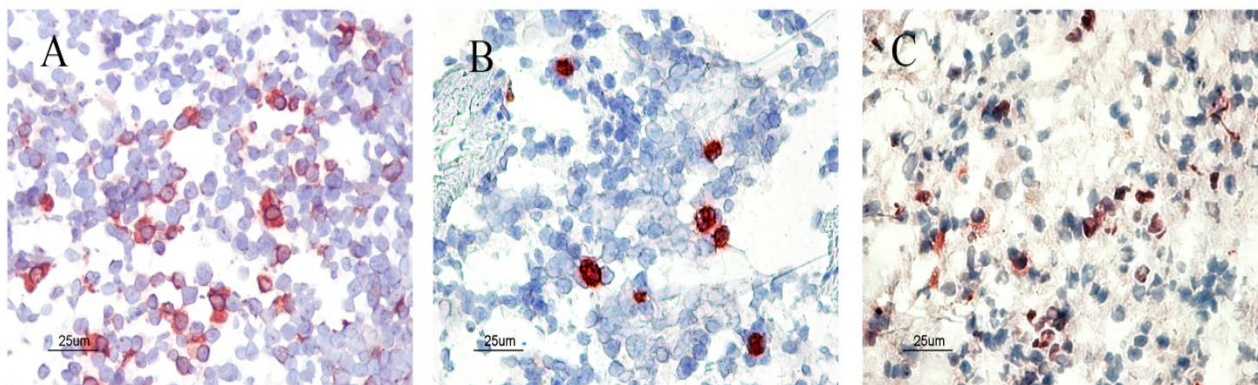


Figura 6 - Identificação por imunohistoquímica da presença de (A) IFN- γ^+ (B), IL-10 $^+$, (C) Ki-67 $^+$ no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Células positivas coradas em vermelho. Barra de aumento: 25 μ m.

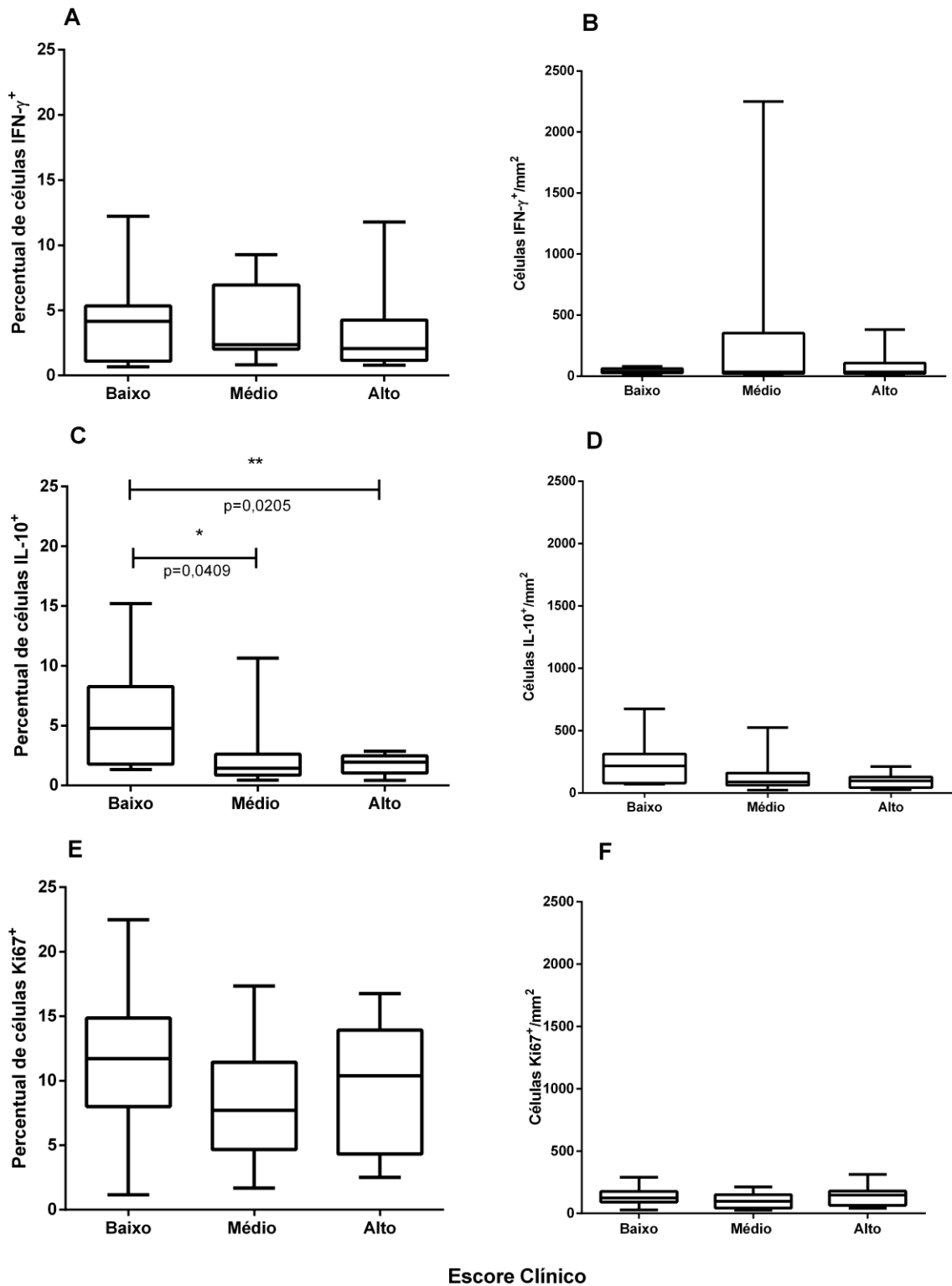


Figura 7 - Perfil celular observado no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum* de acordo com o escore clínico: (A) Percentual de células IFN- γ^+ , (B) células IFN- γ^+ /mm² (C) percentual de células IL-10⁺, (D) células IL-10⁺/mm², (E) percentual de Ki-67⁺ e (F) células Ki-67⁺/mm². Mann-Whitney: (C) *p=0,0409; **p=0,0205. Kruskal Wallis: (C) p=0,026.

4.4 Análise qualitativa e quantitativa da expressão de marcadores de exaustão (TIM-3, CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3) no baço de cães naturalmente com *L. infantum* infectados de acordo com o escore clínico

Células TIM-3⁺ e CTLA-4⁺ foram detectadas no baço de cães naturalmente infectados (Figura 8A-B). A presença dessas células foi mais abundante na polpa vermelha esplênica, sendo nessa região distribuídas de forma homogênea. Apesar de não significativo, os animais com escore clínico mais intenso apresentaram maiores quantidades de células TIM-3⁺ do que aqueles com baixo escore clínico (Figura 9A-B). Não houve diferenças entre os grupos clínicos quando comparadas as quantidades de células CTLA-4⁺ (Figura 9C-D).

A expressão gênica dos marcadores de exaustão (PD-1, PD-L1, PD-L2 e LAG-3) foi identificada através da técnica de qRT-PCR (Figura 10), onde a expressão foi maior nos grupos que apresentaram baixo escore clínico, com exceção do marcador PD-L1, sendo esta diferença significativa em PD-1.

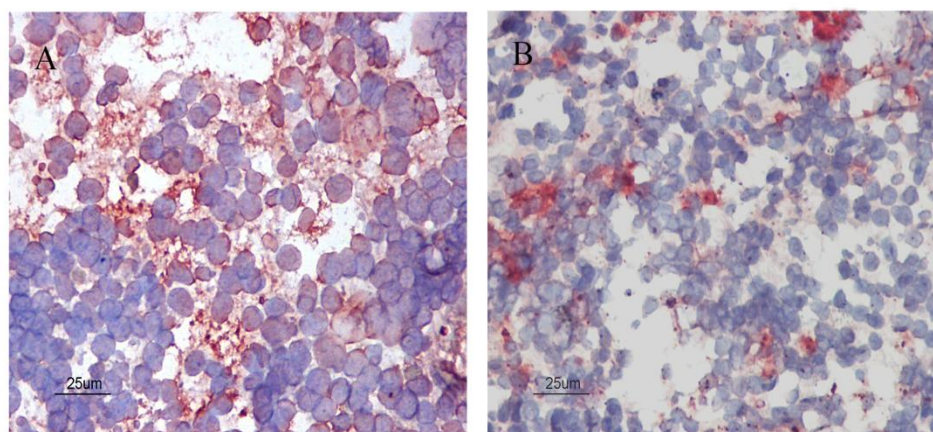


Figura 8 - Identificação por imunohistoquímica da presença de (A) TIM-3⁺ e (B) CTLA-4⁺ no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Células positivas coradas em vermelho. Barra de aumento: 25µm.

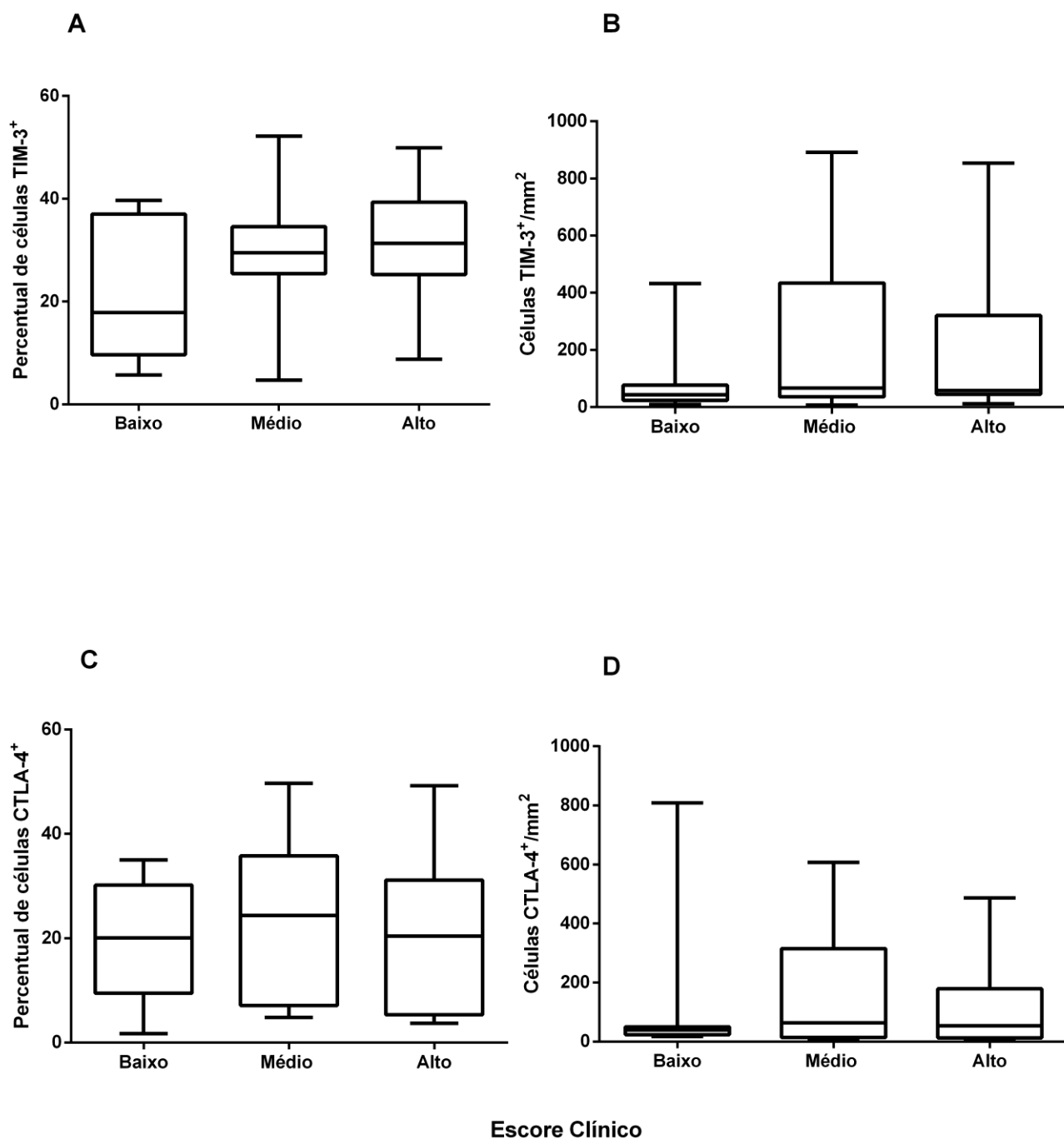


Figura 9 - Perfil celular observado no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum* de acordo com o escore clínico: (A) Percentual de células TIM-3⁺, (B) TIM-3⁺/mm², (C) Percentual de células CTLA-4⁺, (D) Células CTLA-4⁺/mm². Mann-Whitney e Kruskal Wallis: p>0,05.

