



UFRJ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**CAMPUS DUQUE DE CAXIAS – PROFESSOR GERALDO CIDADE
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOTECNOLOGIA**

Larissa Suzana Silva dos Santos

**Análise do perfil de macrófagos no baço de cães
naturalmente infectados com *L. infantum***

DUQUE DE CAXIAS

2023

Larissa Suzana Silva dos Santos

**Análise do perfil de macrófagos no baço de cães
naturalmente infectados com *L. infantum***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas: Biotecnologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Duque de Caxias Professor Geraldo Cidade, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Fernanda Nazaré Morgado.

Coorientador: Tainã Luís de Souza.

Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz.

Duque de Caxias

2023

CIP - Catalogação na Publicação

S237a Santos, Larissa Suzana Silva dos
Análise do perfil de macrófagos no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum* / Larissa Suzana Silva dos Santos. -- Rio de Janeiro, 2023. 40 f.

Orientadora: Fernanda Nazaré Morgado.
Coorientador: Tainã Luis de Souza.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Duque de Caxias Professor Geraldo Cidade, Bacharel em Ciências Biológicas: Biotecnologia, 2023.

1. Leishmaniose visceral canina. 2. baço. 3. *Leishmania infantum*. 4. macrófago. 5. imunopatologia. I. Morgado, Fernanda Nazaré, orient. II. de Souza, Tainã Luis, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

Larissa Suzana Silva dos Santos

Análise do perfil de macrófagos no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas: Biotecnologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Duque de Caxias Professor Geraldo Cidade, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Data da aprovação: 28 de Julho de 2023

Banca Examinadora

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Nazaré Morgado, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz

Prof. Dra. Marisa Carvalho Suarez, Campus Duque de Caxias, UFRJ

Prof. Dr. Renato Porrozzi de Almeida, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz

Dedico aos meus pais, Jonas, Janete e a minha avó, Maria Lúcia.

Pessoas as quais me inspiram vencer!

Agradecimentos

Essa etapa da minha vida foi muito importante para todos os aspectos que construíram a mulher que eu sou hoje. A graduação não só foi a realização de um sonho, como a descoberta de um ser humano que eu não sabia que existia. Entrei uma Larissa e estou saindo uma completamente diferente, devido a acontecimentos incrivelmente bons, assim como devido a eventos não tão bons assim. Através de toda essa caminhada descobri a força e perseverança de Deus e do Espírito Santo, do companheirismo de amigos, do apoio da minha família. Eu não teria conseguido chegar até aqui sozinha, portanto, é uma honra agradecer.

Quero agradecer a UFRJ por ter me dado a oportunidade de ter acesso a todo conhecimento e experiência de trabalho que obtive estando aqui, não só estudando como estagiando.

Agradecer a minha mãe Janete, meu pai Jonas, meus irmãos Jonas Gabriel e Milena, a minha vó materna, Maria Lúcia. Eles foram essenciais para me manter no foco, por me dar toda a base que eu precisei para estudar e ter acesso a oportunidade que eu tive para me graduar, por acreditarem em mim e nunca permitirem que eu me colocasse para baixo, devido a nota de uma prova ou a uma apresentação que me deixa nervosa, ou a momentos em que me senti extremamente fraca e incapaz.

Quero agradecer aos amigos, que fiz durante o processo de graduação. Os amigos do meu primeiro dia, desde o trote, Crislaine Santos, Lucas Porto, Vitor Fernando, Eduardo Matheus, João Lira, Ana Rafaella.

Aos amigos e irmãos que fiz aos longos dos anos da graduação, Gabriel Almeida, David Aquino, Roberto Almeida, Vinicius Hir, Ana Carolina Pires, Vitor Damasceno, Thaís Vieira e aos amigos que tenho desde antes mesmo dessa caminhada, Ricardo Maquieiro e Pedro Bernardo, que juntamente com a Crislaine, formamos uma família.

Aos amigos que fiz em estágios, que foram essenciais para o meu crescimento profissional e que hoje em dia fazem parte da minha vida pessoal, como, Gabriel Ribeiro, Clara Nogueira, Tawany Moraes, Ingrid Del Castillo, Mariana Queiroz, Maria Luiza, Letícia Maria, Emanuelle Vasconellos.

