



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ALINE SOMBRA SANTOS**

**ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DO BAÇO NA INFECÇÃO POR *Leishmania*  
*infantum* EM CAMUNDONGOS BALB/C TRATADOS COM CXCL10**

**FORTALEZA**

**2017**

ALINE SOMBRA SANTOS

**ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DO BAÇO NA INFECÇÃO POR *Leishmania infantum* EM CAMUNDONGOS BALB/C TRATADOS COM CXCL10**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Área de concentração: Parasitologia.

Orientador: Profa. Dra. Maria Jania Teixeira.  
Coorientador: MSc. Weberty M. Eufrásio Figueiredo.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S233a Santos, Aline Sombra.  
Aspectos histopatológicos do baço na infecção por *Leishmania infantum* em camundongos BALB/C tratados com CXCL10 / Aline Sombra Santos. – 2017.  
56 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Maria Jania Teixeira.

Coorientação: Prof. Me. Weberty M. Eufrásio Figueiredo.

1. Leishmaniose Visceral. 2. Baço. 3. CXCL10. I. Título.

CDD 570

---

Aos meus pais, Josina e Arino.

A meus amados e amigos amados.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Professora Maria Jania Teixeira pelo acolhimento no Laboratório de Parasitologia, pela ótima orientação e pelos muffins.

Agradeço ao doutorando Weberty Figueiredo, melhor coorientador, que não perde tempo “colocando água pra pinto beber”, dedicado e amigo desde o primeiro dia que cheguei ao laboratório.

Agradeço à Professora Margarida Pompeu por ter criado um grupo de estudos sobre o baço e, principalmente, ter nos apresentado à Roberta Braga, a pessoa mais nerd, que “não põe água pra pinto beber”, que foi de crucial importância para a execução deste trabalho, sempre empenhada e sendo nosso motor.

Agradeço à Professora Érika Mota, pela participação na banca e que, de uma maneira ou de outra, fez parte deste trabalho durante os “insights” de imunologia.

Agradeço ao pessoal do Setor de Parasitologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal/FAMED/UFC: Naya Rodrigues e Rafael Marciano pelos conselhos acadêmicos ou não; Levi Amarante e Germana Moraes, pelo tempo que passamos juntos no laboratório; Rafaella de Paula Freire e Priscila Nascimento, pelas dicas e ensino da rotina laboratorial; os técnicos Fabíola Fernandes, Allan e Prof. Josias pela paciência para abrir a porta e ao Genil Mororó, meu novo companheiro da Biologia dentro da Parasitologia.

Agradeço ao meu grupo de amigos: Élide Almeida, Sérgio Barbosa, Ingrid Mota, Nágila Feitosa, Jamile Meira, Karoline Vieira, Stela Maris Vasconcelos e João Pedro Brasil pela insistência na necessidade de desopilar e respirar fora da UFC e pela frase mais inspiradora já dita para alguém em necessidade na Universidade “vai dar certo” que hoje é um verdadeiro lema para a turma que levarei comigo para sempre.

Agradeço à minha mãe e ao meu pai, amigos que moram longe, e aos mais íntimos por me apoiarem e me apontarem os melhores caminhos a serem seguidos, e por todos os momentos de aprendizagem, felicidade e amor compartilhados.

Agradeço a todos da Biologia que conheci e que me conheceram, pois de alguma forma, aprendi e continuo aprendendo com cada um todos os dias, seja academicamente, seja politicamente, seja biologicamente.

Agradeço ao PET Biologia sob a tutoria da Profa. Maria Izabel Gallão por todos os aprendizados inigualáveis proporcionados, pelos momentos extracurriculares que não se aprendem em disciplinas, sempre com sabedoria, elegância, compaixão e competência.

*“-Como eu sempre digo, é melhor ter dois  
corações do que um”*

**Marcus Sedgwick**

## RESUMO

A leishmaniose visceral é uma doença vetorial infecto-parasitária causada pelo protozoário intracelular obrigatório do gênero *Leishmania* sp., sendo prevalente no Brasil a espécie *Leishmania infantum* (*syn. chagasi*). Trata-se de uma antroponose grave de curso fatal que mata 95% das pessoas não tratadas, após diagnóstico, em até 2 anos. Canídeos, felídeos e marsupiais também são hospedeiros de *Leishmania* sp. Quando presentes, os principais sintomas e achados laboratoriais são febre irregular, palidez, anemia, pancitopenia, hepatoesplenomegalia, anorexia e caquexia. O acometimento do fígado e do baço são os principais responsáveis por imunossuprimir o hospedeiro, expondo-o a coinfeções. O curso infeccioso no baço ainda apresenta muitos aspectos a serem desvendados, principalmente naquilo que concerne sua microarquitetura comprometida frente à persistência parasitária. O tratamento com a quimiocina CXCL10 vem sendo investigado por apresentar um potencial efeito protetor em leishmaniose. O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação da infecção por *L. infantum* com a microestrutura do baço em camundongos BALB/c tratados com CXCL10, e correlacionar com uma possível ação protetora de CXCL10. Grupos de camundongos BALB/c (n=36) infectados com *L. infantum* foram tratados (n=18) ou não (n=18) com CXCL10 (5 µg/kg, via i.p.) com 1, 3 e 7 dias de infecção. Após 10, 30 e 45 dias de infecção, Cortes histológicos dos baços foram corados com Hematoxilina-Eosina e impregnados por AgNO<sub>3</sub> (reticulina) para avaliar: (i) proliferação linfóide da polpa branca, (ii) quantidade e qualidade das estruturas da polpa branca, (iii) condição da microarquitetura esplênica, e (iv) celularidade da polpa vermelha. A análise compreendeu estatística descritiva e inferencial, utilizando o software estatístico de licença aberta R® e o software de licença aberta ImageJ®. Os resultados mostraram que o tratamento com CXCL10 manteve a organização da polpa branca do baço aos 30 dias pós-infecção e preservou os centros germinativos dos folículos linfóides aos 10 e 45 dias pós-infecção, indicando a prevenção de uma maior ruptura da arquitetura esplênica com relativa reatividade do órgão frente ao patógeno. Não houve menor perda significativa de celularidade da polpa vermelha e nem efeito da quimiocina sobre a proliferação linfóide da polpa branca. Em suma, CXCL10 é uma quimiocina com grande potencial para o tratamento das leishmanioses e este trabalho indica o potencial para novos estudos com esta e outras quimiocinas com efeito imunomodulador.

**Palavras-chave:** Leishmaniose Visceral, Baço, CXCL10.

## ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is an infectious-parasitic vectoral disease caused by the obligate intracellular protozoa from the genus *Leishmania* sp., being *Leishmania infantum* (syn. *chagasi*) prevalent in Brazil. It's a fatal anthroponosis, which kills 95% of the untreated people in 2 years after diagnosis. Canids, felids and marsupials are also hosts of *Leishmania* sp. When present, the main symptoms are irregular fever, pallor, anaemia, pancytopenia, hepatosplenomegaly, anorexia and cachexia. The involvement of the liver and the spleen is the main immunosuppressing effect on the host, exposing it to coinfections. The infectious course in the spleen still presents many aspects to be uncovered, mainly in what concerns its impaired microarchitecture against the parasite's persistence. The treatment with the chemokine CXCL10 is investigated because of it's potencial protecting effect against leishmaniasis. The goal of this analysis was to evaluate the relation between the *L. infantum* infection with the microarchitecture of the spleen in BALB/c mice treated with CXCL10 and to correlate with a possible protective action of CXCL10. Groups of BALB/c mice (n=36) infected with *L. infantum* were treated (n=18) or not (n=18) with CXCL10 (5  $\mu$ g/kg, via i.p.) on days 1, 3, and 7 after infection and 10, 30 and 45 days after infection. Hematoxylin-Eosin staining and impregnation by AgNO<sub>3</sub> (reticulin) on histological spleen slides were performed to assess: (i) lymphoid proliferation of white pulp, (ii) quantity and quality of white pulp structures, (iii) condition of the splenic microarchitecture according to Santana et al. 2008 and (iv) cellularity of the red pulp. The analysis comprised descriptive and inferential statistics using open statistical R® software and open imagej® software. The results showed that the treatment kept the organization of the white pulp of the spleen 30 days after infection and kept the germinal centers of lymphoid follicles 10 and 45 days after infection, indicating the prevention of a bigger rupture of the splenic microarchitecture with relative reaction of the organ against the pathogen. There was no reduction of the loss of the red pulp cellularity and no effect of the chemokine on the lymphoid proliferation of the white pulp. In short, CXCL10 is a chemokine with great potential for the treatment of leishmaniasis and this work opens an avenue to new studies with this or other chemokines presenting immunomodulating effects.

**Keywords:** Visceral Leishmaniasis, Spleen, CXCL10.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida de *Leishmania* sp. contemplando uma visão celular do processo de diferenciação do parasito no estômago da mosca e sua transformação de promastigotas em amastigotas dentro do fagócito.

Figura 2 – Fases da infecção murina por *L. donovani* no fígado e no baço.

Figura 3 – Perfis de resposta imune de cura e de não cura frente à infecção por *Leishmania major*.

Figura 4 – Mudanças na arquitetura do baço durante a infecção crônica.

Figura 5 – Cinética da carga parasitária e diferentes estágios de maturação dos granulomas no fígado após infecção experimental com *Leishmania infantum*.

Figura 6 - Desenho esquemático da condução do experimento. G1-TTD: grupo 1 de animais infectados tratados (n=18). G2-NTTD: grupo 2 de animais infectados não tratados (n=18). Dpi: dias pós-infecção. Dpt: dias pós-tratamento.

Figura 7 – Fotomicrografias panorâmicas de baço (4x). A: G1- 10 dias pós infecção. B: G2 – 10 dias pós infecção. C: G1 – 30 dias pós infecção. D: G2 – 30 dias pós infecção. E: G1 – 45 dias pós infecção. F: G2 – 45 dias pós infecção.

Figura 8 – Fotomicrografias de polpa vermelha do baço (1000x). A: G1- 10 dias pós infecção. B: G2 – 10 dias pós infecção. C: G1 – 30 dias pós infecção. D: G2 – 30 dias pós infecção. E: G1 – 45 dias pós infecção. F: G2 – 45 dias pós infecção.

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Proliferação linfóide nos grupos experimentais correspondentes aos dias pós infecção. N-infec= Animais sadios controle; InfecTTD= Animais infectados e tratados com CXCL10 (G1); InfecNTTD= Animais infectados e não tratados (G2).

Gráfico 2 – Comparação de valores medianos de centros germinativos encontrados por amostra dos grupos 10dpi, 30 dpi e 45 dpi.

Gráfico 3 - Evolução das densidades celulares proporcionais médias da polpa vermelha através dos tempos de tratamento. N-infec= Animais sadios controle; InfecTTD= Animais infectados e tratados com CXCL10 (G1);-InfecNTTD= Animais infectados e não tratados (G2).

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Porcentagens médias de polpa branca por área ( $\text{mm}^2$ ) histológica analisada. Valores de p significativos pelo teste de Kruskal-Wallis. Diferenças significativas apenas entre os grupos não infectados e infectados, independentes do tratamento. D.p.i. = dias pós infecção.

Tabela 2 - Densidade celular proporcional média por recorte de campo de 100x (área de aproximadamente  $0.093\text{mm}^2$ ). Valores de p significativos ( $p < 0.05$ ) pelo ANOVA One Way, para diferenças entre infectados e não infectados. Não houve diferenças significativas entre os infectados tratados e não tratados.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AgNO<sub>3</sub>: Nitrato de prata

CCR7: Receptor de quimiocina C-C 7

CCL2: Ligante de quimiocina C-C 2

CCL3: Ligante de quimiocina C-C 3

CCL19: Ligante de quimiocina C-C 19

CCL21: Ligante de quimiocina C-C 21

CD: Células Dendríticas

CEPA-UFC: Comissão de Ética em Pesquisa Animal – Universidade Federal do Ceará

CG: Centro Germinativo

CK: Célula de Kupffer

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CONITEC: Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS

CXCL10: Ligante de quimiocina C-X-C 10

D. p. i.: Dias pós infecção

FDC: Célula dendríticas folicular

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

IFN- $\gamma$ : Interferon Gama

IL-4: Interleucina 4

IL-12: Interleucina 12

IL-10: Interleucina 10

IL-13: Interleucina 13

IP: Intraperitoneal

L.: Leishmania

LC: Leishmaniose Cutânea

LCL: Leishmaniose Cutânea Localizada

LCD: Leishmaniose Cutânea Difusa

LDPK: Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar

LM: Leishmaniose Mucocutânea

LT-  $\alpha$  : Linfotoxina Alpha

LV: Leishmaniose Visceral

LVH: Leishmaniose Visceral Humana

MZM: Macrófagos da Zona Marginal

MMM: Macrófagos Metalofílicos Marginais

NO: Óxido Nítrico

NK: Natural Killer

NKT: Célula T Natural Killer

OMS (WHO): Organização Mundial de Saúde

PAHO-WHO: Organização Pan-americana de Saúde - Organização Mundial de Saúde

PALS: Bainha linfocítica periarteriolar

SMF: Sistema Fagócito Mononuclear

SM: Sino Marginal

Sp.: Espécie

SUS: Sistema Único de Saúde

TGF- $\beta$ : Fator de Transformação do Crescimento Beta

Th1: T helper 1

Th2: T helper 2

TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral Alpha

ZM: Zona marginal

## LISTA DE SÍMBOLOS

® Marca Registrada

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>As leishmanioses</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2.</b>	<b>Leishmaniose visceral</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2.1.</b>	<b>Roedores como modelos experimentais</b> .....	<b>7</b>
<b>1.2.2.</b>	<b>A imunopatologia da LV em camundongos BALB/c e a quimiocina CXCL10</b> .....	<b>9</b>
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>17</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1.</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2.</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>18</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
<b>4.1.</b>	<b>Aspectos éticos</b> .....	<b>19</b>
<b>4.2.</b>	<b>Parasitas</b> .....	<b>19</b>
<b>4.3.</b>	<b>Desenho experimental</b> .....	<b>19</b>
<b>4.4.</b>	<b>Infecção e tratamento</b> .....	<b>20</b>
<b>4.5.</b>	<b>Eutanásia, necropsia e processamento histológico</b> .....	<b>21</b>
<b>4.6.</b>	<b>Análise histopatológica</b> .....	<b>21</b>
<b>4.6.1.</b>	<b>Polpa branca e polpa vermelha</b> .....	<b>21</b>
<b>4.6.2.</b>	<b>Componentes da polpa branca</b> .....	<b>21</b>
<b>4.6.3.</b>	<b>Microarquitetura esplênica</b> .....	<b>21</b>
<b>4.7.</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>22</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
<b>5.1.</b>	<b>Baço</b> .....	<b>23</b>
<b>5.1.1.</b>	<b>Polpa branca</b> .....	<b>23</b>
<b>5.1.1.1.</b>	<b>Área de Polpa Branca</b> .....	<b>23</b>
<b>5.1.1.2.</b>	<b>Quantidade e qualidade das estruturas: PALS, CG, ZM e zona do manto</b> .....	<b>24</b>
<b>5.1.2.</b>	<b>Polpa vermelha</b> .....	<b>28</b>
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>35</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>36</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. As leishmanioses

Leishmanioses são um grupo de doenças vetoriais que apresentam diferentes manifestações clínicas. São causadas por protozoários intracelulares obrigatórios de 20 diferentes espécies do gênero *Leishmania* sp. (Trypanosomatida, Trypanosomatidae) (AKHOUNDI *et al.*, 2016) e dos subgêneros monofiléticos *Leishmania* e *Viannia* que possuem distribuição biogeográfica diferenciada. O subgênero *Viannia* fica restrito às regiões neotropicais e *Leishmania* ao Novo (Américas) e Velho mundo (África, Ásia e Europa) (DESJEUX, 2004; FRAGA *et al.*, 2010). São parasitoses de transmissão vetorial por meio de 30 diferentes espécies de insetos dípteros, de dois gêneros conhecidos: *Phlebotomus* sp. ou *Lutzomyia* sp. (DESJEUX, 2004).