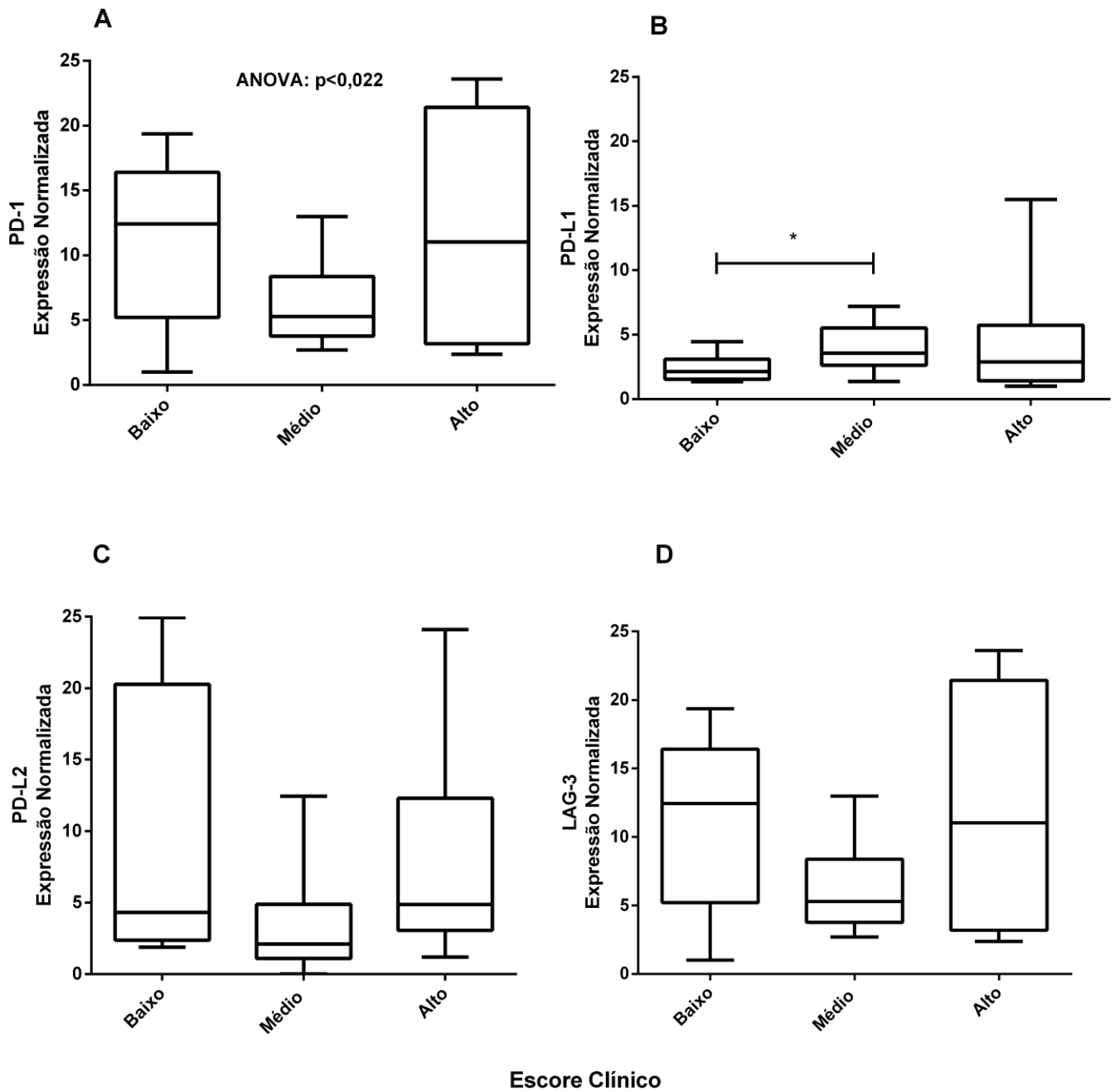


Figura 10 - Expressão gênica de marcadores de exaustão no baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. Análise *ex vivo* por qPCR dos níveis de mRNA no baço de cães classificados de acordo com o escore clínico. Valores de expressão gênica normalizados para os genes constitutivos HPRT e GAPDH. Anova: (A) $p < 0,022$. (*) Mann-Whitney: (B) $p < 0,036$.

4.5 Associação da análise histopatológica com carga parasitária

Como os cães foram infectados naturalmente e não são conhecidos os tempos de evolução, e as alterações histopatológicas e aumento da carga parasitária estão associados à progressão de infecção/doença (Strauss-Ayali et al., 2005; Silva et al., 2012; Cavalcanti et al., 2015) os dados sobre histopatologia foram associados com a carga parasitária para efeito de análise. Conforme descrito por Cavalcanti et al. (2015), os cães foram agrupados como: 1- PBE organizada e baixa carga parasitária (OB); 2- PBE desorganizada e baixa carga parasitária (DB) e 3- PBE desorganizada e alta carga parasitária (DA). Apenas um animal apresentou alta carga parasitária e PBE organizada e por isso não foi incluído nestas análises.

A desorganização da polpa branca esplênica foi caracterizada pela redução do número e perda de compartimentalização dos folículos linfóides, que nos casos extremos apresentaram-se atrofiados (Figura 11D). Além disso, houve redução das células da bainha linfática periarteriolar, área composta por linfócitos T. Esta alteração histopatológica tem sido, com frequência, observada na LVC, e no presente estudo foi observada na maioria dos animais (30/41, 73,2%). Foi associada à progressão da doença, pois animais com polpa branca desorganizada apresentaram escore clínico significativamente mais elevado do que aqueles com polpa organizada (Mann-Whitney $p=0,0235$) (Figura 12).

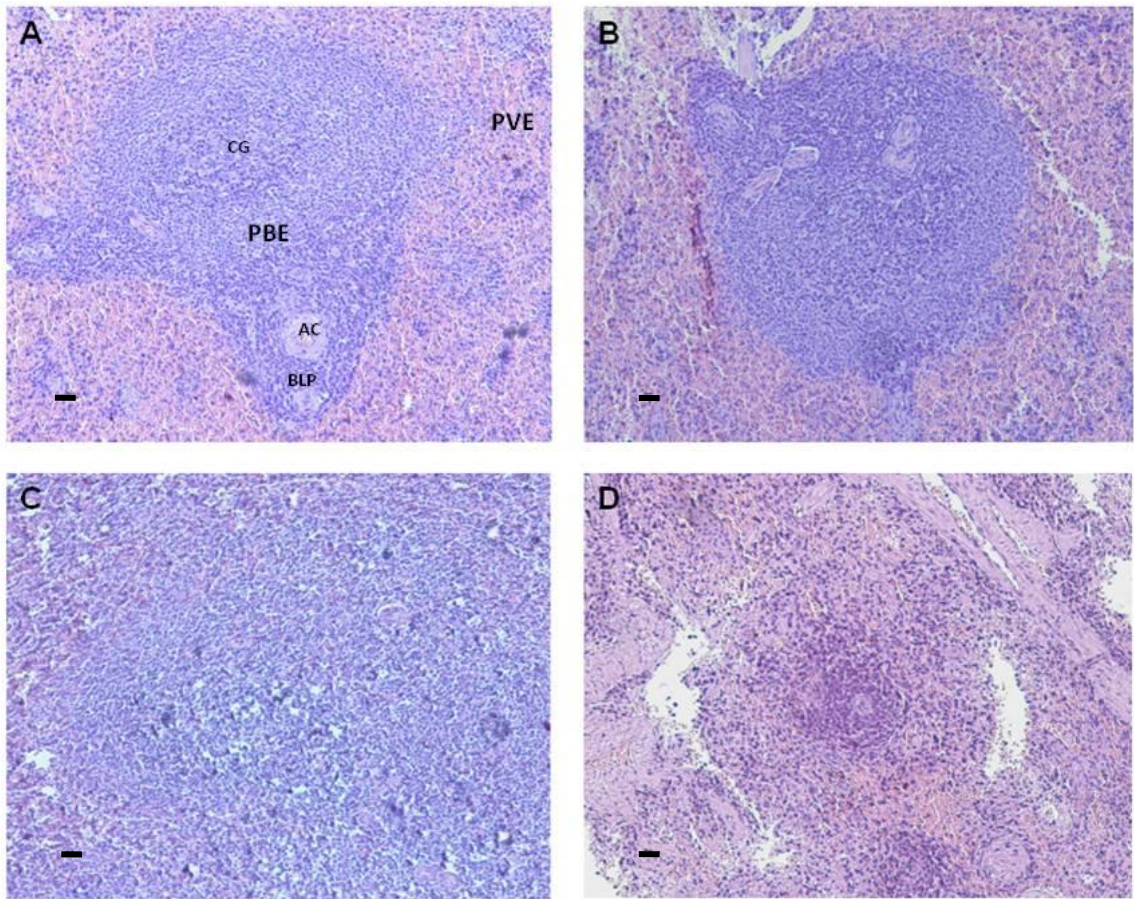


Figura 11 - Figura ilustrativa da polpa branca esplênica de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Em (A) Polpa Branca Esplênica (PBE) organizada e (B) PBE pouco desorganizada. Em (C) PBE com média desorganização. Em (D) PBE intensamente desorganizada. Barra de aumento 10 µm. PBE=Polpa Branca Esplênica; CG=Centro Germinativo; AC=Arteriola Central; BLP=Bainha Linfática Periarteriolar e PVE=Polpa Vermelha Esplênica.

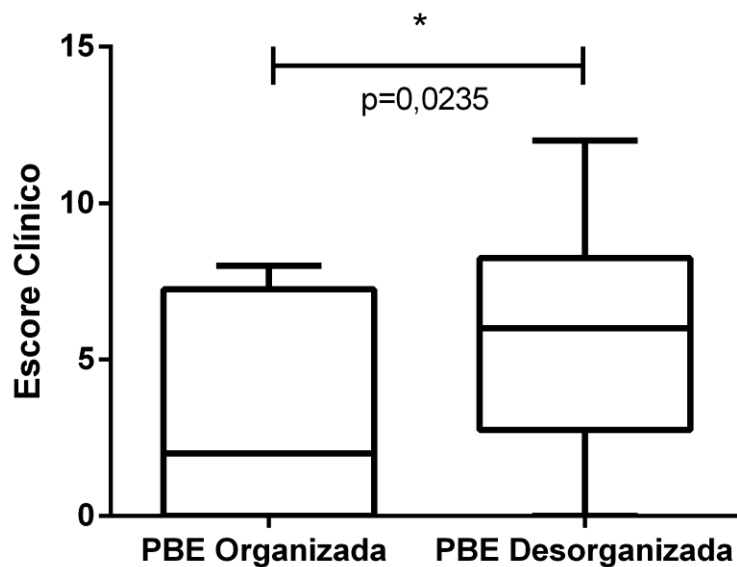
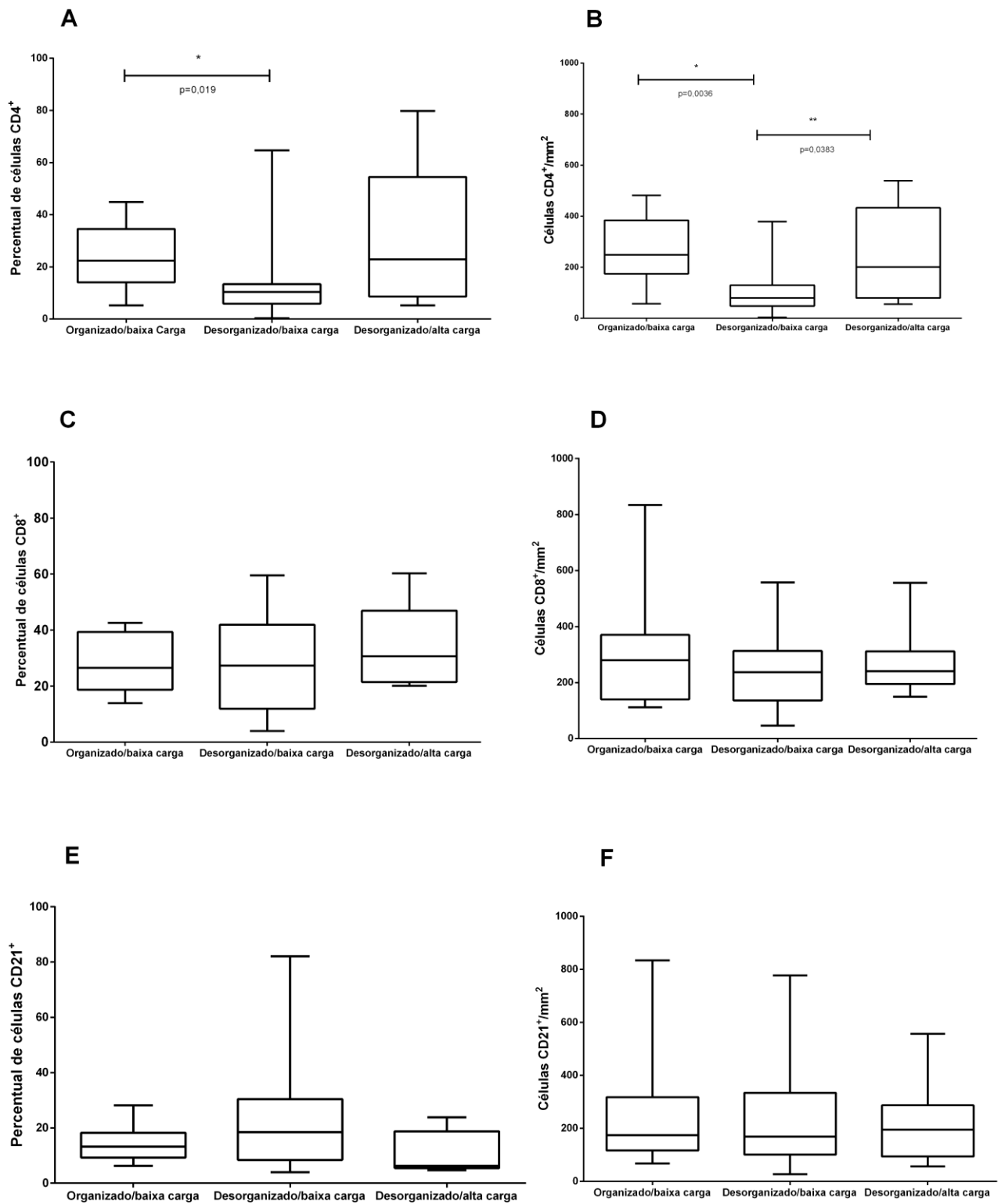


Figura 12 - Escore clínico observado de acordo com o grau de organização da polpa branca esplênica (PBE) em cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Mann-Whitney: * $p=0,0235$. PBE organizada: Animais com PBE organizada a pouco desorganizada. PBE desorganizada: animais com média a intensa desorganização da polpa branca esplênica.

4.6 Análise qualitativa e quantitativa do perfil de células CD4⁺, CD8⁺ e CD21⁺ de acordo com a desorganização da polpa branca esplênica e carga parasitária

Observamos menor quantidade de células CD4⁺ em animais com polpa branca desorganizada e baixa carga parasitária, do que aqueles com polpa branca desorganizada e alta carga parasitária. Em associação com a atrofia de bainha linfática periarteriolar, este dado sugere a retenção destas células na polpa vermelha (Figura 13A-B).

Não houve diferenças nas quantidades de células CD8⁺ e CD21⁺ quando os grupos foram comparados (Figura 13C-F).