Ao meu laboratório na Fiocruz, que me deu a oportunidade de fazer parte de uma equipe incrível de pessoas profissionais, que dispõe de um ambiente de trabalho super agradável e atencioso, pronto para receber um aluno que se dedica a crescer. Através de bastante aprendizado, que me permitiu o conforto dos questionamentos, das dúvidas sobre determinados processos e possíveis futuros estudos. O Laboratório de Imunoparasitologia(LIP), foi um presente no final da graduação para que eu pudesse defender a monografia da forma que eu sempre sonhei, estudando o que eu amo e com professores e alunos de dedicação admiráveis. Obrigada a toda equipe, minha orientadora Prof. Dra. Fernanda Morgado, Prof. Dra. Marta Santiago, Prof. Dr. Renato Porrozzzi, a aluna de Doutorado Francini Ribeiro, ao meu co-orientador, Dr. Tainã Souza. Por mais medo ou insegurança que eu tive durante esse processo, essas pessoas foram responsáveis por terem me inspirado a levantar e continuar com a realização desse sonho. Quero agradecer também, por toda a contribuição deste trabalho, as agências de fomento, PIBIC, CNPQ, a banca examinadora e ao corpo docente da UFRJ. Depois de anos nesse caminho enriquecedor que tive até o dia de hoje, a partir de agora, sei que tem um futuro brilhante me aguardando, pois sei que sou capaz.

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.”
(Josué 1:9)

Resumo

A leishmaniose visceral (LV) constitui um importante problema de saúde pública devido à grande quantidade de pessoas sob risco de infecção e a alta letalidade quando não tratada. O cão doméstico é considerado o principal reservatório no ambiente urbano e pode apresentar infecção progressiva e alta carga parasitária em diversos tecidos. O baço tem sido descrito como um dos órgãos mais afetados na LV canina, apresentando reação granulomatosa, desorganização da polpa branca esplênica, aumento da expressão de metalopeptidase-9 (MMP9) e persistência parasitária. Macrófagos M2 e macrófagos exaustos já foram descritos no baço, porém em outros modelos de infecção. Na leishmaniose, estes perfis celulares poderiam servir como sítios de escape para a leishmania funcionando como locais para a sua replicação. Este estudo teve como objetivo analisar qualitativa e quantitativamente os perfis de macrófagos exaustos, M1 e M2 no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum*, correlacionando os dados encontrados com o nível de desorganização da polpa branca esplênica (PBE), carga parasitária e sintomatologia. O baço de trinta e um cães com diagnóstico confirmado de LVC foram incluídos no estudo. As células foram isoladas e analisadas por citometria de fluxo. Além disso, amastigotas e a expressão de arginase-1 foram co-localizadas *in situ* por imunofluorescência. Amastigotas foram observadas no interior de células com expressão positiva e negativa da enzima arginase, mostrando que ambas podem favorecer a sobrevivência do parasito no meio intracelular. Houve redução de células M2 (CD14⁺arginase⁺) e aumento do perfil de exaustão (PD-L1⁺) em animais com pior quadro clínico e polpa branca desorganizada, respectivamente. Além disso, foram identificadas células arginase-1^{high}. Houve correlação entre macrófagos exaustos (CD14⁺PD-L1⁺) e células arginase-1⁺ sugerindo uma associação entre estas duas vias de regulação no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Os dados sugerem ainda que ambos mecanismos de regulação contribuem para o dano tecidual e progressão da doença.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina, baço, *Leishmania infantum*, macrófago, imunopatologia, exaustão, arginase-1.

Abstract

Visceral leishmaniasis (VL) is an important public health problem due to the large number of people at risk of infection and the high lethality when untreated. The domestic dog is considered the main reservoir in the urban environment and may present progressive infection and high parasite load in several tissues. The spleen has been described as one of the most affected organs in canine VL, showing granulomatous reaction, disorganization of splenic white pulp, increased expression of metalloproteinase-9 (MMP9) and parasite persistence. M2 macrophages and exhausted macrophages have already been described in the spleen, but in other infection models. In leishmaniasis, these cell profiles could serve as escape sites for *Leishmania* functioning as sites for its replication. This study aimed to qualitatively and quantitatively analyze the profiles of exhausted macrophages, M1 and M2 in the spleen of dogs naturally infected with *L. infantum*, correlating the data found with the level of splenic white pulp (SWP) disorganization, parasite load and symptomatology. The spleens of thirty one dogs with confirmed diagnosis of CVL were included in the study. Cells were isolated and analyzed by flow cytometry. In addition, amastigotes and arginase-1 expression were co-localized in situ by immunofluorescence. Amastigotes were observed inside cells with positive and negative expression of the enzyme arginase, showing that both may favor parasite survival in the intracellular milieu. There was a reduction of M2 cells (CD14+arginase+) and an increase of the exhaustion profile (PD-L1+) in animals with worse clinical picture and disorganized white pulp, respectively. In addition, arginase-1^{high} cells were identified. There was a correlation between exhausted macrophages (CD14+PD-L1+) and arginase-1⁺ cells suggesting an association between these two regulatory pathways in the spleen of dogs naturally infected with *L. infantum*. The data further suggest that both regulatory mechanisms contribute to tissue damage and disease progression.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis, spleen, *Leishmania infantum*, macrophage, immunopathology, exhaustion, arginase-1.