As manifestações clínicas das leishmanioses podem se apresentar como formas tegumentares, visceral e dérmica pós-calazar, que ocorrem ao redor de todo o mundo, exceto Austrália, Nova Zelândia, Pacífico Sul e sudeste Asiático (PISCOPO & AZZOPARDI, 2006; WHO, 2016; AKHOUNDI *et al.*, 2016). Dentro das formas tegumentares é possível observar a leishmaniose cutânea localizada (LCL), a leishmaniose cutânea difusa (LCD) e a leishmaniose mucocutânea (LM) (PEARSON; SOUSA, 1996; DESJEUX, 2004). A leishmaniose visceral (LV) varia de assintomática a grave, levando à morte quando não tratada. A leishmaniose dérmica pós calazar (LDPK) é uma manifestação dérmica da infecção por *Leishmania donovani* que estava aparentemente curada, encontrada principalmente no Sudão, na Índia e Bangladesh (WHO, 2016). A manifestação da doença está diretamente relacionada com a espécie de *Leishmania*, devendo-se observar a sintomatologia e a apresentação clínica específica de cada caso (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014), que depende também da genética e da condição imunológica do indivíduo (NIETO *et al.*, 2011; NATARAJAN *et al.*, 2014).

Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (PAHO-WHO), 75% de todos os casos de LC ocorrem em 10 países, destes, 4 na América do Sul: Brasil, Colômbia, Peru e Nicarágua, já para LV 90% de todos os casos reportados são oriundos de 6 países: Brasil, Etiópia, Sudão, Sudão do Sul, Índia e Bangladesh (DESJEUX, 2004; ALVAR *et al.*, 2012; PAHO-WHO, 2014). Estima-se que ocorram, anualmente, no Brasil, 4.200 a 6.300 casos de LV e 72.800 a 119.600 de LC, entre casos confirmados e não registrados (ALVAR *et al.*, 2012). O nordeste do Brasil concentra 40% dos municípios considerados prioridade



epidemiológica, distribuídos na Bahia, no Ceará e no Maranhão (SCHRAMM *et al.*, 2016).

As leishmanioses são doenças de cunho socioambiental. Antes, eram típicas da zona rural, mas cresceram os casos de leishmanioses nas grandes cidades devido ao desmatamento e à falta de saneamento básico (MONTEIRO *et al.*, 2005; BRASIL, 2014). São de controle acessível por meio de programas de coleta de lixo e tratamento de esgoto, sobretudo em regiões mais pobres das cidades (MONTEIRO *et al.*, 2005). Contudo, o aumento da população humana também contribuiu de forma significativa para a expansão da doença, bem como a negligência das providências públicas para a aparelhagem sanitária básica das cidades (MONTEIRO *et al.*, 2005; BRASIL, 2014).

Estipula-se que o crescimento da urbanização da forma visceral tenha começado na década de 90 (TÁVORA; NOGUEIRA; GOMES, 2015). No Brasil, a LV se classifica epidemiologicamente como em expansão: de 3.624 casos nas Américas, 95% foram apenas do Brasil em 2014 (PAHO-WHO, 2014). O vetor conquistou o ambiente urbano após sucessões de desmatamento e de construções, durante a expansão desorganizada das cidades e um consecutivo maior envolvimento de humanos com o vetor da doença, estabelecendo a sobreposição de nichos dos animais silvestres, que são reservatório do parasito, e dos humanos (DESJEUX, 2004; BRASIL, 2014).

## **1.2. Leishmaniose visceral**

“Febre dundun”, “calazar”, “barriga d’água”, “calazar neotropical” ou “esplenomegalia tropical” são alguns dos nomes populares dados para a condição visceral da leishmaniose (LUPPI, SIMEONI & PICCININ, 2008). Trata-se de moléstia grave que começa com uma fase aguda e evolui para um quadro crônico que, quando não tratado, pode levar ao óbito em até 95% dos casos que ultrapassam dois anos (COSTA; COSTA, 2014; BRASIL, 2014, WHO, 2016).

A LV é uma doença endêmica em 98 países, com 90% dos casos referidos a seis principais países: Brasil, Somália, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul (WHO, 2016). Ocorre ainda em outros países que estão em processo de validação da eliminação da doença, como Bangladesh e Nepal, que fizeram importantes acordos para erradicação da doença até 2020 (WHO, 2016). Presente em 19 dos 27 estados brasileiros, particularmente na região Nordeste, foram registrados 66% de todos os casos durante 19 anos de notificação. Nessa região, o vetor encontra o perfeito ambiente, devido ao clima que apresenta pouca precipitação e regiões muito secas (MICHALIK; RIBEIRO, 2011; BRASIL, 2014).

O complexo *Leishmania donovani* inclui as três espécies responsáveis pela leishmaniose visceral no mundo: *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* (MICHALIK; RIBEIRO, 2011). *L. (L.) infantum* é a espécie responsável pela forma visceral da leishmaniose nas Américas, enquanto *L. (L.) donovani* é prevalente na Ásia, especialmente na Índia, e no leste Africano (MICHALIK; RIBEIRO, 2011; COSTA; COSTA, 2014; CONITEC, 2016). Nos últimos anos, vem sendo sugerido o uso de *L. (L.) infantum* como sinonímia de *L. (L.) chagasi* (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). No entanto, trabalhos mais recentes de filogenia e evolução do grupo não mencionam *L. chagasi*, corroborando apenas com a monofilia entre *L. donovani* e *L. infantum* (HARKINS *et al.*, 2015).

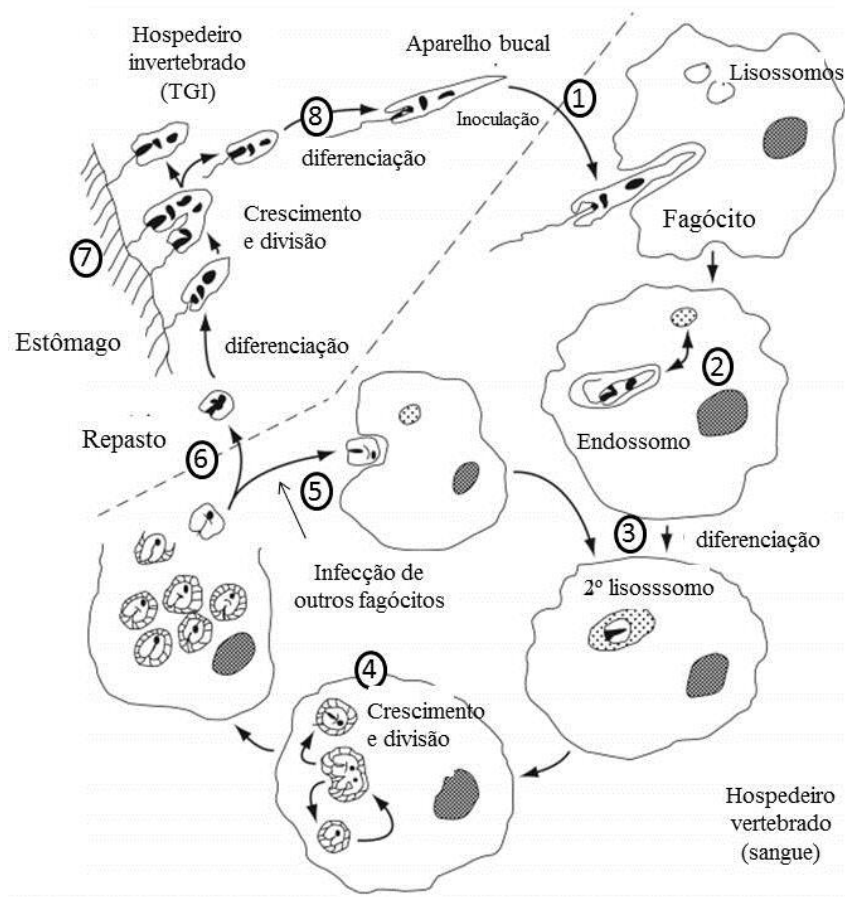
Dependendo da espécie e da região de prevalência é possível classificar a LV como zoonose, antroozoonose ou antroponose (MONTEIRO *et al.*, 2005; WHO, 2016). Os hospedeiros podem ser: humanos, canídeos (*Lycalopex vetulus*, *Cerdocyon thous* e *Canis familiaris*), felídeos, marsupiais (*Didelphis* sp.) ou roedores (DESJEUX, 2004; BRASIL, 2014; PAHO-WHO, 2014). É uma zoonose quando o vetor se infecta em animais não humanos e é uma antroponose quando apenas humanos infectam o vetor e vice-versa (DESJEUX, 2004). Trata-se então de uma antroozoonose quando é típica de animais silvestres e regiões rurais e passou a apresentar seres humanos como hospedeiros (COSTA; COSTA, 2014; BRASIL, 2014). No Brasil, a leishmaniose visceral é uma antroozoonose endêmica, onde canídeos são reservatórios para os parasitos, de notificação compulsória em todos os três níveis de atendimento (BRASIL, 2014; WHO, 2016). No entanto, na Índia é considerada uma antroponose (BABUADZE *et al.*, 2014).

A LV é uma enfermidade complexa que se inicia pela infecção através da inoculação do parasito, por meio do inseto vetor, no hospedeiro (Figura 1). *L. (L.) infantum* é um protozoário que possui diferentes formas evolutivas, condição chamada de metaciclogênese, expressando-se dentro do seu ciclo de vida em amastigotas, promastigotas procíclicas, paramastigotas e promastigotas metacíclicas (BRASIL, 2014). Estas formas evolutivas interconversíveis se apresentam durante o ciclo digenético (heteroxênico) do parasito, mas somente as promastigotas metacíclicas são a forma infectante de vertebrados (NIETO *et al.*, 2011). O vetor da doença no Brasil é a fêmea dos flebotomíneos *Lutzomya longipalpis* e *L. cruzi* (Diptera; Psychodidae; Phlebotominae), este último encontrado apenas no Mato Grosso (BRASIL, 2014; WHO, 2016; AKHOUDI *et al.* 2016). Os vetores somente infectam os hospedeiros durante o repasto sanguíneo (MICHALIK; RIBEIRO, 2011; CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014).

O parasito invade o organismo pela lâmina basal junto com a saliva do vetor, na

região entre a derme e a epiderme, após a inserção do aparelho bucal do inseto no mamífero hospedeiro (Figura 1) (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). O parasito apresenta lipofosfolípidos e glicoproteínas em sua membrana, no vetor induz a produção de exossomos no trato gastrointestinal, e possui função imunomodulatória e sinalizadora contribuindo para sua virulência e severidade da doença (ATAYDE *et al.* 2016). Durante a alimentação com sangue do vertebrado, esses exossomos são introduzidos e carregam os parasitos para o sangue circulante. Estima-se que exossomos de *L. donovani* induzam uma produção diferenciada de citocinas pró-inflamatórias como IL-10 e inibindo TNF- $\alpha$  após adentrarem o organismo do hospedeiro (ATAYDE *et al.* 2016).

Figura 1 - Ciclo de vida de *Leishmania* sp. contemplando uma visão celular do processo de diferenciação do parasito no estômago do inseto vetor e sua transformação de promastigotas em amastigotas dentro do fagócito. 1: Inóculo infeccioso contendo parasitos. 2: Formação dos endossomos contendo parasitos. 3: Diferenciação das promastigotas em amastigotas, aprisionadas em um 2º lisossomo dentro do fagócito. 4: Rápido crescimento, por divisão binária, das amastigotas dentro do fagócito. 5: Amastigotas ficam livres no sangue e infectam diversos outros fagócitos. 6: Repasto sanguíneo do vetor que adquire amastigotas e pedaços de macrófagos infectados livres no sangue. 7: Diferenciação e crescimento das leishmanias no ambiente estomacal do vetor. 8: Diferenciação das promastigotas em promastigotas metacíclicas e migração ao aparelho bucal do vetor.



Fonte: SACKS; MELBY, 2001. Adaptado.

No local da infecção, começam os esforços do corpo para controlar e combater o patógeno. Na epiderme, encontram-se macrófagos, células dendríticas e linfócitos  $\gamma\delta$ , que são células sentinelas preparadas para reconhecer os parasitos como patógenos, além de produzirem quimiocinas (TEIXEIRA *et al.* 2006). Rapidamente, as células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), sobretudo macrófagos atraídos pela saliva do flebotomíneo e pela ação dos parasitos, fagocitam os parasitos e os retém num vacúolo, onde as promastigotas metacíclicas irão se tornar amastigotas com alta taxa de divisão binária (Figura 1) (NATARAJAN *et al.*, 2014). Eventualmente a célula se rompe, e as amastigotas, brevemente livres na circulação sanguínea, são fagocitadas por outros macrófagos, que fazem a limpeza no local da inflamação (TEIXEIRA *et al.* 2006). Contudo, os macrófagos são inibidos e produzem menos citocinas pró-inflamatórias, e assim os parasitos permanecem no hospedeiro, infectando célula após célula silenciosamente (TEIXEIRA *et al.* 2006).