Grupos Combinados

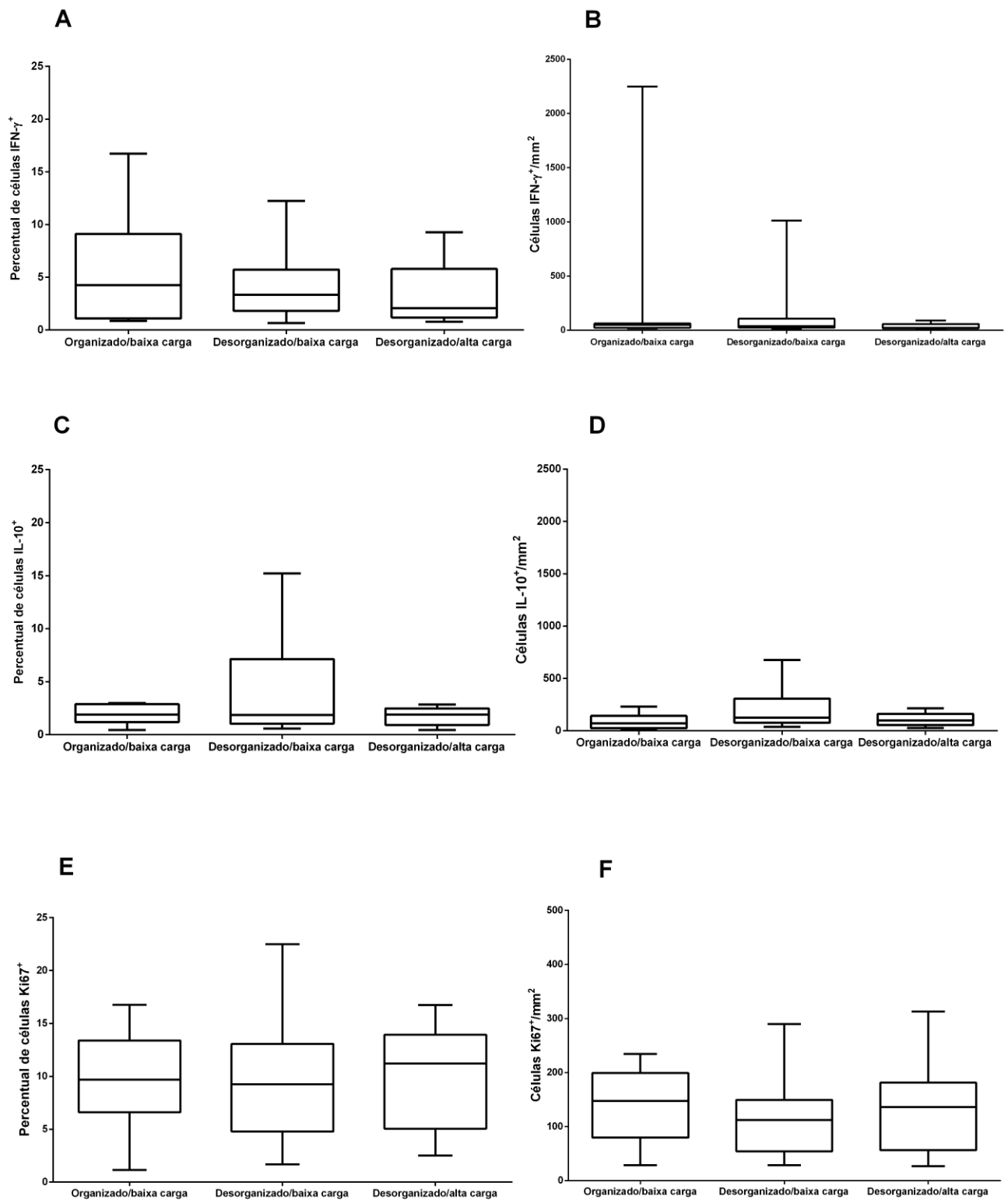
Figura 13 - Perfil celular observado no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum* de acordo com a desorganização da polpa branca esplênica e carga parasitária: (A) Percentual de células CD4⁺, (B) Células CD4⁺/mm², (C) Percentual de células CD8⁺, (D) Células CD8⁺/mm², (E) Percentual de células CD21⁺, (F) Células CD21⁺/mm². Mann-Whitney: (A) *p=0,019; (B) *p=0,0036, **p=0,0383. Kruskal Wallis: (A) p=0,031; (B) p=0,021.

4.7 Análise qualitativa e quantitativa da expressão de citocinas (IFN- γ e IL-10) e de proliferação (Ki-67) no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum* de acordo com a desorganização da polpa branca esplênica e carga parasitária

Quando os grupos foram comparados, não houve diferença significativa em relação ao número de células IFN- γ^+ , IL-10 $^+$ e Ki-67 $^+$ (Figura 14). No entanto, foi observado uma tendência de maior percentual de células IFN- γ^+ nos animais que apresentavam a PBE organizada e baixa carga parasitária (Figura 14A), enquanto que se observou maior quantidade de células IL-10 $^+$ nos animais com PBE desorganizada e baixa carga parasitária (Figura 14C-D).

4.8 Análise qualitativa e quantitativa da expressão de marcadores de exaustão (TIM-3, CTLA-4, PD-1, LAG-3, PD-L1, e PDL-2) no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum* de acordo com a desorganização da polpa branca esplênica e carga parasitária

Animais com baixa carga parasitária e polpa branca organizada ou desorganizada apresentaram células CTLA-4 $^+$ e TIM-3 $^+$ (Figura 15). No presente estudo, ainda observamos a redução significativa de células CTLA-4 $^+$ nos animais com polpa branca desorganizada e alta carga parasitária (Figura 15C-D), fato que poderia ser consequência da apoptose sofrida por essas células ou a expressão de outras moléculas de exaustão em detrimento da molécula CTLA-4.

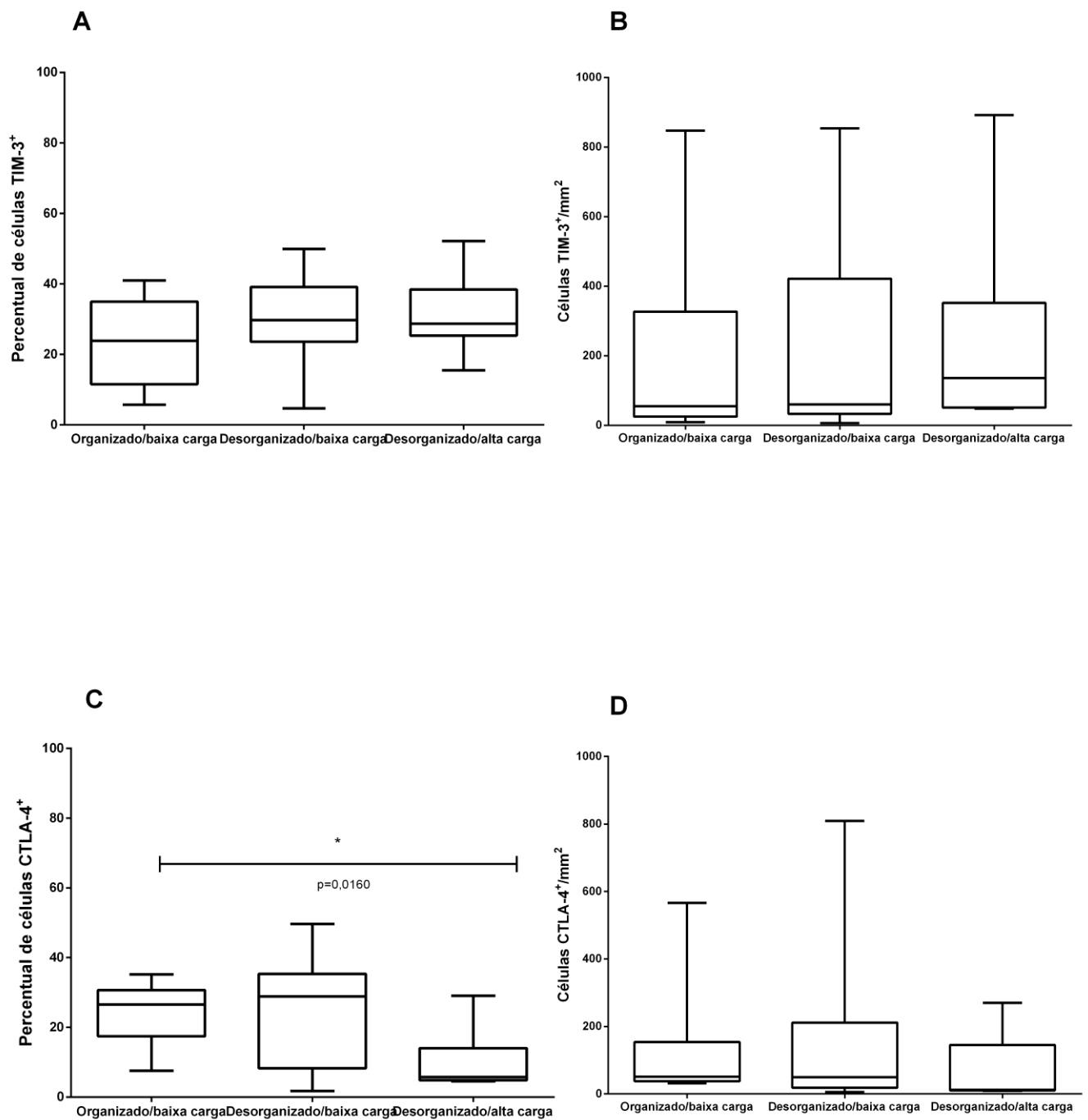


Grupos Combinados

Figura 14 - Perfil celular observado no baço de cães naturalmente infectados por *L. infantum* de acordo com a desorganização da polpa branca esplênica e carga parasitária: (A) Percentual de células IFN- γ^+ , (B) Células IFN- γ^+ /mm², (C) Percentual de células IL-10⁺, (D) Células IL-10⁺/mm², (E) Percentual de células Ki-67⁺, (F) Células Ki-67⁺/mm². Mann-Whitney e Kruskal Wallis: $p > 0,05$.

Observamos também que a expressão de TIM-3 foi alta em todos os grupos e apresentou uma tendência em aumentar nos animais desorganizados, mais intensamente naqueles com alta carga parasitária (Figura 15A-B).

Não foi possível identificar nesse estudo células PD-1⁺, PD-L1⁺, PD-L2⁺ e LAG-3⁺ através da técnica de imunohistoquímica, o que pode ser explicado por limitação da técnica escolhida para as análises. É possível que a intensidade de expressão destas moléculas por célula seja baixa e haja a necessidade de se estimular as células coletadas do hospedeiro para a detecção destes marcadores de exaustão por citometria de fluxo como tem sido demonstrado na literatura (Esch et al., 2013; Chiku et al., 2016; Coy et al., 2017). Entretanto, a expressão gênica destes marcadores de exaustão foi identificada através da técnica de qRT-PCR (Figura 16), onde a expressão foi menor nos grupos que apresentaram maior desorganização e carga parasitária no baço, sendo significativa esta diferença em PD-L1 e LAG-3.



Grupos Combinados

Figura 15 - Análise quantitativa de células exaustas no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum* de acordo com a desorganização da polpa branca esplênica e carga parasitária: (A) Percentual de células TIM-3⁺, (B) Células TIM-3⁺/mm², (C) Percentual de células CTLA-4⁺, (D) Células CTLA-4⁺/mm². Mann-Whitney: (C) *p=0,00160. Kruskal Wallis (C) p=0,021.

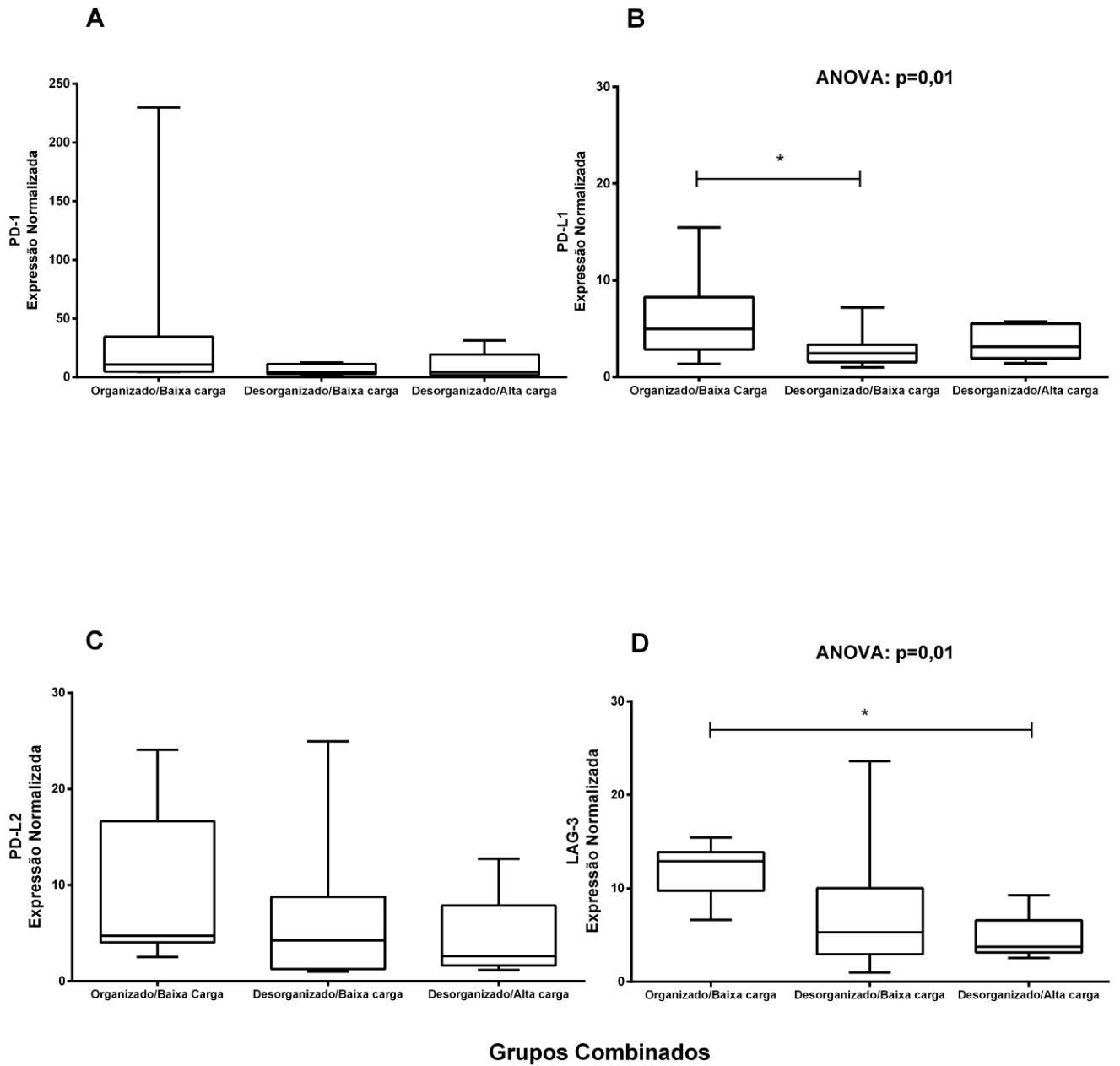


Figura 16 - Expressão gênica de marcadores de exaustão no baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. Análise *ex vivo* por qPCR dos níveis de mRNA no baço de cães classificados de acordo com a carga parasitária e desorganização esplênica. Valores de expressão gênica normalizados para os genes constitutivos HPRT e GADPH. Anova: (B) p=0,01; (D) p= 0,01. Teste de Tukey (*): (B) p <0,05; (D) p <0,05.

4.9 Análise qualitativa da presença de células B exaustas (CD21⁺TIM-3⁺) no baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*

Apesar da atrofia da bainha linfóide periarteriolar, a quantidade de células TIM-3⁺ foi semelhante ao observado nos animais com polpa branca esplênica organizada, e na análise histopatológica observamos acúmulo de linfócitos B nos animais com estroma desorganizado. Questionamos-nos se estas células poderiam estar expressando TIM-3 nestes cães. Assim, foi realizada a dupla marcação *in situ* usando anticorpos fluorescentes. Foi evidenciada a presença de linfócitos B (CD21⁺) expressando a molécula TIM-3 (Figura 17). Estas células foram mais frequentes nos baços com polpa branca esplênica desorganizada.

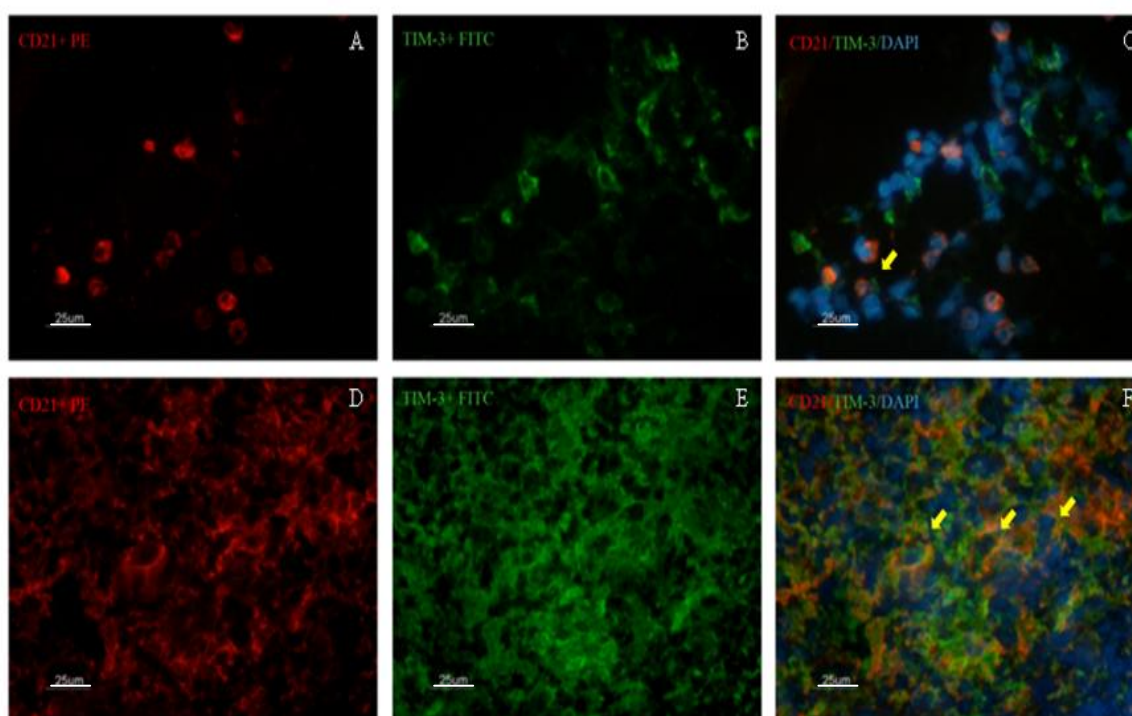


Figura 17 - Identificação por imunofluorescência da presença de células CD21⁺ e TIM-3⁺ no baço de cães naturalmente infectados por *L. infantum* apresentando polpa branca esplênica organizada (A-C) e desorganizada (D-F). Em A e D observa-se a presença de células CD-21⁺/linfócitos B (Vermelho PE). Em B e E a presença de células TIM-3⁺ (verde FITC). Em C e F imagens sobrepostas (vermelho PE/verde FITC/azul DAPI). Setas amarelas indicam células CD21⁺ expressando TIM-3⁺. Barra de aumento: 25 µm.

4.10 Análise quantitativa e qualitativa de células apoptóticas no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum*

Como o desfecho final da exaustão celular é a apoptose, e observamos menor quantidade de células CTLA-4⁺ nos cães com polpa branca desorganizada e alta carga parasitária, levantamos a hipótese de que estas células poderiam estar morrendo o que poderia se relacionar a atrofia da bainha linfática periarteriolar. Desta forma, foi analisada a presença de células apoptóticas no baço dos cães (Figura 18). As células apoptóticas no baço dos cães foram identificadas através da técnica de TUNEL e as quantificações celulares foram realizadas tanto na polpa vermelha quanto na polpa branca esplênica. As células em apoptose estavam presentes na polpa branca esplênica e na polpa vermelha, sendo em maior número e de forma homogênea na polpa branca.

As células apoptóticas foram visualizadas tanto em animais com polpa branca organizada quanto desorganizada. No entanto, as células em apoptose foram mais frequentes nos animais com polpa branca desorganizada (Figura 19). A análise quantitativa mostrou que animais com baixa carga parasitária e polpa branca desorganizada apresentavam maiores quantidades de células em apoptose ($p=0,006$) (figura 19).

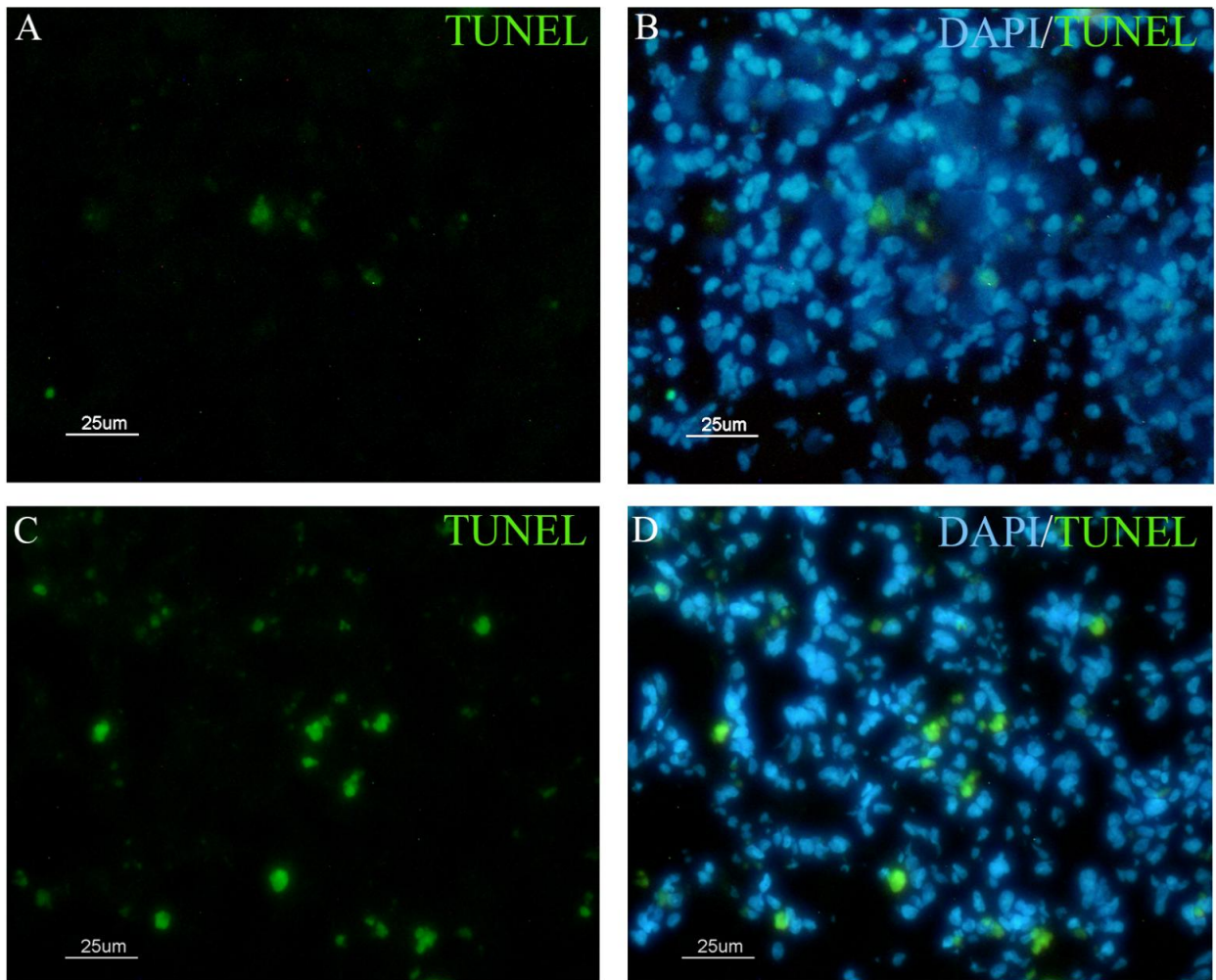


Figura 18 - Identificação por TUNEL da presença de células apoptóticas no baço de cães naturalmente infectados por *L. infantum* apresentando polpa branca esplênica organizada (A-B) e desorganizada (C-D). Barra de aumento: 25 µm.

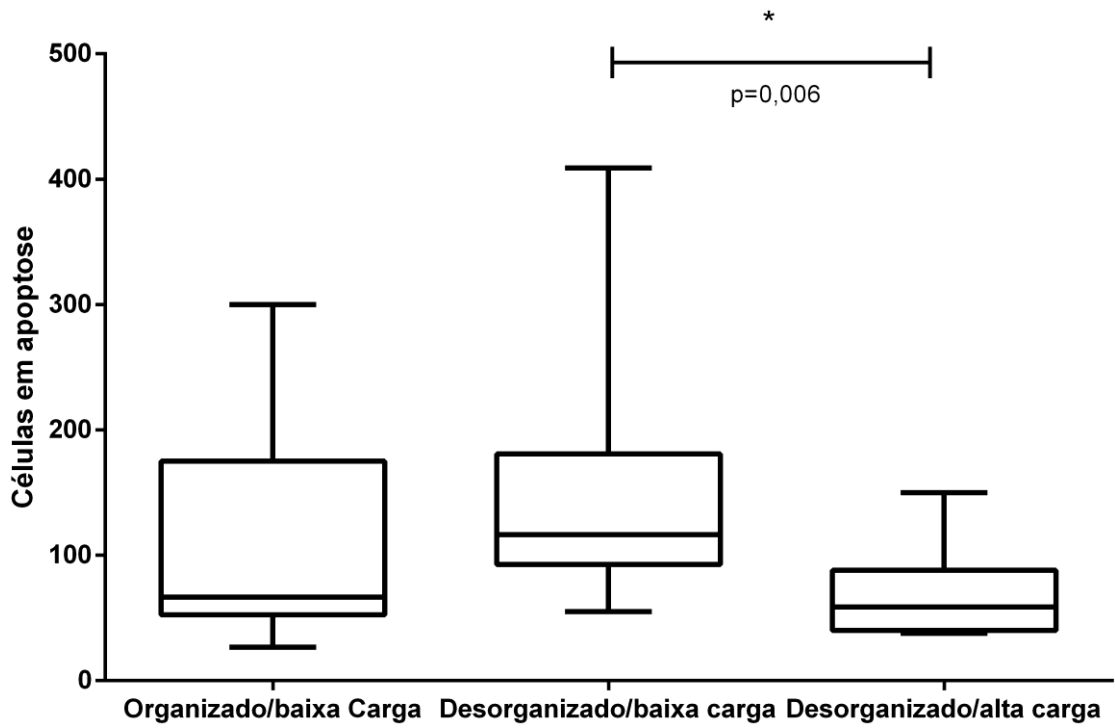


Figura 19 - Análise quantitativa de células em apoptose no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum* de acordo com a desorganização da polpa branca esplênica e carga parasitária. Mann-Whitney: *p=0,006

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram avaliados os baços de 41 cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum*. Foram quantificados marcadores de exaustão, correlacionando-os com a avaliação clínica dos animais, com a organização da polpa branca esplênica e com a carga parasitária.

Foram avaliados os seis sinais clínicos mais frequentemente observados na LVC: onicogribose, ceratoconjuntivite, dermatite, emagrecimento, linfadenopatia e alopecia. Os animais foram agrupados em baixo, médio e alto escore clínico. Quando estes grupos foram comparados, as células IL-10⁺ estavam significativamente reduzidas nos animais com maiores escores clínicos (médio e alto), quando comparados aos animais com baixo escore clínico. A IL-10 tem sido relacionada à progressão de doença (Bogiatto et al., 2010; Costa et al., 2013; Rodriguez-Cortés et al., 2016; do Nascimento et al., 2013), porém outros estudos não observaram tal associação (Sollano-Galego et al., 2016, Quinnell et al., 2001). Em parte, estes resultados contraditórios podem ocorrer devido ao fato de que na maioria dos trabalhos, os animais avaliados foram infectados naturalmente, não sendo possível verificar o tempo de infecção/evolução.