De fagocitose em fagocitose ocorre dispersão dos parasitos por meio do sangue para outros tecidos, e a forma visceral da leishmaniose se manifesta pela chegada das amastigotas na medula óssea, linfonodos, baço e fígado (KUMAR; NYLÉN, 2012). O

mecanismo completo da visceralização do parasito em suas minúcias ainda é desconhecido (NATARAJAN *et al.*, 2014). Porém, além das células do SMF terem sua importância, as células dendríticas são as responsáveis por mecanismos de apresentação antigênica (NATARAJAN *et al.*, 2014). A suscetibilidade dos macrófagos ao descontrole do vacúolo rico em amastigotas é controlada pela própria *Leishmania* sp. que estabelece influência direta sobre a imunidade celular. A imunidade celular é a principal responsável pela eliminação dos parasitos ao contrário da imunidade humoral, de anticorpos, que não é a linha de combate mais efetivo, apesar de suas contribuições (RODRIGUES *et al.*, 2016). Esse ataque às células de defesa corporal do SMF, as primeiras defensoras a responderem à inflamação (KUMAR *et al.* 2008), impede uma resposta imune mais eficiente, não somente à carga parasitária, mas também a outros vírus e bactérias, condição chamada de imunossupressão (KUMAR; NYLÉN, 2012).

Afetando geralmente crianças com menos de 5 anos de idade, o quadro imunossupressor da LVH se combina ao quadro de imaturidade do sistema imunológico e à má nutrição, agravando o estado da infecção (KUMAR; NYLÉN, 2012; PAHO-WHO, 2014). Infectado, o hospedeiro é acometido pela doença de caráter crônico e torna-se reservatório para a infecção de outros mamíferos, tais como raposas, cães, gatos, roedores e marsupiais (COSTA; COSTA, 2014).

A complexidade do calazar se dá por meio de suas diferentes formas de apresentação clínica: assintomática, oligossintomática e sintomática (BRASIL, 2014). Indivíduos de regiões endêmicas podem ser hospedeiros assintomáticos ou oligossintomáticos, que apresentam alguns sintomas e rapidamente apresentam cura clínica – sem eliminação dos parasitos (BRASIL, 2014). Fatores genéticos e ambientais podem estar envolvidos nessa resistência (NATARAJAN *et al.*, 2014). Os casos oligossintomáticos ocorrem quando a infecção é autolimitada, cessando em 15 dias, com os sintomas clássicos no começo: febre, palidez, tosse e diarreia, combinados ou não com hepatoesplenomegalia, hiperglobulinemia, anemia e hemossedimentação alta (BRASIL, 2014). A notificação dos casos sintomáticos é feita quando o indivíduo apresenta febre de quatro semanas, anemia e esplenomegalia acompanhada ou não de hepatomegalia (BRASIL, 2014). Os principais sintomas e aspectos clínicos da LV são febre irregular, palidez, hepatoesplenomegalia, edema, caquexia, lindafenopatia, anemia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia (COSTA; COSTA, 2014).

Epidemiologicamente, ainda destaca-se o crescimento de casos de pacientes que apresentam coinfeção com o vírus da AIDS, o HIV, e leishmanioses em geral, tegumentar ou

visceral (MICHALIK; RIBEIRO, 2011). O compartilhamento de seringas, durante o uso de drogas injetáveis, e as transfusões de sangue, são consideradas outras formas de transmissão epidemiologicamente relevantes do HIV (MICHALIK; RIBEIRO, 2011; BRASIL, 2014). A coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) está crescendo tanto na Europa como na Ásia. No Brasil, apesar de uma prevalência de 5% no Brasil, anotada no começo do século (TÁVORA; NOGUEIRA; GOMES, 2015), é um preocupante dado epidemiológico. Em 2014 foram registrados 242 casos de coinfeção, 238 apenas no Brasil e 8 no Paraguai (OMS, 2016).

Pacientes acometidos pelas leishmanioses apresentam diversos distúrbios celulares sanguíneos, como anemia e pancitopenia (VARMA; NASEEM, 2010, NATARAJAN *et al.*, 2014), e a coinfeção com o HIV aumenta a queda dos valores totais de células TCD4+ aumentando a mortalidade das doenças combinadas, uma vez que os parasitos podem persistir no tecido linfoide (TÁVORA; NOGUEIRA; GOMES, 2015). Além destes distúrbios, a coinfeção pode aumentar a taxa de reaparecimento da LV em 38% dos pacientes já tratados anteriormente (CONITEC, 2016).

A LV é tratada pela administração de fármacos específicos como Antimoniato de meglumina, Estibugluconato de sódio, Anfotericina B, Isetionato de pentamidina, Alopurinol e Miltefosina (CONITEC, 2016). O tratamento da leishmaniose no Brasil pode ser feito pelo sistema público de saúde por meio dos antimoniatos pentavalentes e anfotericina B (CONITEC, 2016).

### **1.2.1. Roedores como modelos experimentais**

A LV pode ser uma doença fatal, seja pelo imunocomprometimento, que pode levar às coinfeções, seja pela quebra da arquitetura do baço que afeta as funções deste órgão (NATARAJAN *et al.*, 2014), e pela persistência dos parasitos nos órgãos linfóides, permitindo a cronicidade da doença (ENGWERDA; ATO; KAYE., 2004). Por questões bioéticas, a condução de experimentos em seres humanos não é permitida em razão dos custos excederem a permissividade da ciência em comprometer a vida humana. Há linhas de pesquisa, especialmente no ramo da patologia, onde o acesso ao fígado e baço é de extrema importância, não somente para punções, mas para biópsias e análises histológicas desses órgãos (ENGWERDA ATO; KAYE, 2014).

A alternativa para a questão do uso humano em pesquisas está na utilização de animais. Os modelos experimentais *in vivo* permitem estudos sobre a imunopatologia de

diversas doenças infecciosas de humanos, e com as leishmanioses não é diferente. Dentre os modelos animais, um dos mais utilizados na pesquisa das leishmanioses é o hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*), roedor de porte médio, menor que o hamster comum (*Cricetus cricetus*) (CHAMPAGNE, 2006). Hamsters são susceptíveis à infecção com *Leishmania* sp. e quando infectados com *L. donovani* apresentam sinais de LV muito semelhantes àqueles de pacientes humanos, como a hepatoesplenomegalia, e o quadro prosseguindo para um curso fatal (PEARSON *et al.*, 1992; MELBY *et al.*, 2001). Embora o hamster seja um bom modelo para LV, há a limitação técnica de não haver reagentes imunológicos disponíveis para um estudo mais aprofundado das redes de citocinas prevalentes durante a infecção (MELBY *et al.*, 2001; SACKS; MELBY, 2001). Os modelos alternativos têm sido os camundongos com suas respectivas vantagens e desvantagens.

Vários modelos experimentais de LV em camundongos têm sido desenvolvidos. Embora nenhum deles reproduza integralmente a doença humana (HANDMAN, 2001), os estudos utilizando estes modelos têm permitido investigar os mecanismos imunológicos e os aspectos histopatológicos da doença (WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005; NIETO *et al.*, 2011), sobretudo o desenvolvimento diferenciado do parasito em cada órgão (PORROZI; CAVALCANTI; CUPOLILLO, 2014). Assim como nos hamsters, as infecções experimentais são influenciadas pela espécie de *Leishmania* sp., muitas vezes até mesmo pelo subgênero (*Leishmania* ou *Viannia*), e pelo inóculo, quanto à localização e ao tamanho (SACKS; MELBY, 2001; PORROZI; CAVALCANTI; CUPOLILLO, 2014). Em especial, nos modelos murinos pode-se destacar a importância da escolha da linhagem para o estudo, uma vez que os animais variam tanto entre susceptíveis e resistentes como variam em diversas combinações genéticas, como resistentes e atímicos, por exemplo (SACKS; MELBY, 2001, PORROZI; CAVALCANTI; CUPOLILLO, 2014).

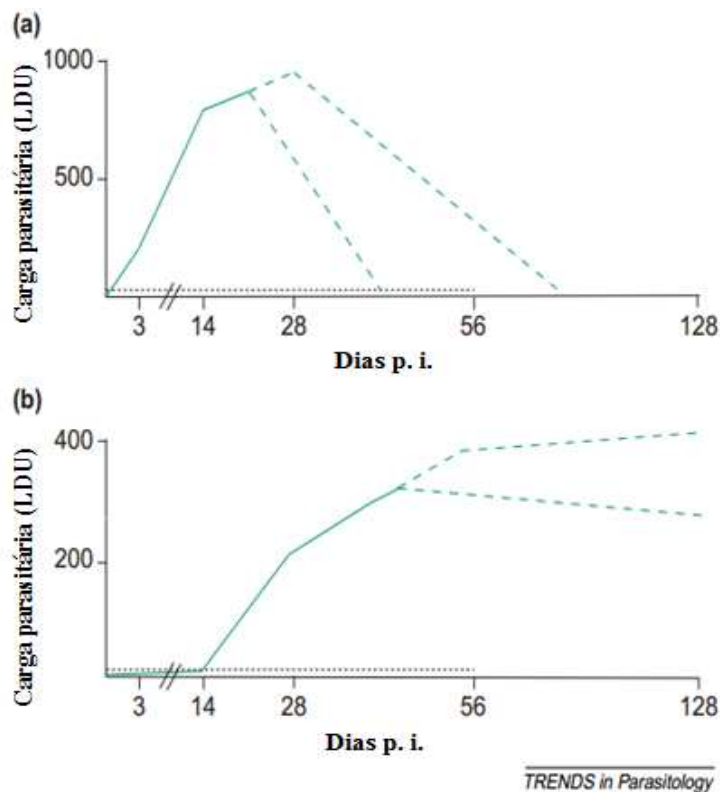
As linhagens mais utilizadas de camundongos geneticamente modificados são os BALB/c e os C57BL/6 como susceptíveis e DBA/2 e C3H/He como resistentes (SACKS; MELBY, 2001; PORROZI; CAVALCANTI; CUPOLILLO, 2014; THE JACKSON LABORATORY, 2017). BALB/c é uma linhagem de camundongos albinos de pouca variabilidade genética, *inbred* e, no caso das leishmanioses, é um modelo de susceptibilidade geneticamente induzida (THE JACKSON LABORATORY, 2017). No estudo da LV é utilizada na investigação da imunopatologia durante o período agudo da infecção, e para a avaliação da condição imunológica subclínica quando na infecção crônica (SACKS; MELBY, 2001). Esses aspectos de estudo não são acompanhados pela manifestação de sinais clínicos externos, como em hamsters, portanto não simulam a condição sintomatológica da doença

humana (SACKS; MELBY, 2001).

### 1.2.2. A imunopatologia da LV em camundongos BALB/c e a quimiocina CXCL10

O desenvolvimento da infecção por *Leishmania* em camundongos BALB/c não mimetiza o quadro clínico humano da doença, mas a imunopatologia observada nos tecidos afetados é similar à observada em tecidos humanos responsáveis pelo quadro clínico da LVH (FALEIRO *et al.*, 2014). Sabe-se que a resposta infecciosa se dá de maneira compartimentalizada nos órgãos-alvo no modelo murino, com o fígado apresentando infecção autolimitada, e o baço e medula óssea, alta carga parasitária persistente e crônica (Figura 2) (ENGWERDA; ATO; KAYE, 2004; WILSON; GERONIMO; PEARSON, 2005; NIETO *et al.*, 2011). Na primeira semana, o fígado se apresenta com alta carga parasitária imediata, diferentemente do baço, que apresenta carga extremamente baixa (Figura 2). Após 2 semanas de infecção, a situação é invertida no fígado, e o baço passa a apresentar cargas cada vez maiores, atingindo um platô dentro de 1 a 2 meses (Figura 2) (FALEIRO *et al.*, 2004).

Figura 2 – Fases da infecção murina por *L. donovani* no fígado (a) e no baço (b). LDU: *Leishmania donovani* Units. P. i.: pós infecção.





Fonte: ENGWERDA; ATO; KAYE, 2004.

Tanto em humanos como em camundongos, a resolução da infecção se dá pela ativação de uma resposta imune celular, que previne recidiva por ação das células NK (PEARSON *et al.*, 1992; MOLL, 2003; NIETO *et al.*, 2011). A ativação da imunidade adaptativa feita pelas células dendríticas (CD) e por macrófagos decorre a resposta celular em meio à intrincada organização celular do baço. (MOLL, 2003). Composto por três principais compartimentos: a polpa vermelha, a zona marginal e a polpa branca, e diversas populações de macrófagos o baço é o responsável não somente pela filtração e renovação da linhagem eritrocítica e a reciclagem de ferro, mas pela apresentação antigênica e o início da resposta imune adaptativa por meio da captura e destruição de patógenos (MEBIUS; KRAAL, 2005; den HAAN; KRAAL, 2012).

A zona marginal do baço possui diversos tipos celulares em sua composição: células B, macrófagos da zona marginal, macrófagos metalofílicos, células dendríticas e células T (den HAAN; KRAAL, 2012). A captura antigênica tem início quando o sangue periférico chega ao baço e é direcionado à zona marginal, antes de adentrar a polpa vermelha, passando em velocidade reduzida onde as células dendríticas são capazes de apanhar os antígenos (MEBIUS; KRAAL, 2005). Capturados, os antígenos são levados para dentro da zona marginal e da polpa branca, que fica abaixo da zona marginal sem contato com a polpa vermelha, pelas CDs residentes que migram, sobre influência da expressão de receptores ou ligantes específicos em sua membrana celular (den HAAN; KRAAL, 2012).

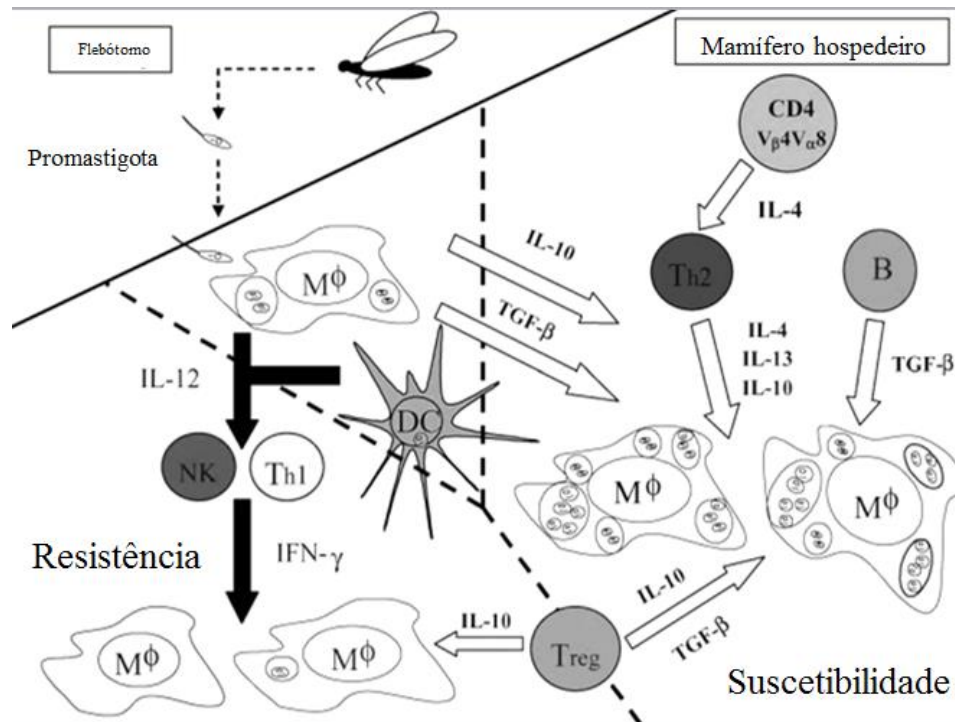
A migração segue em direção à rede de células apresentadoras de enorme variedade de ligantes e receptores (MEBIUS; KRAAL, 2005), e as células dendríticas foliculares (FDCs) que recebem os antígenos capturados no folículo de células B. Ali, as FDCs irão apresentar o antígeno aos linfócitos B *naïve* presentes. Neste momento se inicia a formação da estrutura que guia toda a ação da resposta imune humoral: os centros germinativos (den HAAN; KRAAL, 2012). Centros germinativos são oriundos dos folículos de células B após a aglomeração de células *T helper* antígeno-específicas e células B (HAUSER; KERFOOT; HABERMAN, 2010). A migração das CDs para a polpa branca também envolve o encontro com as células T em sua região específica chamada de bainha linfocítica periarteriolar, PALS, que dará início à ativação de células T ativadas que migrarão ao fígado (WILSON; GERONIMO; PEARSON, 2005).

A captura antigênica ocorre pela ação das CDs, e pelas populações de macrófagos da zona marginal, apresentando alta mobilidade na região (MEBIUS; KRAAL, 2005). Os macrófagos da zona marginal são, todavia, de extrema importância para a resposta imune

celular, estes são ativadores da produção de citocinas correspondentes à resposta imune apropriada ao patógeno, assim como as CDs (MOLL, 2003). Em resposta aos parasitos, os macrófagos e as CDs ficam comprometidos e há o início de uma resposta anti-inflamatória, que leva à condução da doença (Figura 3). A resposta citocínica ocorre de maneira diferenciada entre o fígado e o baço de animais infectados com cepas viscerotrópicas. O desenvolvimento da resposta no baço ocorre em meio à produção de IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e na ausência de IL-4, de maneira diferenciada do fígado que depende de IL-4 para a formação de sua resposta granulomatosa (WILSON; GERONIMO; PEARSON, 2005).

A indução de resposta Th1/Th2 frente à infecção por *Leishmania* sp. varia de acordo com a cepa em questão (WILSON; GERONIMO; PEARSON, 2005). No entanto, é sabido que a resposta Th1 é prevalente em animais resistentes à infecção por *Leishmania donovani* e que esta resposta é a estimada após tratamento da leishmaniose visceral, como após o uso de quimiocinas em animais infectados (GUPTA *et al.*, 2009; GUPTA *et al.*, 2011). A resposta Th1, fortemente combatida pelo parasito ao adentrar o organismo hospedeiro, induz a produção de IL-12 por macrófagos que ativam células NK, CDs e mais linhagens Th1, que produzem de IFN- $\gamma$  (Figura 3). Por outro lado, a indução da produção de IL-10 e TGF- $\beta$  pelos macrófagos infectados com amastigotas leva a uma ativação das linhagens Th2 produtoras de IL-4 e IL-13, sendo IL-10 também produzida pelas células T regulatórias (Figura 3).

Figura 3 – Perfis de resposta imune de susceptibilidade e resistência frente à infecção por *Leishmania major*.



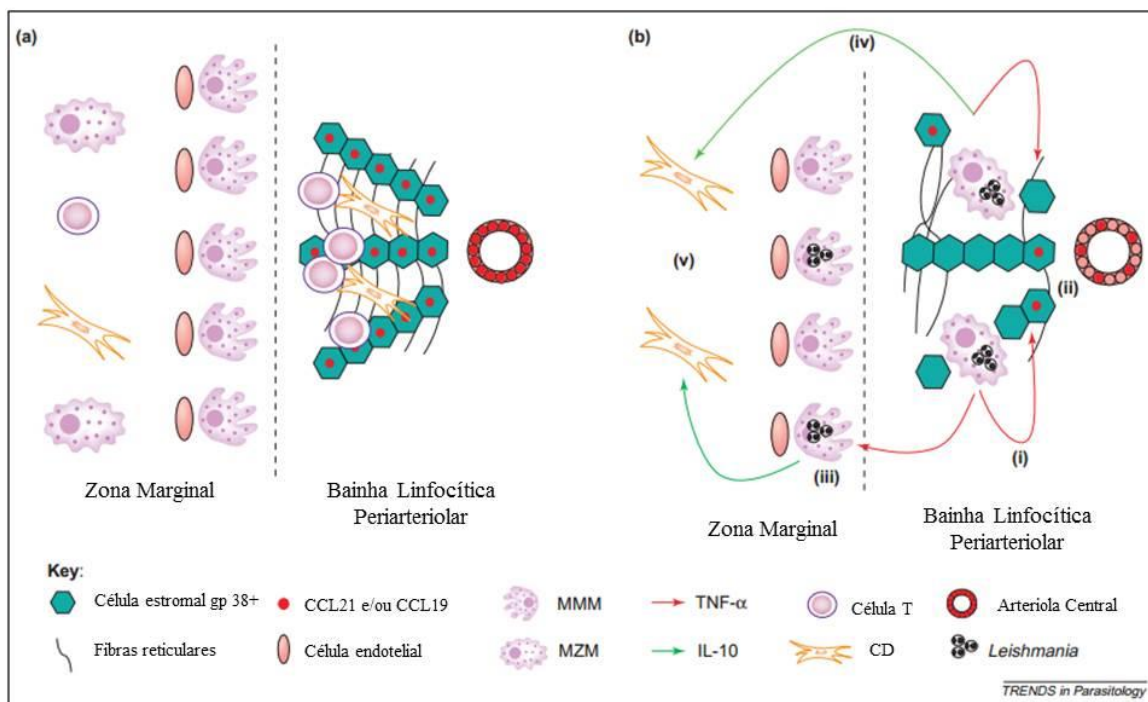
Fonte: ALEXANDER; BRYSON, 2005. Adaptado.

As citocinas produzidas por células do baço, sobretudo IL-10, irão afetar diretamente o tráfego das CDs pela zona marginal para a polpa branca e ao PALS (Periarteriolar Lymphoid Sheath – Bainha Linfocítica Periarteriolar) (WILSON; GERONIMO; PEARSON, 2005; SOONG; HENARD; MELBY, 2012). Isso ocorre por meio da modulação da expressão do receptor CCR7 nas CDs e dos ligantes CCL19 e CCL21 na bainha linfoide (ENGWERDA; ATO; KAYE, 2004). Quando a comunicação entre as CDs e o PALS não ocorre normalmente e os altos níveis de TNF- $\alpha$  influenciam a expressão dos ligantes e a organização dos macrófagos da zona marginal, ocorre uma perda da formação de centros germinativos e diminuição das quantidades de CDs circulantes na região (Figura 4) (ENGWERDA; ATO; KAYE, 2004; WILSON; GERONIMO; PEARSON, 2005). Logo, a patogênese da LV culmina em desarranjo estrutural do baço, refletido pela quebra arquitetural da polpa branca do baço estimulada pelo parasito (Figura 4).

Apesar da quebra arquitetural no baço, células de Kupffer e os macrófagos residentes do fígado fagocitam os parasitos à medida que estes chegam pela circulação sanguínea, e produzem CCL3, CCL2 e CXCL10 recrutadoras de monócitos e neutrófilos (STANLEY; ENGWERDA, 2007). Durante os primeiros momentos da infecção, a resposta no fígado ainda é incipiente e independente de células T e, conforme se atinge a primeira semana, um aporte de linfócitos ativados T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> específicos para a *Leishmania* sp.

começam a vir do baço (ENGWERDA; ATO; KAYE, 2004; STANLEY; ENGWERDA, 2007). Na fase aguda, é iniciada uma resposta granulomatosa no fígado, mas o baço ainda se encontra em um estado sadio e atuante na infecção, ativando os linfócitos que chegam ao fígado (SOONG; HENARD; MELBY, 2012).

Figura 4 – Mudanças na arquitetura do baço durante a infecção crônica. (a) A estrutura do baço permanece normal durante a fase aguda da infecção. A Zona Marginal (*Marginal Zone – MZ*) compreende duas populações distintas de macrófagos: (i) os Macrófagos da Zona Marginal (*Marginal Zone Macrophages – MZM*) no limite externo; e (ii) os Macrófagos Metalofílicos Marginais (*Marginal Metallophilic Macrophages – MMM*) nas proximidades da Bainha linfóide Peri-Arteriolar (*Peri-Arteriolar Lymphoid Sheath – PALS*), composta por células do estroma gp38<sup>+</sup>, células T e pela Arteriola Central (Central Arteriole) do endotélio. Os MMM são ricas fontes das quimiocinas constitutivas CCL19 e CCL21, que atraem Células dendríticas CCR7<sup>+</sup> (CCR7<sup>+</sup> DCs) e células T da MZ para dentro da PALS. (b) A quebra da arquitetura do baço ocorre na fase crônica. A produção excessiva de TNF, provavelmente de macrófagos não residentes (i) leva à destruição do estroma gp38<sup>+</sup>, perda da matriz reticular e (ii) queda da expressão de CCL19 e CCL21. Os altos níveis de TNF produzidos também regulam positivamente a produção de IL-10. Esta citocina regula negativamente a expressão de CCR7 em células dendríticas, inibindo a sua habilidade para migrar para as PALS (iv). As setas indicam as fontes e alvos de TNF e IL-10.



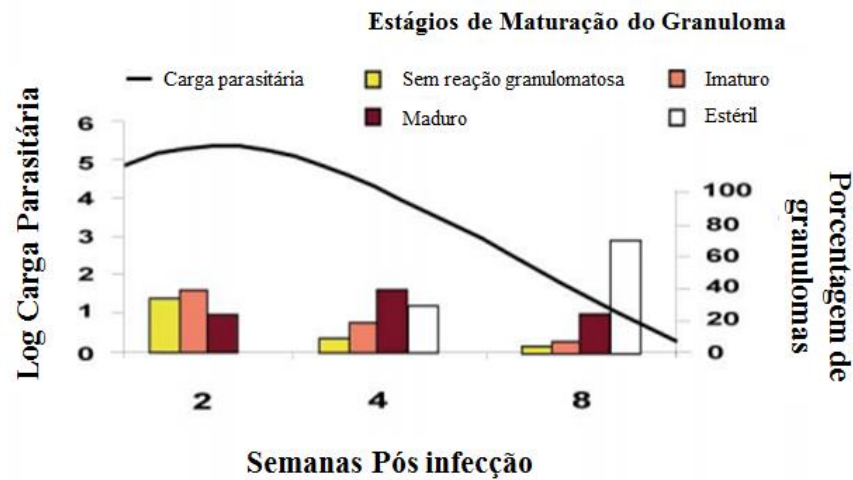
Fonte: ENGWERDA; ATO; KAYE, 2004.

Durante a formação dessa resposta granulomatosa é observada uma queda na carga parasitária hepática, que está diretamente ligada à ação citotóxica dos linfócitos T CD8+ ativados (GOMES-PEREIRA *et al.*, 2004). Durante o período crônico da LV, células T CD4+ passam a manejar os granulomas diretamente mantendo a infecção em níveis ínfimos, enquanto as T CD8+ parecem estar relacionadas às respostas de memória imune frente à reinfeção (FALEIRO *et al.*, 2014).

A ação de citocinas como IFN- $\gamma$ , produzida antes da ativação das CD8+, também está associada à resistência por ação fagocítica de macrófagos e produção de IL-12, citocina típica do perfil Th1 de células efetoras (GOMES-PEREIRA *et al.*, 2004; ALEXANDER; BRYSON, 2005). O perfil Th1 ainda conta com a participação de TNF- $\alpha$  e IL-2 para a formação dos granulomas (NIETO *et al.*, 2011). IFN- $\gamma$  é produzido por células NK e NKT, estimuladas pelas células dendríticas, além de outras quimiocinas que impulsionam o início da formação granulomatosa e a redução da carga parasitária (Figura 5) (STANLEY; ENGWERDA, 2007; NIETO *et al.*, 2011). A produção citocinética e a resolução da infecção é produto do balanço entre as Th1 e Th2 (ALEXANDER; BRYSON, 2005). A citocina IL-4 advém de células Th2 e mantém os granulomas ativos e atuantes na infecção, logo é tão importante quanto outras citocinas da linhagem Th1 (STANLEY; ENGWERDA, 2007).

A maturação de granulomas implica diretamente na resolução da infecção no fígado, mediada por TNF- $\alpha$ , e apenas granulomas maduros possuem ação antiparasitária eficiente para reduzir a carga por meio da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelas células de Kupffer (CK) e pelas células dendríticas (CD) (Figura 5) (NIETO *et al.*, 2011).

Figura 5 – Cinética da carga parasitária e diferentes estágios de maturação dos granulomas no fígado após infecção experimental com *Leishmania infantum*.



Fonte: NIETO *et al.*, 2011.

A formação de granulomas é influenciada pela produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos e CDs ativados por IFN- $\gamma$  e IL-12. Todavia TNF- $\alpha$  age de maneira significativamente diferente no baço, alterando a organização estrutural dos macrófagos encarregados da fagocitose de patógenos do sangue, os macrófagos da zona marginal (KAYE *et al.*, 2004). Não obstante, a produção de TNF- $\alpha$  pelas CDs é também acompanhada pela produção de LT- $\alpha$ , uma citocina da família do TNF- $\alpha$ , cuja ausência causa perda de células da região de zona marginal da polpa branca do baço (ENGWERDA *et al.*, 2002). Animais deficientes em TNF- $\alpha$  apresentam alteração da organização linfóide que impacta diretamente no endereçamento de linfócitos por meio de citocinas (KAYE *et al.*, 2004). Logo as citocinas da família do TNF- $\alpha$  possuem importantes atribuições sobre a microarquitetura esplênica.