Em trabalho prévio, nosso grupo observou a redução da expressão de IL-10 em animais com alta carga parasitária (Cavalcanti et al., 2015). É possível que no nosso estudo esta redução na expressão de IL-10⁺ esteja associada aos processos de exaustão celular cujos marcadores (CTLA-4 e TIM-3) foram mais intensos nos animais mais sintomáticos. Os estudos de exaustão celular baseados na detecção da molécula PD-1 já mostraram a associação deste processo com a redução da capacidade de proliferação e redução da expressão destas citocinas mais intensos em animais polissintomáticos (Esch et al., 2013). Barber et al., (2006), estudando o modelo de infecção viral crônica (LCMV), observaram que o processo de exaustão imunológica se manifestava nos estágios iniciais de infecção e cursava com o aumento de PD-1 induzida pelo patógeno. Doe e colaboradores (2016) demonstraram em camundongos infectados com *Plasmodium chabaudi*, *P. vinckei* and *P. berghei* que logo após 6 dias de infecção as células T CD4⁺ passaram a expressar PD-1 e LAG-3, sugerindo que essas células expressam esses marcadores de exaustão nos momentos iniciais da infecção. Dados semelhantes foram observados em nosso estudo, onde cães com o baixo escore clínico apresentaram maiores quantidades de PD-1 e PD-L2, e aqueles com baço organizado e baixa

carga parasitária apresentaram maiores quantidades de PD-1, PD-L1, PD-L2 e LAG-3. A ativação do PD-1 induz apoptose, inibe proliferação celular e produção de citocinas (Joshi et al., 2009). Apesar disso, no presente estudo não foi possível identificar a presença de células PD-1⁺, PD-L1⁺ e LAG-3⁺ em tecido esplênico pela técnica de imuno-histoquímica, o que pode ser explicado por limitação da técnica escolhida para as análises (imuno-histoquímica). Provavelmente há a necessidade de estimular estas células para que os marcadores sejam detectados. Os estudos anteriores que identificaram estes marcadores de exaustão em cães usaram a técnica de citometria de fluxo e re-estimularam as células durante alguns dias antes de marcá-las para a análise (Esch et al., 2013; Chiku et al., 2016; Coy et al., 2017). No entanto, Maekawa et al. (2016), mostraram que o melanoma oral do cão, osteossarcoma, hemangiosarcoma, tumor de mastócitos, adenocarcinoma mamário e adenocarcinoma de próstata expressaram PD-L1, identificando este ligante através da técnica de imunohistoquímica. Outros estudos em humanos relataram uma vasta gama de tecidos que expressam normalmente os transcritos dos ligantes de PD-1, com elevados níveis de expressão na placenta, coração, pulmão e fígado, porém observaram baixos níveis de expressão no baço, linfonodos e timo (Freeman et al., 2000; Carter et al., 2002; Dong et al., 1999; Tseng et al., 2001). Foi possível a identificação da expressão gênica de PD-1, PD-L1, PD-L2 e LAG-3 através da técnica de qRT-PCR, onde observamos uma menor expressão destas moléculas nos grupos com maior desorganização e carga parasitária no baço, sendo essa diferença significativa em PD-L1 e LAG-3. Em relação ao escore clínico a expressão foi maior nos grupos que apresentaram baixo escore clínico, com exceção do marcador PD-L1, sendo esta diferença significativa em PD-1.

Além disso, detectamos a expressão *in situ* das moléculas de exaustão CTLA-4 e TIM-3. Animais com baixa carga parasitária, independente da polpa branca estar organizada ou desorganizada, apresentaram células CTLA-4⁺ e TIM-3⁺ e RNAm para LAG-3 e PD-L1. Murphy et al. (1998) estudando o modelo BALB/C de infecção experimental com *L. donovani* observaram que a expressão de CTLA-4⁺ é aumentada já nas fases iniciais de infecção, 24-48h após o inóculo. No presente estudo, ainda observamos menores quantidades de células CTLA-4⁺ nos animais com polpa branca desorganizada e alta carga parasitária, fato que poderia ser consequência da apoptose sofrida por essas células. Gomes e colaboradores (2000) demonstraram em modelo murino que a estimulação de antígeno ou TCR de células T CD4⁺ de infecção crônica esplênica resulta em uma produção marcada de TGF-β,

representando assim um bloqueio na produção de IFN- γ . Tanto o bloqueio de CTLA-4 como a neutralização da secreção de TGF- β levaram a intensa produção de IFN- γ e a morte de parasitos em macrófagos co-cultivados. Por outro lado, o envolvimento da técnica de CTLA-4 em fase sólida promoveu o intenso crescimento de *L. infantum* e a neutralização de TGF- β aboliu esse efeito deletério. Esses resultados sugerem que o envolvimento de CTLA-4 e a produção ligada de TGF- β mantêm ativamente respostas Th1 deficientes e sustentam o crescimento do parasito na leishmaniose visceral esplênica.

Observamos que a expressão de TIM-3 foi alta em todos os grupos e, apesar de não significativo, foi maior nos animais com polpa branca esplênica desorganizada, tendo sido mais intenso naqueles com alta carga parasitária. Células em exaustão podem expressar diversos receptores inibitórios. Quanto maior a variedade de receptores co-expressos, mais intenso é o estado de exaustão destas células (Wherry e Kurachi, 2015). Em humanos a co-expressão de PD-1 e TIM-3 nas células T CD8⁺ demonstra um subconjunto mais severo de células T CD8⁺ exaustas, onde o bloqueio combinado de PD-1 e TIM-3 tem sido mostrado como a forma mais eficiente para restaurar a função de células T CD8⁺ em exaustão (Fourcade et al., 2014).

No presente estudo foi evidenciada também a presença de linfócitos B (CD21⁺) expressando a molécula TIM-3, o que sugere que o processo de exaustão celular pode estar ocorrendo também nas células B. A descrição de linfócitos B exaustos expressando TIM-4⁺ já foi realizada em camundongos (Rodriguez-Manzanet et al., 2010), mas o seu papel na leishmaniose ainda não foi esclarecido. Okagawa e colaboradores (2012) também já relataram células CD21⁺ expressando TIM-3 em bovinos infectados com o vírus da leucemia bovina.

Na LVC tem sido demonstrado que a ruptura da polpa branca esplênica está associada à acumulação de células plasmáticas no baço, onde animais com infecção ativa e desorganização da polpa branca apresentaram disproteinemia mais grave e aumento da fração de globulina no soro, o que também foi correlacionado com a intensidade da acumulação de células plasmáticas. Deste modo, as células produtoras de IgG foram predominantemente responsáveis pelo aumento da densidade de células plasmáticas no baço (Silva-O'Hare et al., 2016). Além disso, as moléculas CXCL12, APRIL e BAFF, que estão associadas com a localização e a sobrevivência das células plasmáticas (Tangye, 2011), foram mais expressas no tecido esplênico de animais com infecção ativa e desorganização da polpa branca

esplênica (Silva-O'Hare et al., 2016). Foi proposto que a plasmocitose de órgãos linfóides secundários seja principalmente responsável pela hipergamaglobulinemia associada a doenças inflamatórias crônicas (Hiepe et al., 2011). Silva-O'Hare et al. (2016) mostraram que a plasmocitose esplênica está fortemente associada a altas concentrações séricas de globulina, um aumento relativo na fração de gamaglobulina no soro e na disproteinemia sérica. A eletroforese protéica do soro demonstrou que a hipergamaglobulinemia apresentada pelos animais com infecção e a desorganização da polpa branca esplênica era claramente distribuída policlonalmente (O'Connell, et al., 2005). Os resultados de Schaut et al. (2016) demonstraram o papel de PD-L1 na função das células B e nas respostas em condições inflamatórias crônicas induzidas experimentalmente em cães, onde observaram a presença crescente de uma nova e crítica célula B B10 reguladora que expressou IgD durante LV progressiva. Estas células produziram IL-10, induziram outras células B e células T a produzir IL-10 e suprimiram IFN- γ através de PD-L1/PD1. Apesar de termos detectado a expressão gênica de PD-L1 no presente estudo, não caracterizamos os tipos celulares PD-L1⁺.

A apoptose foi detectada no baço de cães infectados em todos os grupos estudados. No entanto, a quantidade de células em apoptose foi maior nos animais com baixa carga, tendo sido maior naqueles com baixa carga e polpa branca desorganizada. A menor quantidade de células apoptóticas foi observada nos animais com o baço desorganizado e que apresentavam alta carga parasitária, resultado semelhante ao observado para as células CTLA-4⁺ e expressão de RNAm de PD-1 e LAG-3. Roy et al. (2017) demonstraram que o eixo de sinalização de PD-1/SHP2 rege negativamente a ativação de AKT em macrófagos e a indução de PD-1 mediada por H₂O₂ contribui para a apoptose em macrófagos. Atualmente, o envolvimento de CTLA-4 na indução de apoptose não está bem definido. Tem sido relatado em modelo murino que a conexão do receptor CTLA-4 por mAb na superfície de células T ativadas induz a apoptose de uma maneira Fas-independente que pode envolver uma nova via (Scheipers et al., 1998). Contardi e colaboradores (2005) demonstraram que CTLA-4 pode desencadear a apoptose de células tumorais que expressam CTLA-4 após interação com ligantes recombinantes CD80 ou CD86 solúveis e que a indução da apoptose se dá através de um mecanismo caspase-8-dependente.

De forma contrária, Moreira et al. (2013) observaram a apoptose nos linfonodos e na pele de cães com LVC e verificaram que a taxa de células em apoptose foi

mais elevada em órgãos com maior carga parasitária. Moreira et al. (2016) demonstraram que o fígado e o baço de cães infectados com *L. Infantum* apresentam um maior número de células que sofrem apoptose (linfócitos), sugerindo que este processo possa contribuir para a sobrevivência de *Leishmania* nestes órgãos, pois os linfócitos em apoptose não tiveram a capacidade de apresentar e reconhecer o antígeno, permitindo a sobrevivência do parasito. Estes resultados coincidiram com os de Lima et al. (2012), que observaram apoptose em células T do baço e sangue periférico, sugerindo que esse parasito poderia induzir a apoptose em células T em associação com a diminuição da imunidade mediada por células. Em conjunto, os dados sugerem também que a apoptose pode ser o mecanismo envolvido na atrofia da bainha linfática periarteriolar, folículos linfoides, células CD4⁺ e CTLA-4⁺.

A compartimentalização dos órgãos linfoides é de grande relevância para o desenvolvimento adequado da resposta imunológica, visto que nestas áreas são introduzidas as etapas de interação, apresentação antigênica, ativação celular e desenvolvimento da resposta imune efetora contra o patógeno (Lokmic et al., 2008). O baço é um órgão de extrema importância no âmbito da leishmaniose visceral, dado que é responsável pela resposta imune contra diversos patógenos sistêmicos, entre eles a *Leishmania*, mas é também um alvo de infecção, sendo acometido durante seu curso e sofrendo alterações que podem vir a comprometer a sua função. Alterações nos órgãos linfoides relacionadas à leishmaniose visceral têm sido observadas em estudos, tanto em humanos (Veress et al, 1977), quanto em caninos (Santana et al., 2008; Silva et al., 2012) e modelos experimentais (Engwerda et al., 2002), e como observado em nossos resultados, essa desorganização do baço coincide com os estágios mais graves da doença.

A desorganização esplênica, causada pela infecção por *L. infantum* e/ou por coinfeções, afeta a microarquitetura do baço, necessária para a ativação de células B e o estabelecimento de resposta imune humoral contra os antígenos, podendo assim dificultar a resposta imune, contra a *Leishmania* e também contra outros patógenos. Desse modo, é possível que a alteração da microarquitetura esplênica observada no nosso estudo esteja relacionada à imunossupressão e a uma resposta ineficiente a infecções. Isso pode explicar o desenvolvimento dos sinais clínicos nesses animais. Observamos também que a maior parte dos cães apresentou desorganização da microarquitetura da polpa branca esplênica (N=30, 73,2%), sugerindo que esta seja uma alteração recorrente na LVC. Além da desorganização

evidenciou-se redução no tamanho e número de folículos linfóides e bainha linfática periarteriolar, assim como uma redução no quantitativo de linfócitos CD4⁺ na polpa vermelha. Estes resultados indicam que possivelmente os linfócitos T e B não estejam migrando para seus sítios específicos e/ou estejam entrando em processo apoptótico e, conforme nossos resultados e de Lima e colaboradores (2012), a relação entre uma alta porcentagem de apoptose de células T e a desorganização estrutural da polpa branca esplênica pode contribuir para a ineficiente resposta imune mediada por células na LVC. A presença de células apoptóticas também já foi relatada por Silva e colaboradores (2012), que demonstraram que cães naturalmente infectados apresentaram diminuição na população de linfócitos T totais e aumento do percentual de células em apoptose no baço e sangue periférico.

Em alguns estudos são relatados padrões imuno-inflamatórios esplênicos associados à infecção natural por *L. infantum*, onde os animais, que evidenciaram perda de estrutura do folículo linfóide e células associadas, perisplenite e alta densidade parasitária no baço (em que os parasitos foram detectados por histologia convencional), estavam em estágio mais avançado da doença clínica (Santana et al., 2008; Silva et al., 2012; De Lima et al., 2012; Lima et al., 2014). Estas observações foram semelhantes ao observado em nosso estudo, uma vez que animais com polpa branca esplênica desorganizada apresentaram escore clínico significativamente mais elevado do que aqueles com polpa organizada.

Tanto a desorganização da polpa branca esplênica, quanto o aumento da carga parasitária já foram associados à evolução da infecção (Cavalcanti et al., 2015). Observamos que grande parte dos animais apresentaram polpa branca desorganizada, ainda que apresentando baixa carga parasitária, sugerindo que a desorganização da microarquitetura esplênica preceda a falha no controle da multiplicação do parasito. Neste contexto, nos perguntamos se e de que forma o processo de exaustão celular poderia estar relacionado a este processo de desorganização da polpa branca esplênica? Neste sentido, observamos células em exaustão em animais com polpa branca organizada e baixa carga, a redução das células CD4⁺ em animais com polpa branca desorganizada e baixa carga parasitária, assim como a retenção destas células na polpa vermelha nos animais com polpa branca desorganizada e alta carga parasitária. É possível que neste momento as células CD4⁺ percam capacidade de migração para as suas áreas específicas, o que poderia ser uma das consequências do processo de exaustão, levando a atrofia da bainha linfática periarteriolar observada pela histopatologia. Outra hipótese seria a

de que estas células poderiam estar sofrendo apoptose, como observado nos animais avaliados, o que tem sido descrito como o estágio mais tardio do processo de exaustão (Chiku et al., 2016). De forma interessante, não houve alteração nas quantidades de células CD8⁺, IFN- γ ⁺, IL-10⁺ e Ki-67⁺.

Com base nos dados obtidos nesse estudo podemos concluir que a exaustão celular ocorreu no baço de cães, mesmo naqueles que ainda apresentavam polpa branca organizada e baixa carga parasitária. Até onde sabemos, esta é a primeira descrição da expressão de CTLA-4, TIM-3 e RNAm de LAG-3 no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Os elevados níveis de expressão destes marcadores indicam que estes devam ser considerados nos estudos de bloqueio do processo de exaustão que tenham como propósito a imunomodulação como recurso terapêutico alternativo da leishmaniose visceral canina.

6 CONCLUSÕES

- A exaustão celular é promovida pela infecção por *L. infantum* independente da carga de infecção;
- A apoptose pode ser o mecanismo envolvido na redução da bainha linfática periarteriolar, folículos linfoides, células CD4⁺ e CTLA-4⁺ no baço de cães com LV;
- Parece existir uma associação entre os marcadores de exaustão, apoptose e desorganização esplênica, redução de linfócitos CD4, falha no controle da carga parasitária e piora da enfermidade;
- Células B CD21⁺TIM-3⁺ são responsáveis pela manutenção da expressão *in situ* desse receptor mesmo com a diminuição de células CTLA-4⁺;
- Os altos níveis de expressão desses marcadores (TIM-3 e CTLA-4) indicam que estes devam ser considerados nos estudos de bloqueio do processo de exaustão que tenham como objetivo a imunomodulação como tratamento alternativo da LVC.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman HL, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 7th edition. Amsterdam: Elsevier; 2011.

Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol*. 1996. May;8(5):765-72.

Aggarwal NR, King LS, D'Alessio FR. Diverse macrophage populations mediate acute lung inflammation and resolution. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014 Apr 15;306(8):L709-25.

Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671.

Alves CF, Amorim IF, Moura EP, Ribeiro RR, Alves CF, Michalick MS, et al. Expression on IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with leishmania (*leishmania*) *chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009 Apr 15;128(4):349-58.

Alves GB, Pinho FA, Silva SM, Cruz MS, Costa FA. Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Braz J Med Biol Res*. 2010 Mar;43(3):310-5.

Amara A. Manifestations oculaires chez les chiens leishmaniens. *Point Vét*. 2003 34: 50-55.

Assis TSM, Braga ASC, Pedras MJ, Barral AM, Siqueira IC, Costa CHN, et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiol. Serv. Saúde*. 2008 17(2):107-116.

Aslan H, Oliveira F, Meneses C, Castrovinci P, Gomes R, Teixeira C, et al. New Insights Into the Transmissibility of *Leishmania infantum* From Dogs to Sand Flies: Experimental Vector-Transmission Reveals Persistent Parasite Depots at Bite Sites. *The Journal of Infectious Diseases*. *J Infect Dis*. 2016 Jun 1;213(11):1752-61.

Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol*. 2008 Jul;24(7):324-30.

Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006 Feb 9;439(7077):682-7.

Barsky S, Storino W, Salgea K, Knapp P. Cutaneous leishmaniasis: surgical management of a case with unusual clinical and histological features. *Arch Dermatol*. 1978 Sep;114(9):1354-5.

Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*. 2007 Aug; 37(10-3): 1097–1106.

Bekiaris V, Gaspar F, Kim MY, Withers DR, McConnell FM, Anderson G, et al. CD30 Is Required for CCL21 Expression and CD4 T Cell Recruitment in the Absence of Lymphotoxin Signals. *J Immunol*. 2009 Apr 15;182(8):4771-5.

Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med*. 2001 Nov 19;194(10):1497-506.

Berman J. Chemotherapy of leishmaniasis: recent advances in the treatment of visceral disease. *Curr Opin Infect Dis*. 1998 Dec;11(6):707-10.

Bern C, Haque R, Chowdhury R, Ali M, Kurkjian KM, Vaz L, et al. The epidemiology of Visceral Leishmaniasis and asymptomatic leishmanial infection in a highly endemic bangladeshi village. *Am J Trop Med Hyg*. 2007 May;76(5):909-14.

Blackburn SD, Shin H, Freeman GJ, Wherry EJ. Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by α PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 30;105(39):15016-21.

Blavier A, Keroack S, Denerolle P, Goy-Thollot I, Chabanne L, Cadoré JL, et al. Atypical forms of canine leishmaniosis. *Vet J*. 2001 Sep;162(2):108-20.

Boggiatto PM, Ramer-Tait AE, Metz K, Kramer EE, Gibson-Corley K, Mullin K, et al. Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2010 Feb;17(2):267-73.

Borja LS, Sousa OMF, Solcà MDS, Bastos LA, Bordoni M, Magalhães JT, et al. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. *Vet Parasitol*. 2016 Oct 15;229:110-117.

Brachelente C, Müller N, Doherr MG, Sattler U, Welle M. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. *Vet Pathol*. 2005 Mar;42(2):166-75.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1ª ed. 5ª reimpressão. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

Brenier-Pinchart MP, Pelloux H, Derouich-Guergour D, Ambroise-Thomas P. Chemokines in host-protozoan-parasite interactions. *Trends Parasitol*. 2001 Jun;17(6):292-6.

Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR, et al. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol*. 2003 Feb 1;170(3):1257-66.

Burova E, Allbritton O, Hong P, Dai J, Pei J, Liu MJ, et al. A novel anti-human LAG-3 antibody in combination with antihuman PD-1 (REGN2810) shows enhanced anti-

tumor activity in PD-1 x LAG-3 dual-humanized mice and favorable pharmacokinetic and safety profiles in cynomolgus monkeys. *J Immunother Cancer*. 2016, 4(Suppl 1):73

Caldas AJ, Costa JM, Silva AA, Vinhas V, Barral A. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002 Jan-Feb;96(1):21-8.

Carter L, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR, et al. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4+ and CD8+ T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol*. 2002 Mar;32(3):634-43.

Cavalcanti AS, Ribeiro-Alves M, Pereira Lde O, Mestre GL, Ferreira AB, Morgado FN, et al. Parasite load induces progressive spleen architecture breakage and impairs cytokine mRNA expression in *Leishmania infantum*-naturally infected dogs. *PLoS One*. 2015 Apr 13;10(4):e0123009.

Cesta MF. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. *Toxicol Pathol*. 2006;34(5):455-65.

CFMV 2018. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Disponível em <Disponível em <http://portal.cfmv.gov.br/noticia/index/id/4990>> Acesso em 10 jan. 2018.

Chaara D, Haouas N, Dedet JP, Babba H, Pratlong F. Leishmaniasis in Maghreb: an endemic neglected disease. *Acta Trop*. 2014 Apr;132:80-93.

Chamizo C, Moreno J, Alvar J. Semiquantitative analysis of cytokine expression. in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005 Jan 10;103(1-2):67-75.

Chen Y, Pikkarainen T, Elomaa O, Soininen R, Kodama T, Kraal G, et al. Defective Microarchitecture of the Spleen Marginal Zone and Impaired Response to a Thymus-Independent Type 2 Antigen in Mice Lacking Scavenger Receptors MARCO and SR-A. *J Immunol*. 2005 Dec 15;175(12):8173-80.

Chiku VM, Silva KL, de Almeida BF, Venturin GL, Leal AA, de Martini CC, et al. PD-1 function in apoptosis of T lymphocytes in canine visceral leishmaniasis. *Immunobiology*. 2016 Aug;221(8):879-88.

Choudhury K, Zander D, Kube M, Reinhardt R, Clos J. Identification of a *Leishmania infantum* gene mediating resistance to and Sb^{III}. *Int J Parasitol*. 2008 Oct;38(12):1411-23.

Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec*. 1997 Nov 22;141(21):539-43.

Contardi E, Palmisano GL, Tazzari PL, Martelli AM, Falà F, Fabbi M, et al. CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction. *Int J Cancer*. 2005 Nov 20;117(4):538-50.

Cosmo A, Mazzoni D, Campanati A, Magi GE, Beghelli D. Cutaneous leishmaniosis in a dog vaccinated with LiESP/QA-21: effective or defective vaccine-related immune surveillance? A case report. *Veterinari Medicina*, 62, 2017 (01): 48–51.

Costa DL, Rocha RL, Carvalho RM, Lima-Neto AS, Harhay MO, Costa CH, et al. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. *Pathog Glob Health*. 2013 Mar;107(2):78-87.

Costa T, Rossi C, Laurenti M, et al. Ocorrência de Leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. *Braz J Vet Res Animal Sci*. 2010; 3:213–217.

Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM. *Leishmania donovani* infection initiates T cell-independent chemokine responses, which are subsequently amplified in a T cell dependent manner. *Eur J Immunol*. 1999 Jan;29(1):203-14.

Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis*. 2002 Nov 1;186(9):1314-20.

Coy J, Caldwell A, Chow L, Guth A, Dow S. PD-1 expression by canine T cells and functional effects of PD-1 blockade. *Vet Comp Oncol*. 2017 Dec;15(4):1487-1502.

Cruz I, Nieto J, Moreno J, Cañavate C, Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res*. 2006 Mar;123(3):357-88.

Doe HT, Kimura D, Miyakoda M, Kimura K, Akbari M, Yui K. Expression of PD-1/LAG-3 and cytokine production by CD4(+) T cells during infection with Plasmodium parasites. *Microbiol Immunol*. 2016 Feb;60(2):121-31.

Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999; 5:1365-1369.

Durham NM, Nirschl CJ, Jackson CM, Elias J, Kochel CM, Anders RA, et al. Lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) modulates the ability of CD4 T-cells to be suppressed in vivo. *PLoS One*. 2014 Nov 5;9(11):e109080.

Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 1971 Sep;8(9):871-4.

Engwerda CR, Ato M, Cotterell SE, Mynott TL, Tschannerl A, Gorak-Stolinska PM, et al. A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during Leishmania donovani infection. *Am J Pathol*. 2002 Aug;161(2):429-37.

Esch KJ, Juelsgaard R, Martinez PA, Jones DE, Petersen CA. Programmed death 1 mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocytosis function. *J Immunol*. 2013 Dec 1;191(11):5542-50.

Farca AM, Miniscalco B, Badino P, Odore R, Monticelli P, Trisciuglio A, et al. Canine leishmaniasis: In vitro efficacy of miltefosine and marbofloxacin alone or in combination with allopurinol against clinical strains of Leishmania infantum. *Parasitol Res*. 2012 Jun;110(6):2509-13.

Figueiredo FB, Bonna ICB, Nascimento LD, Costa T, Baptista C, Pacheco TMV, et al. Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-Leishmania em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009. 42(2):141-145.

Flecken T, Sarobe P. Tim-3 expression in tumour-associated macrophages: A new player in HCC progression. *Gut.* 2015 64:1502-1503.

Fourcade J, Sun Z, Pagliano O, Chauvin JM, Sander C, Janjic B, et al. PD-1 and Tim-3 regulate the expansion of tumor antigen-specific CD8⁺ T cells induced by melanoma vaccines. *Cancer Res.* 2014 Feb 15;74(4):1045-55.

Fraga DB, Solcà MS, Silva VM, Borja LS, Nascimento EG, Oliveira GG, et al. Temporal distribution of positive results of tests for detecting Leishmania infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian tropics: A 13 years survey and association with human disease. *Vet Parasitol.* 2012 Dec 21;190(3-4):591-4.

Freeman GJ, Casasnovas JM, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM genes: A family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2010 May;235(1):172-89.

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2000 Oct 2;192(7):1027-34.

Frézard, FJG. A caminho da cura da leishmaniose visceral canina. In: Lipossomas como sistemas carreadores de fármacos para o tratamento da leishmaniose visceral canina. Brasília, DF: IBICT, Canal Ciência, 2015. Disponível em:http://www.canalciencia.ibict.br/pesquisa/0295_A_caminho_da_cura_da_leishmaniose_viscerai_canina.html. Acesso em 29 de dezembro de 2017.

Ghalib HW, Piuvezam MR, Skeiky YA, Siddig M, Hashim FA, el-Hassan AM, et al. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. J Clin Invest. 1993 Jul;92(1):324-9.

Gharbi M, Mhadhbi M, Rejeb A, Jaouadi K, Rouatbi M, Darghouth MA. Leishmaniosis (*Leishmania infantum* infection) in dogs. Rev Sci Tech. 2015 Aug;34(2):613-26.

Goldberg MV, Maris CH, Hipkiss EL, Flies AS, Zhen L, Tuder RM, et al. Role of PD-1 and its ligand, B7-H1, in early fate decisions of CD8 T cells. Blood. 2007 Jul 1;110(1):186-92.

Gomes NA, Gattass CR, Barreto-De-Souza V, Wilson ME, DosReis GA. TGF-beta mediates CTLA-4 suppression of cellular immunity in murine kalaazar. J Immunol. 2000 Feb 15;164(4):2001-8.

Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. Rev Soc Bras Med Trop. 2003 36(1):71-80.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil. Rev Bras Epidemiol. 2004 7(3):338-349.

Gordon S, Martinez FO. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. Immunity. 2010 May 28;32(5):593-604.

Goto H, Lindoso JA. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. Braz J Med Biol Res. 2004 Apr;37(4):615-23.

Gray, M. et al. 31 st Annual meeting and associated programs of the Society for Immunotherapy of Cancer (SITC 2016): part two. J Immunother Cancer. 2016, 4(Suppl 1):73

Greene CE. Infectious diseases of the dog and cat. Saint Louis: 4th Ed. Saunders, 2012.

Gretz JE, Norbury CC, Anderson AO, Proudfoot AE, Shaw S. Lymph-borne Chemokines and Other Low Molecular Weight Molecules Reach High Endothelial Venules via Specialized Conduits While a Functional Barrier Limits Access to the Lymphocyte Microenvironments in Lymph Node Cortex. *J Exp Med.* 2000 Nov 20;192(10):1425-40.

Grimaldi G Jr, Teva A, Ferreira AL, dos Santos CB, Pinto Id, de-Azevedo CT, et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012 Jan;106(1):54-9.

Hailu A, van der Poll T, Berhe N, Kager PA. Elevated plasma levels of interferón (IFN)-gamma, IFN-gamma inducing cytokines, and IFN-gamma inducible CXC chemokines in visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Nov;71(5):561-7.

Handler MZ, Patel PA, Kapila R, Al-Qubati Y, Schwartz R. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: clinical perspectives. *J Am Acad Dermatol.* 2015 Dec;73(6):897-908.

Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH, Allison JP. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature.* 1992 Apr 16;356(6370):607-9.

He Y, Rivard CJ, Rozeboom L, Yu H, Ellison K, Kowalewski A, et al. Lymphocyte-activation gene-3, an important immune checkpoint in cancer. *Cancer Sci.* 2016 Sep;107(9):1193-7.

Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 2007;8(2):R19

Hiepe F, Dörner T, Hauser AE, Hoyer BF, Mei H, Radbruch A. Long-lived autoreactive plasma cells drive persistent autoimmune inflammation. *Nat Rev Rheumatol.* 2011 Mar;7(3):170-8.

Hofmeyer KA, Jeon H, Zang X. The PD-1/PD-L1 (B7-H1) Pathway in Chronic Infection-Induced Cytotoxic T Lymphocyte Exhaustion. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:451694.

Hopps E, Caimi G. Matrix metalloproteinases in metabolic syndrome. *Eur J Intern Med.* 2012 Mar;23(2):99-104.