Em suma, a quebra da microarquitetura esplênica é diretamente influenciada pela produção de IL-10 e TNF- $\alpha$  no período crônico da infecção. Estas citocinas modulam a expressão de receptores CCR7 em CDs, impedindo sua movimentação ao PALS, redirecionando a localização de macrófagos da zona marginal, desfalcando a região. Dessa maneira não se formam granulomas esplênicos, a ativação das células T do PALS é reduzida, os centros germinativos não amadurecem e a carga parasitária no baço permanece alta.

Na fase aguda da infecção, a reação granulomatosa depende diretamente das citocinas e quimiocinas produzidas pelas CDs e macrófagos residentes, gerando uma resposta inflamatória eficiente. Entre estas quimiocinas encontra-se CXCL10, que permanece ativa até a fase crônica da infecção no fígado, mediando a manutenção da resposta inflamatória. Portanto, avaliar o efeito pró-inflamatório de CXCL10 pode trazer uma nova perspectiva terapêutica com a indução do perfil Th1 no baço, de modo a minimizar a quebra da

microarquitetura esplênica, aumentando o potencial fagocítico de macrófagos por meio de IFN- $\gamma$ . Na LV, estudos em camundongos BALB/c têm demonstrado que CXCL10 está envolvida na resposta protetora da infecção por *L. donovani*, induzindo uma resposta Th1, através da regulação da via de mediadores inflamatórios como NO e citocinas pró-inflamatórias (GUPTA et al., 2009). Adicionalmente, foi descrito que CXCL10 pode participar da proteção contra *L. donovani* com marcante diminuição de citocinas imunorreguladoras, IL-10 e TGF- $\beta$ , secretadas por células T CD4+ (GUPTA et al., 2011).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que CXCL10 é capaz de induzir proteção contra a infecção por *L. infantum* em macrófagos murinos e camundongos BALB/c, com controle da carga parasitária, aumento da produção de IL-12 e NO, e diminuição da produção de IL-10 (ALVES, 2016; FIGUEIREDO, 2017, dados não publicados). CXCL10 pode conferir proteção contra a infecção por *L. infantum* em camundongos BALB/c, e uma vez que o baço é o órgão de persistência da doença, torna-se relevante estudar as principais alterações histológicas encontradas no baço em animais infectados e tratados com CXCL10, alterações estas que não têm sido avaliadas na maioria dos estudos dessa natureza.

## 2. JUSTIFICATIVA

A leishmaniose visceral é uma doença grave e negligenciada com cerca de 90% de casos reportados apenas no Brasil e, entre estes, 40% reportados nos municípios do Ceará, da Bahia e do Maranhão. Não há tratamento de baixo custo ou vacinação disponíveis para LV, nem em fase de testes, e os investimentos do setor farmacêutico ou de iniciativas governamentais nas pesquisas ainda são baixos ou incipientes.

A infecção com as espécies de *Leishmania* viscerotrópicas em camundongos é caracterizada por uma distinta resposta imunológica órgão-específica. No fígado, ocorre uma infecção aguda que pode resolver-se, com subsequente imunidade às reinfecções, enquanto no baço, os parasitos podem persistir. Não se conhece o perfil imunopatológico completo e detalhado do acometimento do baço na LV. Assim sendo, é importante e relevante que a patologia da LV seja continuamente estudada para que pacientes acometidos e populações em risco, por todo o mundo, possam ter acesso a tratamentos mais eficazes com chance de recuperação e cura.

Há alguns estudos mostrando o uso de citocinas pró-inflamatórias para tratar ou reforçar de maneira eficaz a resposta imunológica contra várias espécies de *Leishmania* sp.. As citocinas IL-12 ou IL-1a recombinantes, quando administradas em camundongos BALB/c antes da infecção com *L. major* torna esses animais, que são naturalmente susceptíveis à infecção, resistentes. A administração exógena de quimiocinas tem mostrado resultados promissores no tratamento da LV. CXCL10 é uma potente candidata para imunoterapia na LV, uma vez que é uma quimiocina conhecida por favorecer o recrutamento e a ativação de células polarizadas para Th1, além de recrutar e ativar células NK, que também são produtoras de IFN- $\gamma$ .

Sabendo que CXCL10 pode conferir proteção contra a infecção por *L. infantum* em camundongos BALB/c, e sabendo ainda que o baço é o órgão de persistência da doença, o presente trabalho teve a proposta de estudar as principais alterações histológicas no baço de animais infectados e tratados ou não com CXCL10. Estas alterações não têm sido avaliadas na maioria dos estudos dessa natureza.

Este estudo, portanto, poderá trazer importantes conhecimentos sobre os mecanismos associados com a patogênese da infecção por *L. infantum*, o que dará subsídios para a elaboração de futuras abordagens de intervenção terapêutica.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Avaliar a relação da infecção por *Leishmania infantum* em camundongos BALB/c, tratados ou não com a quimiocina CXCL10, com a microestrutura do baço, e correlacionar com possível ação protetora da quimiocina CXCL10.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Verificar a proliferação da polpa branca do baço, por corte histológico.
- Classificar semiquantitativamente as alterações na microarquitetura esplênica, enfatizando os componentes da polpa branca.
- Destacar a reatividade do baço por meio da quantidade e qualidade de centros germinativos, zona marginal, bainha linfocítica periarteriolar e folículos da polpa branca.
- Avaliar a densidade celular da polpa vermelha por corte histológico.
- Correlacionar os achados histopatológicos do baço com possível ação protetora do tratamento com CXCL10.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Aspectos éticos

Este trabalho faz parte de um projeto maior intitulado “RESPOSTA IMUNOPATOLÓGICA DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM *Leishmania infantum chagasi* AO TRATAMENTO COM CXCL10”, que foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (CEPA-UFC), de acordo com as normas da COBEA, sob o número 52/2014.

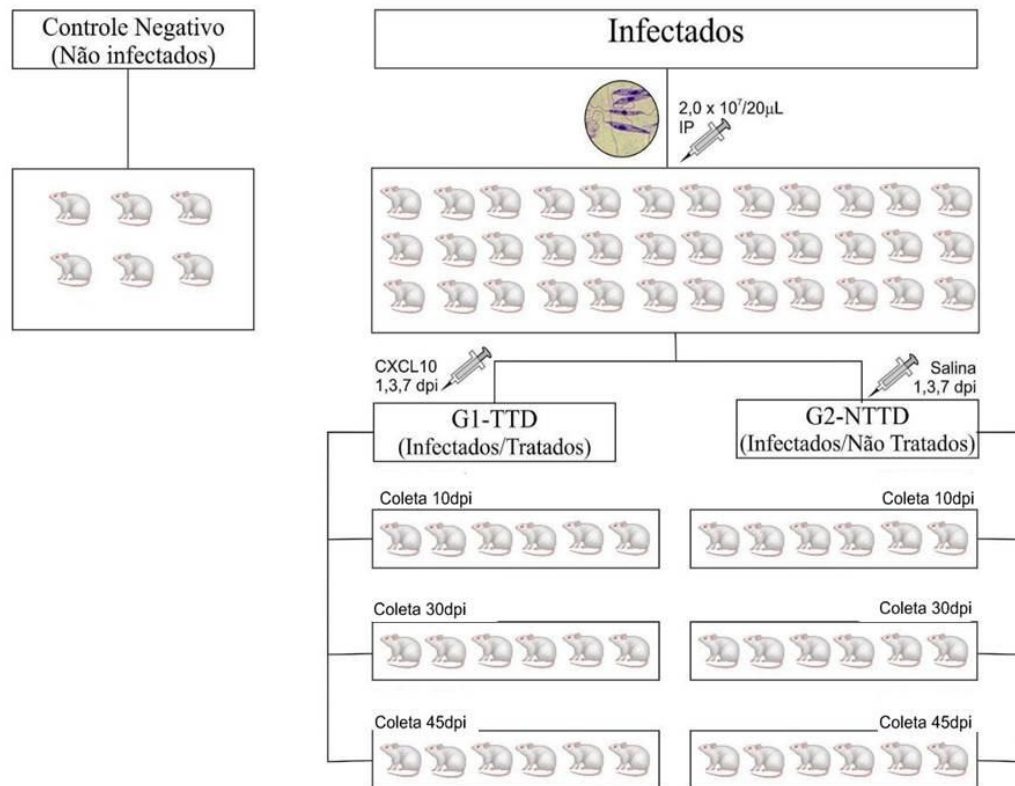
### 4.2. Parasitos

Promastigotas de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/BA-262) foram utilizadas para infecção dos camundongos BALB/c. A obtenção da cepa foi realizada em baço de hamster dourado infectado, por pelo menos 30 dias. O cultivo e a manutenção desses parasitos foram feitos a 25°C, em condições ideais de oxigênio, em meio N.N.N. (Neal, McNovy, Nicolle) com meio Schneider suplementado com urina humana estéril, 20% de SBF (Soro Bovino Fetal - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), mais 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (ambos Sigma-Aldrich).

### 4.3. Desenho experimental

Foram utilizados no experimento 42 camundongos albinos machos do tipo BALB/c, com idade de 8 semanas. Os animais foram divididos em 3 grupos (Figura 6): 1. Não infectado (controle sadio) e que não receberam nenhum tratamento (n=6); 2. Infectado e tratado com CXCL10 (G1- TTD) (n=18); e 3. Infectado e tratado apenas com solução salina (controle positivo, G2 - NTTD) (n=18) (Figura 6). Os tempos de tratamento foram diferenciados, 1 dpi, 3 dpi e 7 dpi. Ocorreram após o dia zero de infecção segundo Gupta et al. (2009).

Figura 6. Desenho experimental. G1-TTD: grupo 1 de animais infectados tratados (n=18). G2-NTTD: grupo 2 de animais infectados não tratados (n=18). Dpi: dias pós-infecção. Dpt: dias pós-tratamento.



Fonte: Autoral.

#### 4.4. Infecção e tratamento

A infecção foi realizada com a cepa de *L. infantum* na fase de promastigotas metacíclicas, que estavam no máximo até a 5ª passagem em cultivo em N.N.N. O inóculo utilizado foi de  $2 \times 10^7$  parasitos/20µL de NaCl 0,9% por via intraperitoneal (IP). Uma parte dos animais infectados (n=18) receberam injeção via intraperitoneal da quimiocina CXCL10 (Thermo Scientific Inc, Waltham, MA, USA) na dose de 5 µg/kg no primeiro, terceiro e sétimo dias após a infecção (d.p.i). Os outros 18 animais infectados restantes receberam apenas injeção de salina via intraperitoneal, nos mesmos tempos, de acordo com adaptação do protocolo de Gupta *et al.* (2009).

#### **4.5. Eutanásia, necropsia e processamento histológico**

Os animais foram eutanasiados por inalação de Halotano (Sigma-Aldrich) em câmara hermética, após 10, 30 e 45 dias de infecção, 6 animais em cada tempo e para cada grupo. Imediatamente após a eutanásia, os camundongos foram submetidos à laparotomia para coleta do baço. Os baços foram fixados em formaldeído tamponado a 10%, cortados transversalmente, colocados em cassetes histológicos, desidratados e diafanizados, emblocados em parafina e cortados em 5µm, e em seguida, foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) e reticulina.

#### **4.6. Análise histopatológica**

##### **4.6.1. Polpa branca e polpa vermelha**

Para a análise da polpa branca, foram capturadas fotomicrografias de 10 campos do baço em aumento de 40x, nas quais foram realizadas mensuração digital da área por corte histológico, através do software de licença aberta ImageJ® v.1.44 (NIH, 2012). Para a análise da polpa vermelha, foram capturadas fotomicrografias de 10 campos do baço em aumento de 1000x, nas quais foram realizadas mensuração digital da densidade celular por corte histológico, através do software de licença aberta ImageJ® v1.44 (NIH, 2012) e estimativa das proporções de tipos celulares mais prevalentes.

##### **4.6.2. Componentes da polpa branca**

Na coloração de reticulina (impregnação por AgNO<sub>3</sub>) foram quantificados e descritos os folículos linfoides, mais especificamente a zona marginal (ZM), a bainha linfocítica periarteriolar (PALS) e os centros germinativos (CG).

##### **4.6.3. Microarquitetura esplênica**

As alterações na microarquitetura foram classificadas semiquantitativamente de acordo com o grau de organização tecidual do baço, segundo Santana *et al.* (2008). Foi

utilizada escala gradual com 4 níveis de organização: (1) Bem organizado: com distintas regiões de bainha linfocítica periarteriolar (PALS), de centro germinativo (CG), da zona do manto e da zona marginal (MZ); (2) Levemente desorganizado: com mudanças hiperplásicas ou hipoplásicas levando a uma perda de definição de quaisquer uma das regiões da polpa branca; (3) Moderadamente desorganizado: polpa branca distinta, porém com qualquer uma de suas regiões não individualizadas ou indistinguíveis; (4) Extensivamente desorganizado: estrutura folicular pouco distinta da polpa vermelha e de áreas de célula T.

#### **4.7. Análise estatística**

A análise compreendeu estatística descritiva e inferencial. Foram comparadas as médias das áreas da polpa branca e da densidade celular da polpa vermelha através de análise de variância para um fator (ANOVA One Way ou Kruskal-Wallis, com respectivos pós-testes), utilizando-se o software estatístico de licença aberta R® v3.2.2 (R Project, 2015).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Baço

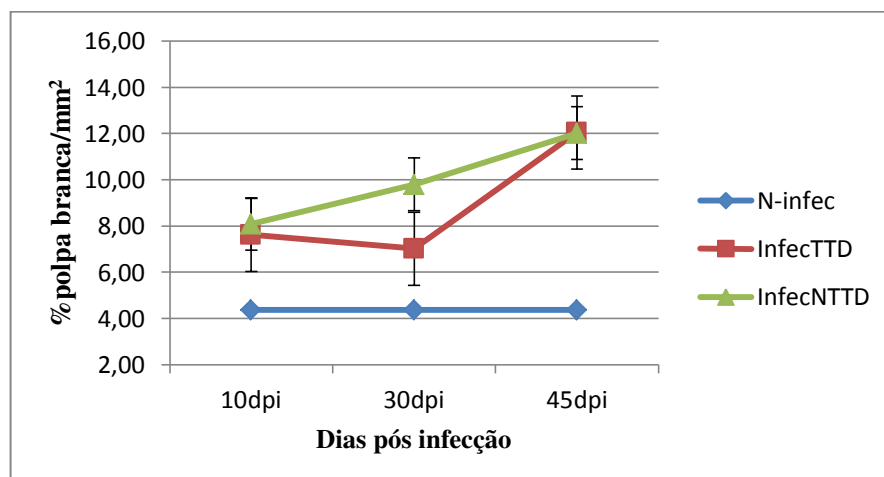
Ao analisar a cápsula do órgão foi possível encontrar pontualmente amostras que apresentaram curtos trechos de espessamento a partir dos 30 dias de infecção, tratados e não tratados, sendo encontrados também aos 45 dias do grupo tratado. Nas outras amostras, do tempo 10 dias e não tratado 45 dias, a cápsula do baço não se encontrou espessada ou inflamada. Todas as amostras apresentaram ausência de periesplenite.