Hosein S, Rodríguez-Cortés A, Blake DP, Allenspach K, Alberola J, Solano-Gallego L. Transcription of Toll-Like Receptors 2, 3, 4 and 9, FoxP3 and Th17 Cytokines in a Susceptible Experimental Model of Canine *Leishmania infantum* Infection. *PloS One.* 2015;10(10):e0140325.

Ihلامulla RL, Rajapaksa US, Karunaweera ND. Microculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions – Sri lankan experience. *Ann Trop Med Parasitol.* 2005 Sep;99(6):571-5.

Ishida M, Iwai Y, Tanaka Y, Okazaki T, Freeman GJ, Minato N, et al. Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunol Lett.* 2002 Oct 21;84(1):57-62.

Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 1992 Nov;11(11):3887-95.

Joshi T, Rodriguez S, Perovic V, Cockburn IA, Stäger S. B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8(+) T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections. *PLoS Pathog.* 2009 May;5(5):e1000431.

Jost S, Moreno-Nieves UY, Garcia-Beltran WF, Rands K, Reardon I, Toth A, et al. Dysregulated Tim-3 expression on natural killer cells is associated with increased Galectin-9 levels in HIV-1 infection. *Retrovirology.* 2013 Jul 18;10:74.

Ju Y, Hou N, Meng J, Wang X, Zhang X, Zhao D, et al. T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-3 (Tim-3) mediates natural killer cell suppression in chronic hepatitis B. *J Hepatol.* 2010 Mar;52(3):322-9.

Karp CL, el-Safi SH, Wynn TA, Satti MM, Kordofani AM, Hashim FA, et al. In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. J Clin Invest. 1993 Apr;91(4):1644-8.

Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. Nat Rev Microbiol. 2011 Jul 11;9(8):604-15.

Kenney RT, Sacks DL, Gam AA, Murray HW, Sundar S. Splenic cytokine responses in Indian kala-azar before and after treatment. J Infect Dis. 1998 Mar;177(3):815-8.

Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Pinelli E, Del Real G, Molina R, Vitutia MM, et al. A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies. Parasite. 1994 Dec;1(4):311-8.

Konttinen YT, Pajarinen J, Takakubo Y, Gallo J, Nich C, Takagi M, et al. Macrophage Polarization and Activation in Response to Implant Debris: Influence by "Particle Disease" and "Ion Disease". J Long Term Eff Med Implants. 2014;24(4):267-81.

Koutinas AF, Carlotti DN, Koutinas C, Papadogiannakis EI, Spanakos GK, Saridomichelakis MN. Claw histopathology and parasitic load in natural cases of canine leishmaniosis associated with *Leishmania infantum*. Vet Dermatol. 2010 Dec;21(6):572-7.

Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. J Exp Med. 1995 Aug 1;182(2):459-65.

Kulkarni MM, Barbi J, McMaster WR, Gallo RL, Satoskar AR, McGwire BS. Mammalian antimicrobial peptide influences control of cutaneous *Leishmania* infection. Cell Microbiol. 2011 Jun;13(6):913-23.

Kuper DF, De Heer E, Van Loveren H, Vos JG. Immune System. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA. Handbook of Toxicologic Pathology. San Diego: Academic Press, 2002. p.585-646.

Lachaud L, Dereure J, Chabbert E, Reynes J, Mauboussin JM, Oziol E, et al. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral Leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *J Clin Microbiol*. 2000 Jan;38(1):236-40.

Lafferty KJ, Cunningham AJ. A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1975;53:27-42.

Latchman Y, Wood CR, Chernova T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001;2:261-268.

Lemos CS. Caracterização in situ da resposta imune granulomatosa *Leishmania braziliensis* em lesões dérmicas, crônicas no primata macaca mulata [tese]. Rio de Janeiro: IOC-FIOCRUZ; 2010.

Liang SC, Latchman YE, Buhmann JE, Tomczak MF, Horwitz BH, Freeman GJ, et al. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol*. 2003 Oct;33(10):2706-16.

Lima IS, Silva JS, Almeida VA, Junior FG, Souza PA, Larangeira DF, et al. Severe Clinical Presentation of Visceral Leishmaniasis in Naturally Infected Dogs with Disruption of the splenic white pulp. *PLoS One*. 2014 Feb 3;9(2):e87742.

Lima VMF, Fattori KR, Souza F, Eugênio FR, Santos PSP, Rozza DB, et al. Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral blood of naturally infected dogs. *L. (L.) chagasi* *Vet Parasitol* 2012; 184(2-4): 147-153.

Liu W, Tang L, Zhang G, Wei H, Cui Y, Guo L, et al. Characterization of a novel C-type lectin-like gene, LSECtin: demonstration of carbohydrate binding and expression in sinusoidal endothelial cells of liver and lymph node. *J Biol Chem*. 2004 Apr 30;279(18):18748-58.

Loke P, Allison JP. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 29;100(9):5336-41.

Lokmic Z, Lämmermann T, Sixt M, Cardell S, Hallmann R, Sorokin L. The extracellular matrix spleen as a potential organizer of immune cell compartments. *Semin Immunol.* 2008 Feb;20(1):4-13.

Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Dec 1;3(12).

Maciel BL, Lacerda HG, Queiroz JW, Galvão J, Pontes NN, Dimenstein R, et al. Association of nutritional status with the response to infection with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg.* 2008 Oct;79(4):591-8.

Maekawa N, Konnai S, Okagawa T, Nishimori A, Ikebuchi R, Izumi Y, et al. Immunohistochemical Analysis of PD-L1 Expression in Canine Malignant Cancers and PD-1 Expression on Lymphocytes in Canine Oral Melanoma. *PLoS One.* 2016 Jun 8;11(6):e0157176.

Manna L, Paciello O, Morte RD, Gravino AE. Detection of *Leishmania* parasites in the testis of a dog affected by orchitis: case report. *Parasit Vectors.* 2012 Sep 28;5:216.

Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD, et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2004 Nov 10;125(3-4):251-62.

Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today.* 1999 Jun;20(6):254-7.

Manzillo V, Oliva G, Pagano A, Manna L, Maroli M, Gradoni L. Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. *Vet Parasitol.* 2006 Nov 30;142(1-2):142-5.

Manzo A, Bugatti S, Caporali R, Prevo R, Jackson DG, Ugucioni M, et al. CCL21 Expression Pattern of Human Secondary Lymphoid Organ Stroma Is Conserved in Inflammatory Lesions with Lymphoid Neogenesis. *Am J Pathol.* 2007 Nov;171(5):1549-62.

Martín-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-Pérez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Márquez F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet Parasitol.* 2007 Apr 30;145(3-4):267-73.

Martinetti L. Dépistage, traitement et prévention de la leishmaniose canine en Corse : enquête auprès des vétérinaires praticiens de l'île [Tese]. Toulouse: École Nationale Vétérinaire de Toulouse; 2013.

Martinic MM, von Herrath MG. Novel strategies to eliminate persistent viral infections. *Trends Immunol.* 2008 Mar;29(3):116-24.

McMahon-Pratt D, Alexander J. Does the *Leishmania* major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? *Immunol Rev.* 2004 Oct;201:206-24.

Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol.* 2005 Aug;5(8):606-16.

Melo FA, Moura EP, Ribeiro RR, Alves CF, Caliarí MV, Tafuri WL, et al. Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Int J Exp Pathol.* 2009 Oct;90(5):538-48.

Melo GD, Marangoni NR, Marcondes M, Lima VM, Machado GF. High levels of serum matrix metalloproteinases in dogs with natural visceral leishmaniasis: a preliminary report. *Vet J.* 2011 May;188(2):243-5.

Melo GD, Seraguci TF, Schweigert A, Silva JE, Grano FG, Peiró JR, et al. Pro-inflammatory cytokines predominate in the brains of dogs with visceral leishmaniasis: A natural model of neuroinflammation during systemic parasitic infection. *Vet Parasitol.* 2013 Feb 18;192(1-3):57-66.

Mendes RS, Gurjão TA, Oliveira LM, Santana VL, Tafuri WL, Santos JRS, et al. Miocardite crônica em um cão naturalmente infectado com *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi: aspectos clínicos e patológicos. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2014 66(1):79-84.

Miralles GD, Stoeckle MY, McDermott DF, Finkelman FD, Murray HW. Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun.* 1994 Mar;62(3):1058-63.

Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniasis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol.* 2008 Aug;24(8):371-7.

Mondelaers A, Sanchez-Cañete MP, Hendrickx S, Eberhardt E, Garcia-Hernandez R, Lachaud L, et al. Genomic and Molecular Characterization of Miltefosine Resistance in *Leishmania infantum* Strains with Either Natural or Acquired Resistance through Experimental Selection of Intracellular Amastigotes. *PLoS One.* 2016 Apr 28;11(4):e0154101.

Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, Ryu A, Waldner H, Chernova T, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature.* 2002 Jan 31;415(6871):536-41.

Moreira PR, Bandarra Mde B, Magalhães GM, Munari DP, Machado GF, Prandini MM, et al. Influence of apoptosis on the cutaneous and peripheral lymph node inflammatory response in dogs with visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2013 Feb 18;192(1-3):149-57.

Moreira PR, Fernando FS, Montassier HJ, André MR, de Oliveira Vasconcelos R. Polarized M2 macrophages in dogs with visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2016 Aug 15;226:69-73.

Moreira PR, Franciscato DA, Rossit SM, Munari DP, Vasconcelos Rde O. Influence of apoptosis on liver and spleen resistance in dogs with visceral leishmaniasis. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2016 Jul-Sep;25(3):342-7.

Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 2002 Sep;18(9):399-405.

Morgado FN, Cavalcanti AD, Miranda LH, O'Dwyer LH, Silva MR, Menezes RC, et al. Hepatozoon canis and Leishmania spp. coinfection in dogs diagnosed with visceral leishmaniasis. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2016 Oct-Dec;25(4):450-458.

Murphy ML, Cotterell SE, Gorak PM, Engwerda CR, Kaye PM. Blockade of CTLA-4 enhances host resistance to the intracellular pathogen, Leishmania donovani. *J Immunol.* 1998 Oct 15;161(8):4153-60.

Nascimento MS, Albuquerque TD, Do-Valle-Matta MA, Caldas IS, Diniz LF, Talvani A, et al. Naturally Leishmania infantum-infected dogs display an overall impairment of chemokine and chemokine receptor expression during visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2013 Jun 15;153(3-4):202-8.

Nascimento MSL, Albuquerque TDR, Nascimento AFS, Caldas IS, Do-Valle Matta MA, Souto JT, et al. Impairment of Interleukin-17A Expression in Canine Visceral Leishmaniasis is Correlated with Reduced Interferon- γ and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression. *J Comp Pathol.* 2015;153(4):197–205.

O'Connell TX, Horita TJ, Kasravi B. Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. *Am Fam Physician.* 2005 Jan 1;71(1):105-12.

Okagawa T, Konnai S, Ikebuchi R, Suzuki S, Shirai T, Yuji Sunden Y, et al. Increased bovine Tim-3 and its ligand expressions during bovine leukemia virus infection. *Vet Res.* 2012; 43(1): 45.

Okamura T, Fujio K, Sumitomo S, Yamamoto K. Roles of LAG3 and EGR2 in regulatory T cells. *Ann Rheum Dis.* 2012 Apr;71 Suppl 2:i96-100.

Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, Fagarasan S, Honjo T. A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat Immunol*. 2013 Dec;14(12):1212-8.

Okazaki T, Honjo T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol*. 2006 Apr;27(4):195-201.

Oliva G, Nieto J, Foglia Manzillo V, Cappiello S, Fiorentino E, Di Muccio T, et al. A randomised, double-blind, controlled efficacy trial of the LiESP/QA-21 vaccine in naïve dogs exposed to two *Leishmania infantum* transmission seasons. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Oct 9;8(10):e3213.

Oliveira GM, Madeira Mde F, Oliveira FS, Pires MQ, Pacheco Rda S. Canine Cutaneous Leishmaniasis: Dissemination and Tissue Tropism of Genetically Distinct *Leishmania (Viannia) braziliensis* Populations. *Vet Med Int*. 2013;2013:982183.

Oliveira VVG, Alves LC, Junior VAS. Genital pathologies associated with canine visceral leishmaniasis. *Ciênc Rural*. 2012; 42(9):1614-1620.

Otranto D, Dantas-Torres F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends Parasitol*. 2013 Jul;29(7):339-45.

Palomino JC, Guerra H, Lumbreras H. A Selective liquid Medium for Primary Isolation of South American Leishmanias. *Tropenmed Parasitol*. 1983 Dec;34(4):229-32.

Papadogiannakis EI, Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Vlemmas J, Lekkas S, Karameris A, et al. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *Vet Immunol Immunopathol*. 2005 Apr 8;104(3-4):227-37.

Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*. 2005 Nov;25(21):9543-53.

Petersen CA. Leishmaniasis, an emerging disease found in companion animals in the United States. *Top Companion Anim Med.* 2009 Nov;24(4):182-8.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1;29(9):e45.

Phong BL, Avery L, Sumpter TL, Gorman JV, Watkins SC, Colgan JD, et al. Tim-3 enhances FcεRI-proximal signaling to modulate mast cell activation. *J Exp Med.* 2015 Dec 14;212(13):2289-304.

Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenbergh J. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun.* 1994 Jan;62(1):229-35.

Pirajá GV, Lucheis SB. A vigilância epidemiológica de flebo-tomíneos no planejamento de ações de controle nas leishmanioses. *Vet e Zootec.* 2014 Dez; 21(4): 503-515.

Piscopo TV, Mallia Azzopardi C. Leishmaniasis. *Postgrad Med J.* 2007 Feb;83(976):649-57.

Porrozzi R, Cavalcanti AS, Cupolillo E. Modelos experimentais na Leishmaniose Visceral. 1ª edição. In: Conceição-Silva F, Alves CR. *Leishmanioses do continente americano*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014. p. 277-292.

Prina E, Roux E, Mattei D, Milon G. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes Infect.* 2007 Sep;9(11):1307-15.

Quinnell RJ, Courtenay O, Shaw MA, Day MJ, Garcez LM, Dye C, et al. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2001 May 1;183(9):1421-4.

Rallis T, Day MJ, Saridomichelakis MN, Adamama-Moraitou KK, Papazoglou L, Fytianou A, et al. Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (*Leishmania*

infantum): a clinicopathological study of 26 cases. *J Comp Pathol.* 2005 Feb-Apr;132(2-3):145-52.