#### 5.1.1. Polpa branca

##### 5.1.1.1. Área de Polpa Branca

Em relação à polpa branca, foi possível observar que os valores percentuais de polpa branca por área ( $1\text{mm}^2$ ), nos grupos tratados em relação aos não tratados, apresentou redução entre os 10 e 30 d.p.i. No entanto, entre 30 e 45 d.p.i notou-se um aumento da área da polpa branca nos animais tratados com CXCL10, em relação aos não tratados (Gráfico 1; Tabela 1).

Gráfico 1 - Proliferação linfóide nos grupos experimentais correspondentes aos dias pós infecção. N-infec= Animais sadios controle; InfecTTD= Animais infectados e tratados com CXCL10 (G1); InfecNTTD= Animais infectados e não tratados (G2).



Fonte: Autoral.

A área da polpa branca nos animais infectados (tratados ou não com CXCL10) apresentou-se significativamente maior (até 3x,  $p < 0.05$ ) do que nos controles não infectados; entretanto, não foi observada diferença significativa entre os animais tratados com CXCL10 e não tratados. Ao longo dos tempos de experimento, a proporção de polpa branca nos cortes esplênicos no grupo tratado com CXCL10 (G1-TTD) variou de 7,6 a 11,8 %, enquanto no grupo não tratado (G2-NTTD) variou de 8,0 a 12,1% (Tabela 1).

Tabela 1 - Porcentagens médias de polpa branca por área ( $\text{mm}^2$ ) histológica analisada. Valores de p significativos pelo teste de Kruskal-Wallis. Diferenças significativas apenas entre os grupos não infectados e infectados, independentes do tratamento. D.p.i. = dias pós infecção.

Tempos	Não infectado	Infectado		p
		TTD	NTTD	
10 d.p.i		7.62	8.08	0.024
30 d.p.i	4.38	7.02	9.80	0.040
45 d.p.i		12.04	12.01	0.016

Fonte: Autoral.

#### 5.1.1.2. Quantidade e qualidade das estruturas: PALS, CG, ZM e zona do manto

Nas amostras analisadas do grupo controle negativo, foi notado um perfil dos componentes da polpa branca diferente do notado para as lâminas de animais infectados tratados ou não tratados. O perfil de um animal não infectado é de folículos bem definidos e visivelmente diferenciados da polpa vermelha. Nos folículos, foi observado um PALS com linfócitos maduros e justapostos e com poucos macrófagos dispersos entre estes. Os centros germinativos foram pequenos e não passaram de 2 por lâmina. Também não foi possível distinguir a zona do manto, característica que acompanha a ausência de centros germinativos. A zona marginal, composta de diferentes populações de macrófagos, apresentou 3 a 4 camadas contínuas de macrófagos justapostos, demarcando bem o limite do folículo da polpa branca.

Os animais com 10 dias de infecção (significando 1 dia pós tratamento com CXCL10) apresentaram um perfil que variou entre os graus de organização 1 e 2 da polpa branca (Figura 7). Seus folículos estavam distintos da polpa vermelha, com uma zona

marginal com 4 a 6 camadas de macrófagos com mais citoplasma, portanto, expandida, porém os folículos puderam ser melhor diferenciados na coloração por reticulina (impregnação por  $\text{AgNO}_3$ ). Neste grupo de tratados, 10 dpi, foi possível distinguir diversos centros germinativos nas amostras, com uma mediana de 14 por corte (Gráfico 2), uma densidade de 0,57 por  $\text{mm}^2$ , apesar de apresentar uma zona do manto mal definida ou indistinguível na hematoxilina-eosina. O PALS constituído de linfócitos imaturos, macrófagos dispersos, e com tamanho maior apesar da densidade celular reduzida.

O perfil do grupo não tratado, com 10 dias de infecção, apresentou ampla similaridade com os tratados em relação ao PALS, zona marginal e zona do manto. Sua organização também variou entre 1 e 2. Quanto aos centros germinativos, observados somente em coloração por reticulina, foi obtida uma mediana de 5,5, consideravelmente reduzida em relação ao tratamento com CXCL10 (Gráfico 2).

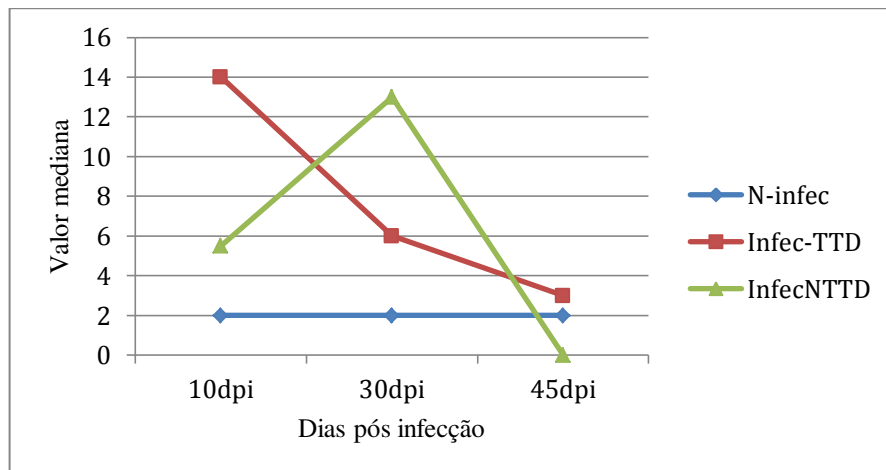
Com 30 dias de infecção, as amostras apresentaram a mesma tendência de arranjo do PALS, da zona marginal e da zona do manto, e o seu grau de organização ficou em 2 para o grupo tratado e entre 2 e 3 para o grupo não tratado. Os folículos também reduziram de tamanho e seus centros germinativos tiveram medianas bem distintas, 6 para o tratado e 13 para o não tratado (Gráfico 2).

Vale ressaltar que aos 45 dias de infecção o perfil mudou para 3 no grau de organização, tanto para o grupo tratado como não tratado. No grupo tratado, o PALS apresentou hipoplasia, no entanto, no grupo não tratado, a estrutura se manteve com o perfil de linfócitos imaturos. Em relação à zona marginal, também foi possível encontrá-la hipoplásica no grupo tratado. No grupo não tratado, se apresentou desorganizada.

A zona do manto também seguiu a mesma condição de má definição. Pela coloração de reticulina foi possível distinguir os centros germinativos e a mediana foi um parâmetro diferenciado entre tratado e não tratado, sendo de 3 no grupo tratado e 0 no grupo não tratado (Gráfico 2).

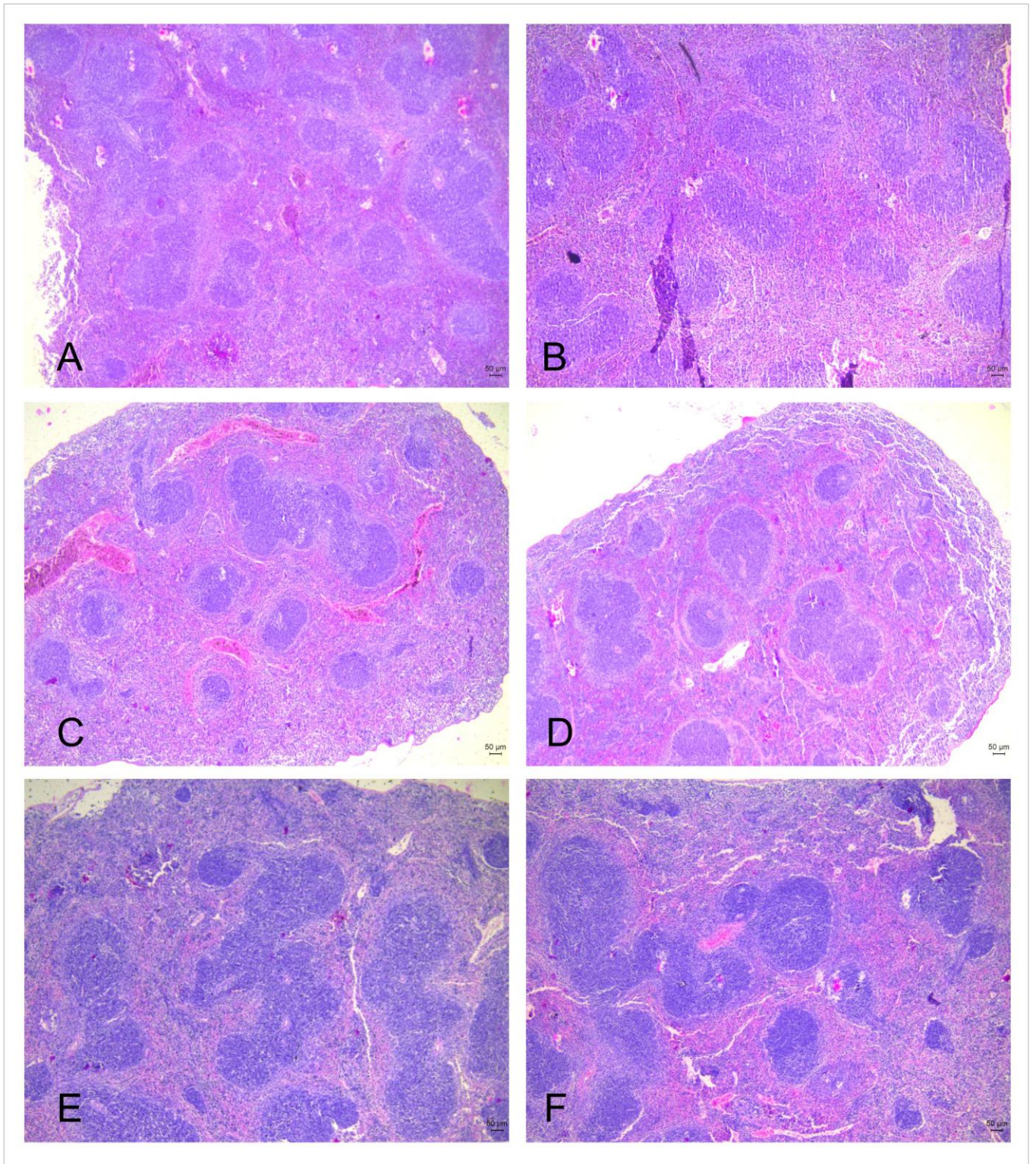


Gráfico 2 – Comparação de valores medianos de centros germinativos encontrados por amostra dos grupos 10dpi, 30 dpi e 45 dpi.



Fonte: Autoral.

Figura 7 – Fotomicrografias panorâmicas de baço (40x). A: G1- 10 dias pós infecção. B: G2 – 10 dias pós infecção. C: G1 – 30 dias pós infecção. D: G2 – 30 dias pós infecção. E: G1 – 45 dias pós infecção. F: G2 – 45 dias pós infecção.



Fonte: Autoral

### 5.1.2. Polpa vermelha

A densidade celular da polpa vermelha teve uma diminuição significativa ao longo dos tempos de tratamento e infecção (Figura 8), sendo computada uma redução de 26,05% nos infectados/tratados e de 14,81% nos infectados/não tratados (Tabela 2).

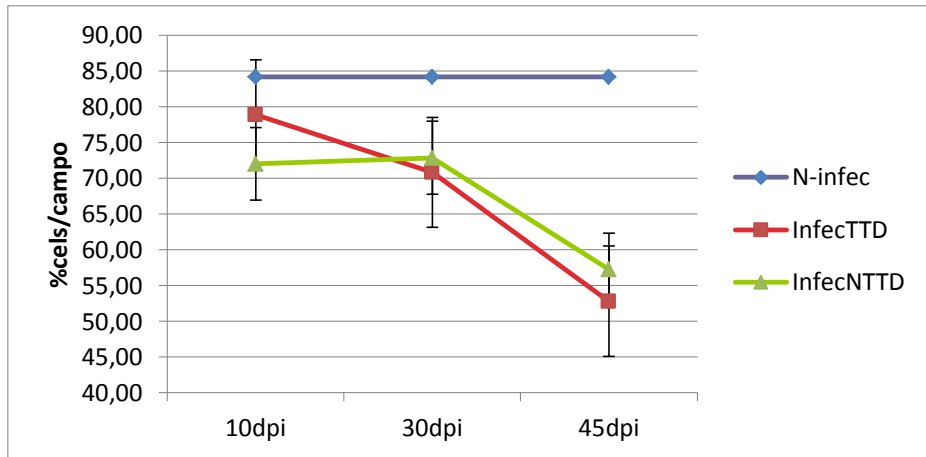
Tabela 2 - Densidade celular proporcional média por recorte de campo de 100x (área de aproximadamente 0.093mm<sup>2</sup>). Valores de p significativos (p<0.05) pelo ANOVA One Way, para diferenças entre infectados e não infectados. Não houve diferenças significativas entre os infectados tratados e não tratados.

Tempos	Não infectado	Infectados		p
		TTD	NTTD	
10dpi		78.86	72.04	0.029
30dpi	84.21	70.84	72.88	0.002
45dpi		52.81	57.23	0.000

Fonte: Autoral.