Ready PD. Leishmaniasis emergence and climate change. In: de la Roque S (ed.). *Climate change: The impact on the epidemiology and control of animal diseases.* Rev SciTech Off Int Epiz. 2008 27: 399-412.

Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso NS, Caracappa S, Vesco G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J Clin Microbiol.* 1999 Sep;37(9):2931-5.

Reiner SL, Locksley RM. The Regulation of Immunity to *Leishmania Major*. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:151-77.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009 Mar 15;128(1-3):87-95.

Ribeiro JM, Rossignol PA, Spielman A. Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.* 1986;83(4):683-6.

Ribeiro-Gomes FL, Sacks D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012 May 4;2:59.

Ritter U, Moll H, Laskay T, Brocker E, Velazco O, Becker I, et al. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1996 Mar;173(3):699-709.

Rodríguez-Cortés A, Carrillo E, Martorell S, Todolí F, Ojeda A, Martínez-Flórez A, et al. Compartmentalized Immune Response in Leishmaniasis: Changing Patterns throughout the Disease. *Plos one.* 2016. V.37. P. 683-693.

Rodriguez-Manzanet R, Sanjuan MA, Wu HY, Quintana FJ, Xiao S, Anderson AC, et al. T and B cell hyperactivity and autoimmunity associated with niche-specific defects in apoptotic body clearance in TIM-4-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 May 11;107(19):8706-11.

Rogers KA, Titus RG. Immunomodulatory effects of *Maxadilan* and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. *Parasite Immunol*. 2003 Mar;25(3):127-34.

Rollins, BJ. Chemokines. *Blood*. 1997 Aug 1;90(3):909-28.

Rousseau D, Demartino S, Anjuere F, Ferrua B, Fragaki K, Le Fichoux Y, et al. Sustained parasite burden in the spleen of *Leishmania infantum*-infected BALB/c mice is accompanied by expression of MCP-1 transcripts and lack of protection against challenge. *Eur Cytokine Netw*. 2001 Apr-Jun;12(2):340-7.

Roy S, Gupta P, Palit S, Basu M, Ukil A, Das PK. The role of PD-1 in regulation of macrophage apoptosis and its subversion by *Leishmania donovani*. *Clin Transl Immunology*. 2017 May 5;6(5):e137.

Sacks DL, Kenney RT, Kreutzer RD, Jaffe CL, Gupta AK, Sharma MC, et al. Indian kala-azar caused by *Leishmania tropica*. *Lancet*. 1995 Apr 15;345(8955):959-61.

Saito H, Yokoi Y, Watanabe S, Tajima J, Kuroda H, Namihisa T. Reticular meshwork of the spleen in rats studied by electron microscopy. *Am J Anat*. 1988 Mar;181(3):235-52.

Sánchez-Fueyo A, Tian J, Picarella D, Domenig C, Zheng XX, Sabatos CA, et al. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nat Immunol*. 2003 Nov;4(11):1093-101.

Santana CC, Vassallo J, de Freitas LA, Oliveira GG, Pontes-de-Carvalho LC, dos-Santos WL. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. *Parasite Immunol*. 2008 Oct;30(10):515-24.

Saporito L, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C. Visceral Leishmaniasis: Host-parasite interaction and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. *Int J Infect Dis.* 2013 Aug;17(8):e572-6.

Schantz PM, Steurer FJ, Duprey ZH, Kurpel KP, Barr SC, Jackson JE, et al. Autochthonous visceral leishmaniasis in dogs in North America. *J Am Vet Med Assoc.* 2005 Apr 15;226(8):1316-22.

Schaut RG, Lamb IM, Toepp AJ, Scott B, Mendes-Aguiar CO, Coutinho JF, et al. Regulatory IgDhi B Cells Suppress T Cell Function via IL-10 and PD-L1 during Progressive Visceral Leishmaniasis. *J Immunol.* 2016 May 15;196(10):4100-9.

Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J Exp Med.* 1988 Nov 1;168(5):1675-84.

Sevá AP, Ovallos FG, Amaku M, Carrillo E, Moreno J, Galati EA, et al. Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *PLoS One.* 2016 Jul 29;11(7):e0160058.

Scheipers P, Reiser H. Fas-independent death of activated CD4(+) T lymphocytes induced by CTLA-4 crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Aug 18;95(17):10083-8.

Silva FM, Santos EM, Torres SM, Yamasak EM, Ramos RA, Alves LC. Parasite load in intact and ulcerative skin of dogs with leishmaniasis. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2016 Jan-Mar;25(1):127-30.

Silva JS, Andrade AC, Santana CC, Santos LQ, Oliveira CI, Veras PS, et al. Low CXCL13 expression, splenic lymphoid tissue atrophy and germinal center disruption in severe canine visceral leishmaniasis. *PLoS One.* 2012;7(1):e29103.

Silva LC, Castro RS, Figueiredo MM, Michalick MS, Tafuri WL, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease. *Int J Exp Pathol*. 2013 Apr;94(2):133-43.

Silva MR, Stewart JM, Costa CH. sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2005 Jun;72(6):811-4.

Silva-O'Hare J, de Oliveira IS, Klevorn T, Almeida VA, Oliveira GG, 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 May 31;11(5):e0156733.

Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2009 Oct 28;165(1-2):1-18.

Solano-Gallego L, Montserrat-Sangrà S, Ordeix L, Martínez-Orellana P. Leishmania infantum-specific production of IFN- γ and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2016 Jun 3;9(1):317.

Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of Leishmania infantum infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol*. 2001 Feb;39(2):560-3.

Solano-Gallego L, Rodríguez-Cortés A, Iniesta L, Quintana J, Pastor J, Espada Y, et al. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. *Am J Trop Med Hyg*. 2007 Apr;76(4):676-80.

Steiniger B, Timphus EM, Barth PJ. The splenic Marginal zone humans and rodents: an enigmatic compartment and its inhabitants. *Histochem Cell Biol*. 2006 Dec;126(6):641-8.

Stone HH, Tool CD, Pugsley WS. Kala-azar (visceral leishmaniasis): report of a case with 34 month incubation period and positive Doan-Wright test. *Ann Intern Med*. 1952 Feb;36(2:2):686-93.

Strauss-Ayali D, Baneth G, Shor S, Okano F, Jaffe CL. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. *Int J Parasitol*. 2005 Jan;35(1):63-73.

Talmi-Frank D, Nasereddin A, Schnur LF, Schönian G, Töz SO, Jaffe CL, et al. Detection and identification of old world *Leishmania* by high resolution melt Analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Jan 12;4(1):e581.

Tangye SG. Staying alive: regulation of plasma cell survival. *Trends Immunol*. 2011 Dec;32(12):595-602.

Teixeira MJ, Teixeira CR, Andrade BB, Barral-Netto M, Barral A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol*. 2006 Jan;22(1):32-40.

Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, Pai SI, et al. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med*. 2001 Apr 2;193(7):839-46.

Vega-López F. Diagnosis of cutaneous Leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis*. 2003 Apr;16(2):97-101.

Veress B, Omer A, Satir AA, El Hassan, AM. Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. *Immunology*. 1977 Nov;33(5):605-10.

Vidor E, Dereure J, Pratlong F, Dubreuil N, Bissuel G, Moreau Y, et al. Le chancre d'inoculation dans la leishmaniose canine à *Leishmania infantum*. Étude d'une cohorte en région cévenole. *Pratiq Medic Chirur Anim Compag*. 1991;26:133-137.

Wherry EJ, Barber DL, Kaech SM, Blattman JN, Ahmed R. Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 9;101(45):16004-9.

Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. 2015 Aug;15(8):486-99.

World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva; 2010. (WHO-Technical Report Series 949).

World Health Organization. Status of endemicity of visceral leishmaniasis, worldwide, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_VL_worldwide_2015_with_imported_cases.pdf?ua=1>. Acesso em: 29 dez. 2017.

Wylie CE, Carbonell-Antoñanzas M, Aiassa E, Dhollander S, Zagmutt FJ, Brodbelt DC, et al. A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally-occurring canine leishmaniosis, part I: vaccinations. *Prev Vet Med*. 2014 Nov 1;117(1):7-18.

Xu F, Liu J, Liu D, Liu B, Wang M, Hu Z, et al. LSECTin expressed on melanoma cells promotes tumor progression by inhibiting antitumor T-cell responses. *Cancer Res*. 2014 Jul 1;74(13):3418-28.

Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, Tanno Y, et al. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol*. 2002 Nov 15;169(10):5538-45.

Zhang WW, Miranda-Verastegui C, Arevalo J, Ndao M, Ward B, Llanos-Cuentas A, et al. Development of a genetic assay to distinguish between *Leishmania viannia* species on the basis of isoenzyme differences. *Clin Infect Dis*. 2006 Mar 15;42(6):801-9.

Zaph C, Scott P. Interleukin-12 regulates chemokine gene expression during the early immune response to *Leishmania major*. *Infect Immun*. 2003 Mar;71(3):1587-9.

Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol.* 2005 Dec;6(12):1245-52.

8 ANEXOS

**8.1 Anexo 1- Correlação dos marcadores com o escore clínico.
Dados representados como mediana (valores mínimo-máximo)**

Marcador	Baixo escore clínico	Médio escore clínico	Alto escore clínico
%CD4	13,2 (0,3-62,1)	11,85 (0,3-79,8)	15,5 (21,4-29,1)
CD4/mm ²	120,9 (3,6-384)	85,35 (3,6-481,8)	137,8 (56,9-538,7)
%CD8	28,8 (8,2-53)	29 (3,9-60,3)	22,25 (11,3-55,3)
CD8/mm ²	268,4 (88,9-833,8)	304 (46,2-558,2)	200,9 (62,2-359,1)
%CD21	25,62 (5,92-57,65)	19,38 (4,69-82,08)	6,78 (3,98-15,28)
CD21/mm ²	163,56 (49,78-776,89)	304 (46,2-558,2)	92,44 (26,67-129,78)
%IFN-γ	2,36 (0-12,7)	4,09 (0,79-11,78)	2,69 (0-13,25)
IFN-γ/mm ²	37,33 (6-124,44)	23,11 (1-108,44)	34,67 (1-218,67)
%IL-10	0,6 (0,17-15)	0,85 (0,06-237)	0,45 (0,2-9)
IL-10/mm ²	39,11(14,22-2026,67)	47,11 (5,33-1564,44)	41,78 (8,89-106,67)
%TIM-3	19,08 (5,73-47,1)	28,73 (4,73-52,2)	32,45 (8,78-49,9)
TIM-3/mm ²	44,8 (9-788,1)	65,4 (6,6-891,8)	66,5 (11,4-853,3)
%CTLA-4	25,05 (1,7-35)	17,44 (0-49,7)	15,23 (0-49,2)
CTLA-4/mm ²	40,8 (17,4-808,89)	54,3 (0-607,4)	45,6 (0-485,9)
PD-1 RNAm*	12,44 (1-19,36)	5,28 (2,7-12,99)	11,03 (2,37-23,61)
PD-L1 RNAm*	2,14 (1,35-4,45)	3,56 (1,36-7,19)	2,89 (1-15,48)
PD-L2 RNAm*	4,32 (1,87-24,94)	2,1 (0-12,43)	4,86 (1,19-24,09)
LAG-3 RNAm*	12,44 (1-19,36)	5,28 (2,7-12,99)	11,03 (2,37-23,61)

*Expressão normalizada

8.2 Anexo 2- Correlação dos marcadores com a organização da polpa branca esplênica e carga parasitária. Dados representados como mediana (valores mínimo-máximo)

Marcador	Organizado/baixa carga	Desorganizado/baixa carga	Desorganizado/alta carga
%CD4	22,4 (5,2-44,9)	10,3 (0,3-64,7)	22,85 (5,2-79,8)
CD4/mm ²	248,9 (56,9-481,8)	79,1 (3,6-378,7)	200,9 (55,1-538,7)
%CD8	26,5 (13,9-42,6)	27,35 (3,9-59,5)	30,6 (20,1-60,3)
CD8/mm ²	280 (112-833,8)	237,3 (46,2-558,2)	240,9 (149,3-240,9)
%CD21	13,25 (6,29-28,18)	18,46 (3,98-82,08)	6,27 (4,69-23,81)
CD21/mm ²	146,67 (67,56-327,11)	161,78 (26,67-776,89)	95,11 (56,89-462,22)
%IFN-γ	1,6 (0-13,25)	3,33 (0-12,7)	4,21 (2,31-9,27)
IFN-γ/mm ²	24 (2-218,67)	29,34 (1-124,44)	58,67 (19,56-131,56)
%IL-10	0,59 (0,27-237)	0,83 (0,06-23,75)	0,60 (0,21-6)
IL-10/mm ²	37,33 (16-186,67)	40 (5,33-2026,67)	41,78 (8,89-104,89)
%TIM-3	23,87 (5,73-41)	29,75 (4,73-49,9)	28,73 (15,5-52,2)
TIM-3/mm ²	55,2 (9-847,41)	59,9 (6,6-853,3)	135,65 (47,8-891,8)
%CTLA-4	26,58 (7,56-35,18)	26,98 (0-49,7)	5,34 (0-29,07)
CTLA-4/mm ²	51,3 (31,8-565,9)	50 (0-808,89)	11,5 (0-269,63)
PD-1 RNAm*	10,82 (4,63-229,77)	4,21 (1-12,56)	4,34 (1,75-31,48)
PD-L1 RNAm*	4,45 (1,35-15-48)	2,47 (1-7,19)	3,15 (1,43-5,73)
PD-L2 RNAm*	4,74 (2,53-24,09)	4,27 (1-24,94)	2,61 (1,18-12,74)
LAG-3 RNAm*	12,88 (6,61-15,42)	5,28 (1-23,61)	3,76 (2,56-9,27)

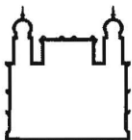
*Expressão normalizada

Organizado/baixa carga: polpa branca organizada a pouco desorganizada e baixa carga parasitária

Desorganizado/baixa carga: polpa branca com media a intensa desorganização e baixa carga parasitária

Desorganizado/alta carga: polpa branca com media a intensa desorganização e alta carga parasitária.

8.3 Anexo 3- Declaração da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

Rio de Janeiro, October 24, 2014.

Dear Mrs.

Nazare Fernanda Morgado

The Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of Oswaldo Cruz Foundation declares that research which uses tissues fragments after euthanasia, without animal manipulation does not need to be submitted for this Committee, according to Brazilian's Law 11794/08.



Octavio Augusto França Presgrave

Coordinator

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04626550

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 – Prédio da Expansão – sala 200 – Manguinhos – Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br