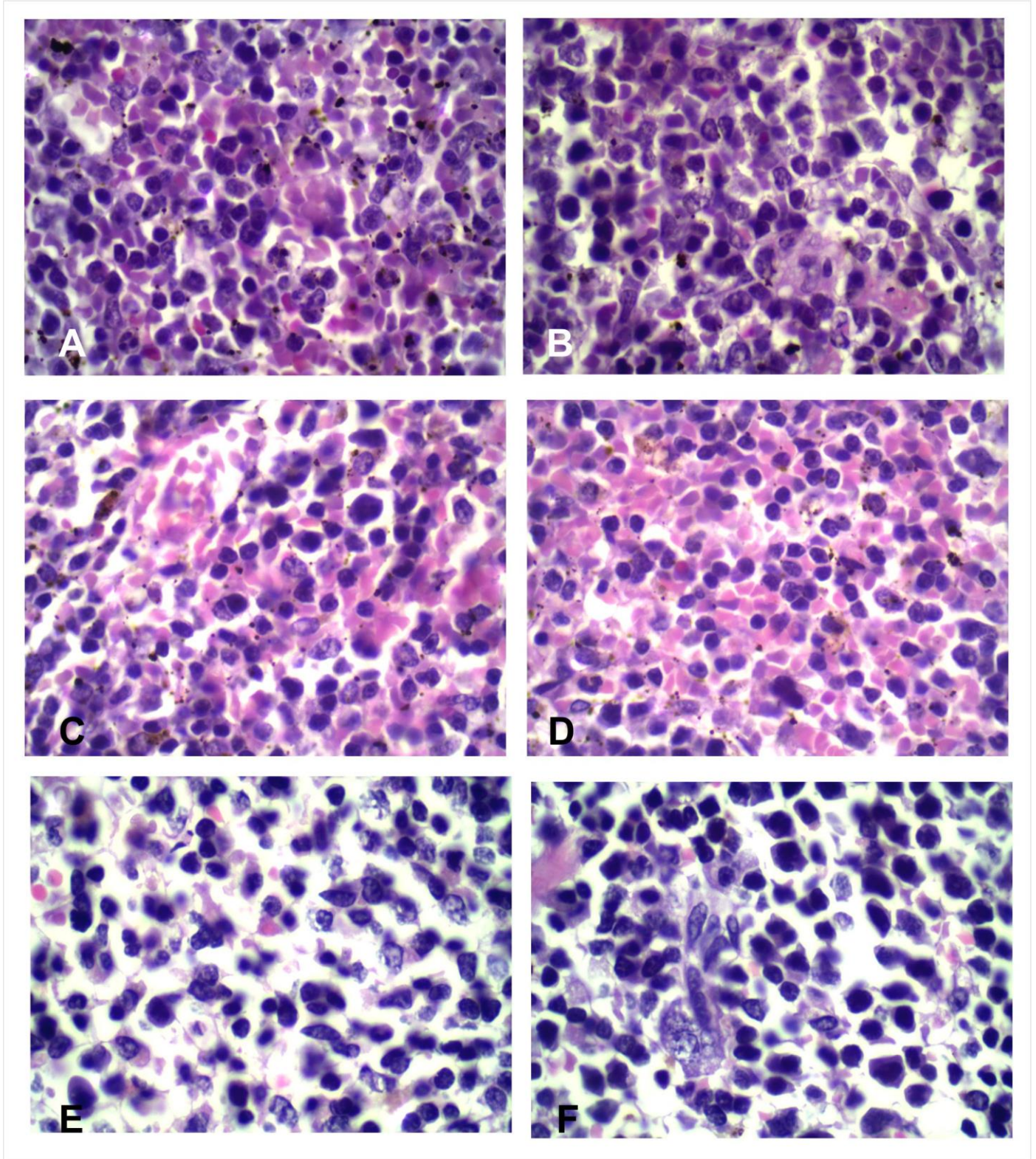
Com 10 dias pós infecção, não houve diferença significativa entre os grupos. Nos demais tempos, observou-se que a perda celular dos infectados, tratados ou não com CXCL10, teve significância em relação aos controles não infectados. Contudo, não foram observadas diferenças significativas de celularidade entre os tratados e não tratados (Figura 8). É possível notar que os valores se encontram sempre próximos e ressaltar a diminuição contínua da densidade celular do grupo tratado, que teve comportamento levemente diferenciado do não tratado, entre 10 e 30 d.p.i (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Evolução das densidades celulares proporcionais médias da polpa vermelha através dos tempos de tratamento. N-infec= Animais sadios controle; InfecTTD= Animais infectados e tratados com CXCL10 (G1);-InfecNTTD= Animais infectados e não tratados (G2).



Fonte: Autorial.

Figura 8 – Fotomicrografias de polpa vermelha do baço (1000x). A: G1- 10 dias pós infecção. B: G2 – 10 dias pós infecção. C: G1 – 30 dias pós infecção. D: G2 – 30 dias pós infecção. E: G1 – 45 dias pós infecção. F: G2 – 45 dias pós infecção.



Fonte: Autoral.

## 6. DISCUSSÃO

A persistência parasitária de *Leishmania infantum* no baço possui imunopatologia complexa e desconhecida em suas particularidades, por envolver diversas células do sistema reticuloendotelial (VARMA; NASEEM, 2010), citocinas e quimiocinas. Essa persistência se dá pela impossibilidade do hospedeiro controlar a carga parasitária e manter o perfil imunológico pró-inflamatório Th1 em meio ao estímulo à produção de IL-10 pelos parasitos. Como intervenção terapêutica, utilizam-se elementos da rede imunológica para proteger o organismo do hospedeiro, através do estímulo à produção de citocinas, por meio de quimiocinas, que estimulam a ação das células efetoras Th1 no combate aos parasitos, como IFN- $\gamma$  (ALEXANDER; BRYSON., 2005, DEY *et al.*, 2007, GUPTA *et al.*, 2011). IFN- $\gamma$  é uma citocina de escolha para combinação com o tratamento antimonial tradicional no tratamento de LVH (FALEIRO *et al.*, 2014).

CXCL10 é uma citocina que vem sendo explorada no campo da imunoterapia da LV. Seja *in vivo* ou *in vitro*, sua ação de ativação leucocitária, balanço entre células T regulatórias e efetoras, quimiotaxia, hematopoiese e aumento da citotoxicidade de células NK (GUPTA *et al.*, 2011), podendo ser de grande proveito para o tratamento da LV. Gupta e colaboradores (2009) induziram em camundongos BALB/c a resposta Th1 contra a infecção por *L. donovani*, por meio de CXCL10 que aumentou a resposta linfoproliferativa no baço. CXCL10 foi capaz de induzir, em modelo murino, uma maior produção de citocinas do perfil Th1, como IFN- $\gamma$  e IL-12, reduzindo a quantidade das citocinas supressoras TGF- $\beta$  e IL-10 durante tratamento. TGF- $\beta$  e IL-10 importantes citocinas produzidas por células Th2 e células Treg que atuam na imunossupressão que agrava a LV (GUPTA *et al.*, 2011).

O comprometimento do baço envolve a alteração da fisiologia normal desse órgão por meio de uma profunda remodelação (ENGWERDA *et al.*, 2002), ocasionada pela perda da organização celular em sua intrincada microarquitetura. O baço possui diversas populações de macrófagos e estruturas que possibilitam a apresentação antigênica para ativação das células efetoras, linfócitos T e B, os centros germinativos (ALLEN; OKADA; CYSTER, 2007). A zona marginal (ZM), que está diretamente relacionada com a apresentação antigênica às células T, é comprometida durante a infecção por *L. donovani* gerando a imunossupressão do hospedeiro. Quando na presença de citocinas como TNF- $\alpha$ , os macrófagos da zona marginal têm apoptose induzida pela presença de alta quantidade de amastigotas em seu fagolisossomo (ENGWERDA *et al.*, 2002) e parasitos persistem entre

seus espaços e continuam a induzir uma resposta imunológica ineficiente para eliminação dos parasitos.

O baço é sítio de infecção ativa e produz diversas alterações hematológicas no hospedeiro, que causam os sintomas típicos da infecção, entre estes, a esplenomegalia diretamente relacionada à hiperplasia dos folículos linfoides da polpa branca (ENGWERDA *et al.*, 2002, VARMA; NASEEM, 2010). Neste trabalho, observou-se nos animais tratados com a quimiocina CXCL10 a prevenção da hiperplasia linfoide no baço, no período agudo da infecção, de maneira minimizar a quebra da arquitetura esplênica de forma severa como ocorre em animais infectados (SANTANA *et al.*, 2008). A CXCL10 atua na indução da produção de IFN- $\gamma$ , produzida por células NK, citocina esta que é indutora do potencial fagocítico de macrófagos (ALEXANDER; BRYSON, 2005, DEY *et al.*, 2007). Outros trabalhos apontaram o aumento da citotoxicidade de células NK em camundongos BALB/c, infectados com *Leishmania major*, tratados com CXCL10 (DEY *et al.*, 2007), logo esta citotoxicidade pode auxiliar a manutenção da estrutura do baço por meio da eliminação de macrófagos infectados.

Na presença de macrófagos ativados, há uma maior produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (DEY *et al.*, 2007), portanto aumentando a ação antiparasitária, que reduz a carga de amastigotas no baço (ALEXANDER; BRYSON, 2005, FIGUEIREDO *et al.*, dados não publicados). Além da redução da carga parasitária, os macrófagos ativados por IFN- $\gamma$  tornam-se produtores de TNF- $\alpha$ , citocina essencial para a remodelação da microarquitetura do baço (ALEXANDER, BRYSON, 2005, STANLEY; ENGWERDA, 2007).

TNF- $\alpha$  é uma citocina conhecida por sua importância durante a resolução autolimitada da infecção por *L. donovani* no fígado, tendo ação durante os primeiros 14 dias de infecção, relacionada à formação de granulomas ativos (ENGWERDA *et al.*, 2004). Contudo, a ação de TNF- $\alpha$  no baço está relacionada à perda de macrófagos da zona marginal (ENGWERDA *et al.*, 2002) e no presente trabalho, isso pode ser observado nos tempos finais do tratamento (45 dias), onde a redução inicial da polpa branca, nos grupos tratados com CXCL10, foi revertida em uma hiperplasia linfoide da polpa branca.

A hiperplasia acompanhou a perda, em número, de centros germinativos, em relação aos tempos anteriores de tratamento, e zona marginal hipoplásica nos grupos tratados. Logo, a hipoplasia pode estar relacionada com o efeito tardio de TNF- $\alpha$  sobre a zona marginal, frente a um estímulo inicial maior do tratamento com CXCL10. A relação de CXCL10 com o rebote de TNF- $\alpha$ , nos tempos finais do tratamento, pode apresentar direta

relação com o período de tratamento utilizado, ressaltando a importância de avaliações dos efeitos de CXCL10 em diferentes tempos, combinada com a investigação de outras citocinas.

A alteração da região de zona marginal do folículo linfóide da polpa branca está associada à perda da migração linfocitária para esta região (FALEIRO *et al.*, 2014). Por outro lado, os centros germinativos estão associados à montagem da resposta humoral, que ocorre por meio do encontro de células B com células T (ALLEN; OKADA; CYSTER, 2007). No presente trabalho, observou-se a manutenção da zona marginal entre 10 d.p.i e 30 d.p.i, e uma consecutiva preservação dos centros germinativos, nos tempos finais, o que sugere que a quimiocina CXCL10 apresentou um efeito protetor, não somente da estrutura, mas também da atividade dos centros germinativos, atraindo linfócitos. Ao contrário, observou-se progressão da perda de centros germinativos nos animais não tratados e infectados, chegando a zero em 45 dias. CXCL10, portanto, apresentou um efeito retentor da atividade linfóide do baço, refletida pela manutenção dos centros germinativos na amostra.

A atividade dos centros germinativos também se relaciona com o endereçamento de linfócitos B ativados, para regiões extra-foliculares, polpa vermelha, ou aos folículos de células B, que estabelecem o desenvolvimento dos centros germinativos (ALLEN; OKADA; CYSTER, 2007). O endereçamento de plasmócitos para fora da polpa branca já é relatado em outros hospedeiros de cepas viscerotrópicas, como humanos e cães associado à ruptura da polpa branca, na forma de plasmocitose (SILVA-O'HARE *et al.*, 2016). Apesar da avaliação da migração das células B não ter sido o foco deste trabalho, é possível que plasmócitos ativados nos centros germinativos lá permaneceram e estimularam os centros germinativos, produzindo anticorpos específicos para os parasitos.

A perda da celularidade da polpa vermelha observado no presente trabalho, pode estar relacionada com a perda de hemácias, já relatada como um efeito comum da infecção com cepas viscerotrópicas (VARMA; NASEEM, 2010). O aumento da população indistinta de células linfóides e mielóides e a manutenção dos centros germinativos requer avaliar quais populações de células linfóides aumentaram na polpa vermelha, culminando numa melhor estimativa do efeito linfoproliferativo de CXCL10.

Estima-se que o tratamento pela via intraperitoneal, no modelo murino, possa ter afetado os resultados no que concerne à perda rápida da ação de CXCL10 frente à metabolização pelo animal, justificando a mudança súbita na proliferação da polpa branca nos grupos tratados. A via intraperitoneal possui a vantagem de obter rápida absorção pelas veias mesentéricas, porém a desvantagem de ter o sangue diretamente direcionado ao fígado, onde pode haver a metabolização hepática (TURNER *et al.*, 2011), neste caso, da quimiocina



CXCL10. A imunogenicidade de compostos usados como fármacos exógenos, pode ser alterada até mesmo pela formação de complexos de anticorpos e o próprio fármaco na corrente sanguínea (TANG; MEIBOHM, 2006). Assim os efeitos observados do tratamento com CXCL10 podem ter sido influenciados pelos diversos mecanismos de metabolização de substâncias exógenas no modelo murino.

CXCL10 é uma quimiocina com grande potencial para o tratamento das leishmanioses e este trabalho abre uma importante avenida para novos estudos com esta quimiocina, incluindo a sua associação com os antimoniais, os fármacos mais utilizados para o tratamento das leishmanioses, com alta toxicidade, de uso prolongado, e algumas cepas de *Leishmania* sp. tem apresentado resistência.

## 7. CONCLUSÃO

Foi observada a ação de CXCL10 no controle da hiperplasia linfóide no baço, no período agudo da infecção, minimizando a quebra da arquitetura esplênica, também foi observada ação de CXCL10 sobre a manutenção da presença dos centros germinativos da polpa branca, indicando esforço de resposta humoral do órgão em relação ao grupo não tratado com CXCL10 nos tempos finais. Não foi observada significativa influência de CXCL10 na manutenção da celularidade da polpa vermelha e nem influência de CXCL10 na proliferação linfóide em camundongos BALB/c infectados com *L. infantum*, em nenhum dos três tempos neste experimento.

Novos experimentos, com maior duração e administração de CXCL10 por via endovenosa são sugeridos para reavaliar os efeitos da *L. infantum* na microarquitetura do baço em camundongos BALB/c.

## REFERÊNCIAS

- AKHOUNDI, M.; KUHL, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A historical overview of the classification, evolution and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Negl Trop Dis**, França, v.10, n.3, p. 1-40, mar. 2016.
- ALLEN C. D.C.; OKADA T.; CYSTER J. G. Germinal Center Organization and Cellular Dynamic. **Immunity**, v. 27, n.2, p. 190–202, ago. 2007.
- ALEXANDER J.; BRYSON K.. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunology Letters**, v. 99, p. 17–23, fev. 2005.
- ALVAR *et al.*, 2012; ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimate of its incidence. **PLoS ONE**, USA, v. 7, n. 5, p.1-12, maio. 2012.
- ALVES D. T. Efeito da quimiocina CXCL10 na infecção de macrófagos por *Leishmania infantum* in vitro. 2016. 46 f. Monografia (Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- ATAYDE V. D.; HASSANI K.; LIRA FILHO A. da S.; BORGES A. R.; ADHIKARI A.; MARTEL C.; OLIVIER M. *Leishmania* exosomes and other virulence factors: impact on innate immune response and macrophage functions. **Cellular immunology**, v. 309, p. 7-18, nov. 2016.
- BABUADZE G.; FARLOW J.; KONING H. P. de; CARRILO E.; CHAKHUNASHVILI G.; MURSKVALADZE M.; KEKELIDZE M.; KARSELADZE I.; KOKAIA N.; KALANDADZE I.; TSERETELI D.; MARKHVASHVILI I.; SIDAMONIDZE K.; CANTURIA G.; ADEISHVILI E.; IMANADZE P. Seroepidemiology and molecular diversity of *Leishmania donovani* complex in Georgia. **Parasites and vectors**, v. 9, n. 279, p. 1-11, mai. 2014.

CHAMPAGNE, A. 2006. *Mesocricetus auratus*. Animal Diversity Web. Disponível em: <[http://animaldiversity.org/accounts/Mesocricetus\\_auratus/](http://animaldiversity.org/accounts/Mesocricetus_auratus/)>. Acesso em dezembro de 2016.

CONCEIÇÃO-SILVA F.; ALVES, C. R. Leishmanioses: uma apresentação. In: CONCEIÇÃO-SILVA, Fátima; ALVES, Carlos Roberto (Org.). **Leishmanioses do Continente Americano**. 1ª ed., Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 2014. p. 17- 85.

CONITEC. Proposta de elaboração protocolo clínico e diretrizes terapêuticas. Leishmaniose visceral. Disponível em: [http://conitec.gov.br/images/Protocolos/Escopo\\_PCDT\\_LeishmanioseVisceral\\_Enquete.pdf](http://conitec.gov.br/images/Protocolos/Escopo_PCDT_LeishmanioseVisceral_Enquete.pdf). Acesso em novembro de 2016.

COSTA D. L.; COSTA C. H. N. Leishmaniose visceral. In: CONCEIÇÃO-SILVA, Fátima; ALVES, Carlos Roberto (Org.). **Leishmanioses do Continente Americano**. 1ª ed., Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 2014. p. 327- 353.

den HAAN J. M. M.; KRAAL G. Innate Immune Functions of Macrophage Subpopulations in the Spleen. **J Innate Immun**, v. 4, p. 437–445, fev. 2012.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v.27, p. 305-318, mar. 2004.

DEY R.; MAJUMDER N.; BHATTACHARYYA MAJUMDAR S.; BHATTACHARJEE S.; BANERJEE S.; ROY S.; MAJUMDAR S. Induction of host protective Th1 immune response by chemokines in *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice. **Scand J Immunol**, v. 66, n. 6, p. 671 -683. 2007.

ENGWERDA C. R.; ATO M.; KAYE P. M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 11, nov. 2004.

ENGWERDA C.R.; ATO M.; COTTERELL S.E.; MYNOTT T.L.; TSCHANNERL A.; GORAK-STOLINSKA P.M.; KAYE P.M. A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. **Am J Pathol**, USA, v.162, n.2, p.429-437, ago. 2002.

ENGWERDA C. R.; ATO M., STAGER S.; ALEXANDER C. E.; STANLEY A.; KAYE P. M. Distinct roles for lymphotoxin-a and tumor necrosis factor in the control of *Leishmania donovani* infection. **American Journal of Pathology**, v. 165, n. 6, p. 2123-2133, dez. 2004.

FALEIRO R. J.; KUMAR R.; HAFNER L. M.; ENGWERDA C. R. Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 7, jul. 2014.

PISCOPO, T. V.; AZZOPARDI, C. M. Leishmaniasis. **Postgrad Med J**, USA, v.82, p. 649-657, out. 2006.

FRAGA J.; MONTALVO A. M.; DONCKER S. De; DUJARDIN J-C.; VAN DER AUWERA G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection, genetics and evolution**, v. 10, p. 238-245, nov. 2010.

GOMES-PEREIRA S.; RODRIGUES O. R.; ROLÃO N.; ALMEIDA P. D.; SANTOS-GOMES G. M. Hepatic cellular immune responses in mice with “cure” and “non-cure” phenotype to *Leishmania infantum* infection: importance of CD8  $\beta$  T cells and TGF- $\beta$  production. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 41, p. 59–68, mar. 2004.

GUPTA G.; BHATTACHARJEE S.; BHATTACHARYYA S.; BHATTACHARYA P.; ADHIKARI A.; MUKHERJEE A.; BHATTACHARYYA MAJUMDAR S.; MAJUMDAR S. CXC chemokine-mediated protection against visceral leishmaniasis: involvement of the proinflammatory response. **J Infect Dis**, v. 200, n.8, p.1300-1310, outubro. 2009.

GUPTA G.; MAJUMDAR S.; ADHIKARI A.; BHATTACHARYA P.; MUKHERJEE A.K.; MAJUMDAR S.B.; MAJUMDAR S. Treatment with IP-10 induces host-protective immune response by regulating the T regulatory cell functioning in *Leishmania donovani*-infected mice. **Med Microbiol Immunol**, v. 200, n.4, p.241-253. 2011.

HANDMAN E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin Microbiol Ver**, v. 14, p.229-243. 2001.

HARKINS K. M.; SHWARTZ R. S.; CARTWRIGHT R. A.; STONE A. C. Phylogenomic reconstruction supports supercontinente origins for *Leishmania*. **Infection, genetics and**

evolution, v. 38, p. 101-109, dez. 2015.

HAUSER A. E.; KERFOOT S.; HABERMAN A. M. Cellular choreography in the germinal center: new visions from in vivo imaging. **Semin imunopathol.**, v. 32, n. 3, p. 239-255, set. 2010.

KAYE P.M.; SVENSSON M.; ATO M.; MAROOF A.; POLLEY R.; STAGER S.; ZUBAIRI S.; ENGWERDA C.R. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunol Rev**, v. 201, p. 239-253. 2004.

KUMAR R.; ANSARI N. A.; AVNINDER S.; RAMESH V.; SALOTRA P. Cutaneous leishmaniasis in Nepal: *Leishmania major* as a cause. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 102, n. 2, p. 202-203, fev. 2008.

KUMAR R.; NYLÉN S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 3, n. 251, p. 1-10, ago. 2012.

LUPPI T.; SIMEONI A. P. P.; PICCININ A. Leishmaniose visceral. Revista científica eletrônica de medicina veterinária, n. 10 Janeiro 2008. Disponível em: <[http://faef.revista.inf.br/imagens\\_arquivos/arquivos\\_destaque/6toc6vsCHqwnWNv\\_2013-5-29-10-4-5.pdf](http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/6toc6vsCHqwnWNv_2013-5-29-10-4-5.pdf)> Acesso em novembro de 2016.

MEBIUS R.E.; KRAAL G. Structure and function of the spleen. **Nat Rev Immunol.**, v. 5, p. 606-616. 2005.

MELBY P.C.; TABARES A.; RESTREPO B.I.; CARDONA A.E.; MCGUFF H.S.; TEALE J.M. *Leishmania donovani*: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. **Exp Parasitol**, v. 99, p.17-25. 2001.

MICHALICK, M.S.M; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. (Ed) **Parasitologia humana**. 11° ed., Ed. Atheneu, São Paulo, 2005. p. 56-72.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose**

**Visceral.** Brasília: Ministério da saúde, 2014.

MOLL H. Dendritic cells and host resistance to infection. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 8, p. 493-500, mar. 2003.

MONTEIRO E. M.; da SILVA J. C. F.; da COSTA R. T.; COSTA D.C.; BARATA R. A.; de PAULA E. V.; MACHADO-COELHO G. L. L.; ROCHA M. F.; FORTES-DIAS C. L.; DIAS E. S. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneo e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 147-152, mar-abr. 2005.

NATARAJAN G.; OGHUMU S.; VARIKUTI S.; THOMAS A.; SASTOSKAR A. Mechanisms of immunopathology of leishmaniasis. In: SASTOSKAR A.; DURVASULA R. (Ed) **Pathogenesis of Leishmaniasis – New developments in research**. 1ª ed., Ed. Springer, New York, 2014. p. 1-13.

NIETO A.; DOMÍNGUEZ-BERNAL G.; ORDEN J.A.; DE LA FUENTE R.; MADRID-ELENA N.; CARRIÓN J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. **Vet Res**, v. 42, p. 39, fevereiro. 2011.

NIH, 2012. RASBAND, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016.

PAHO-WHO. General information: Leishmaniasis. Leishmaniasis. 2014. Disponível em: <[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=9417&Itemid=40250&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9417&Itemid=40250&lang=en)>. Acesso em novembro de 2016.

PAHO-WHO. Visceral Leishmaniasis. 2014. Disponível em: <[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6420&Itemid=39347&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6420&Itemid=39347&lang=en)>. Acesso em novembro de 2016.

PEARSON R. D.; COX G.; JERONIMO S. M. B.; CASTRACANE J.; DREW J. S.; EVANS T.; de ALENCAR J. E. Visceral leishmaniasis: a model for infection-induced cachexia. **Am.**

**J. Trop. Med. Hyg.**, v. 47, n. 1, p. 8-15. 1992.

PEARSON R.D.; SOUSA A.Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, n.1, p. 1-13, jan. 1996.

PORROZI R.; CAVALCANTI A. dos S.; CUPOLILLO E. Modelos experimentais da Leishmaniose Visceral. In: CONCEIÇÃO-SILVA, Fátima; ALVES, Carlos Roberto (Org.). **Leishmanioses do Continente Americano**. 1ª ed., Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 2014. p. 277- 292.

R PROJECT, 2015. R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

RODRIGUES V.; CORDEIRO-DA-SILVA A.; LAFORGE M.; SILVESTRE R.; ESTAQUIER J. Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. **Parasites and vectors**, v. 9, n. 118, p. 1-13, mar. 2016.

SACKS D. L.; MELBY P. C. Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. **Curr Protoc Immunol**, v. 28, n. 19.2, p. 19.2.1–19.2.20, mai. 2001.

SANTANA C.C.; VASSALO J.; de FREITAS L. A. R.; OLIVEIRA L. C.; DOS-SANTOS W. L. C. Inflammation and structural changes of the splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. **Parasite Immunology**, v. 30, p. 515-524, mai. 2008.

SCHRAMM J. M. de A.; CAMPOS M. R.; EMMERICK I. C. M.; MENDES L. V. P.; MOTA J. C.; SILVA JUNIOR S. H. A. Análise espacial de doenças negligenciadas no Brasil, 2007-2009. **Tempus, actas de saúde colet**, v. 10, n. 2, p. 119-142, jun. 2016.

SILVA-O'HARE J.; DE OLIVEIRA I.S.; KLEVORN T.; ALMEIDA V.A.; OLIVEIRA G.G.S.; ATTA A.M.;DE FREITAS L.A. R.; DOS SANTOS W. L. C. Disruption of Splenic Lymphoid Tissue and Plasmacytosis in Canine Visceral Leishmaniasis: Changes in Homing and Survival of Plasma Cells. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5. 2016.



SOONG L.; HENARD C. A.; MELBY P. C. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. **Semin Immunopathol**, v. 34, p. 735–75, out. 2012.

STANLEY A.C.; ENGWERDA C.R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunol Cell Biol.**, v. 85, p. 138-147. 2007.

TANG L.; MEIBOHM B. Pharmacokinetics of Peptides and Proteins. In: MEIBOHM B. (Ed.) **Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Biotech Drugs: Principles and Case Studies in Drug Development**. 1ª ed., Ed. Wiley-vch Verlag gmbh & Co, Weinheim, p. 17-38. 2006.

TÁVORA L. G. F.; NOGUEIRA M. B.; GOMES S. T. Visceral leishmaniasis/HIV co-infection in northeast Brazil: evaluation of outcome. **Braz J Infect Dis**, v. 19, n. 6, p. 651-656, set. 2015.

TEIXEIRA M.J.; TEIXEIRA L.R.; ANDRADE B.B.; BARRAL-NETTO M.; BARRAL A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. **Trends Parasitol**, v. 22, n. 1, p. 32-40, jan. 2006.

THE JACKSON LABORATORY. BALB/cJ. Mouse strain datasheet – 000651. Disponível em: <<https://www.jax.org/strain/0006x51>>. Acesso em 6 janeiro de 2017.

TURNER P. V.; BRABB T.; PEKOW C.; VASBINDER M. A. Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 600–613, set. 2011.

VARMA N.; NASEEM S. Hematologic changes in visceral leishmaniasis/kala azar. **Indian J Hematol Blood Transfus**, v. 26, n. 3, p. 78-82, set. 2010.

WHO. Neglected tropical disease. Visceral leishmaniasis: WHO publishes validation document as countries approach elimination. Disponível em: <[http://www.who.int/neglected\\_diseases/news/Visceral\\_leishmaniasis\\_WHO\\_publishes\\_valid](http://www.who.int/neglected_diseases/news/Visceral_leishmaniasis_WHO_publishes_valid)>

ation\_document/en/>. Acesso em novembro de 2016.

WHO. Leishmaniasis. Clinical forms of leishmaniasis. Disponível em: <[http://www.who.int/leishmaniasis/clinical\\_forms\\_leishmaniasis/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/clinical_forms_leishmaniasis/en/)>. Acesso em novembro de 2016.

WHO. Leishmaniasis. Diagnosis, detection and prevention. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/surveillance/en/>. Acesso em novembro 2016.

WHO. Leishmaniasis. The vector. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/vector/en>. Acesso em novembro de 2016.

WHO. Neglected Tropical Diseases. The post Kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) atlas. Disponível em: < [http://www.who.int/neglected\\_diseases/resources/9789241504102/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/resources/9789241504102/en/)>. Acesso em dezembro de 2016.

WILSON M.E.; JERONIMO S.M.; PEARSON R.D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microb. Pathog.** 2005, (4): 147-60.