Lista de siglas e abreviaturas

APC – Células apresentadoras de antígenos

BSA - Albumina de soro bovino

CD14 - Grupamento de diferenciação 14

CFMV - Conselho Federal de Medicina Veterinária

DMSO - Dimetilsulfóxido

IFN- γ - Interferon gama

IL-4 - Interleucina 4

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

IL-13 - Interleucina 13

iNOS - óxido nítrico-sintase induzida

LV - Leishmaniose Visceral

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

MMP9 - metalopeptidase-9 ou metaloproteinase-9

NOS2- Óxido nítrico sintase 2

OMS - Organização mundial da saúde

PBE - polpa esplênica branca

PBMC - célula mononuclear do sangue periférico

PBS - Tampão fosfato-salino

PD1- Proteína de morte celular programada 1

PDL1- Ligante de morte programada 1

SBF- Soro fetal bovino

TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

UFRJ - Universidade federal do Rio de Janeiro

WHO - *World Health Organization* / Organização Mundial da Saúde

Sumário

1.Introdução	11
1.1 Leishmaniose	11
1.2 Leishmaniose Visceral Canina: reservatório, sinais clínicos, diagnóstico e tratamento	12
1.3 Resposta imune	14
1.4 Baço como alvo dos parasitas (histologia)	15
1.5 Exaustão celular	16
2.Objetivos	18
2.1 Objetivos específicos	19
3. Materiais e métodos	19
3.1 Animais	19
3.2 Aspectos éticos	20
3.3 Preparo de Soluções	20
3.4 Análise do baço	20
3.5 Isolamento de PBMC	21
3.6 Isolamento de esplenócitos	21
3.7 Congelamento	21
3.8 Descongelamento	22
3.9 Citometria de Fluxo	22
3.10 Imunofluorescência	23
3.11 Análise estatística	24
4. Resultados	24
4.1 Detecção de células PDL1 ⁺ e arginase-1 ⁺ em cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i>	24
4.2 Detecção de amastigotas em células arginase-1 ⁺	28
5. Discussão	30
6. Conclusão	31
7. Referências Bibliográficas	32

1.Introdução

1.1 Leishmaniose

A leishmaniose é causada por parasitos protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, que podem infectar diversos mamíferos (KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1986, STEVERDING, 2017).

O desenvolvimento da leishmaniose se inicia através da picada do flebotomíneo fêmea, que transmite os parasitas para o hospedeiro mamífero, ao se alimentar de sangue (MURRAY *et al.*, 2005; SACKS e KAMHAWI, 2001). É uma doença tropical e subtropical, transmitida por insetos vetores flebotomíneos, endêmicas em áreas geográficas desde o nordeste da África, sul da Europa, Oriente Médio e as Américas do Sul e Central (ALVAR *et al.*, 2012).

A leishmaniose pode apresentar diferentes formas clínicas, genericamente conhecidas como cutânea, mucosa e visceral. Diversas espécies já foram descritas havendo uma relação com as formas clínicas desenvolvidas. No Brasil, a forma cutânea localizada pode ser causada por diversas espécies, sendo as mais comuns *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. *L. amazonensis* é também agente causal da Leishmaniose difusa. A forma mucosa pode ser causada pela *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. A leishmaniose visceral (LV) é causada pela *L. infantum*, sendo esta última, a forma mais grave da doença. A LV pode cursar com febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia, como manifestações clínicas, sendo fatal se não for tratada adequadamente (MURRAY *et al.*, 2005). São apresentadas como grupo de risco, crianças com menos de 5 anos, pessoas imunocomprometidas e que manifestam desnutrição (SILVA *et al.*, 2005; CRUZ *et al.*, 2006; MACIEL *et al.*, 2008).

O ciclo de vida da *Leishmania*, compreende dois perfis de hospedeiros: 1- intermediários - sendo eles, flebotomíneos, que são insetos dípteros, nos quais as formas promastigotas, alongadas, móveis e flageladas replicam; 2- definitivos - diferentes espécies de mamíferos, nos quais o parasita se apresenta como amastigotas, reconhecidas como formas arredondadas com flagelo encurtado (PETERS, KILLICK-KENDRICK, 1987a). As formas infectantes se diferenciam no

intestino médio do flebotomíneo, são denominadas promastigotas metacíclicas (HANDMAN e BULLEN., 2002) e são regurgitadas na pele do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo dos vetores (OLOBO-OKAO e SAGAKI, 2014). Na pele, as promastigotas são fagocitadas convertendo-se em amastigotas no interior das células hospedeiras, principalmente macrófagos e neutrófilos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). As amastigotas replicam no interior do fagossoma, se disseminam por via sanguínea podendo atingir diversos órgãos, e após a morte da célula hospedeira, as amastigotas liberadas infectam outras células fagocíticas (HANDMAN e BULLEN., 2002).

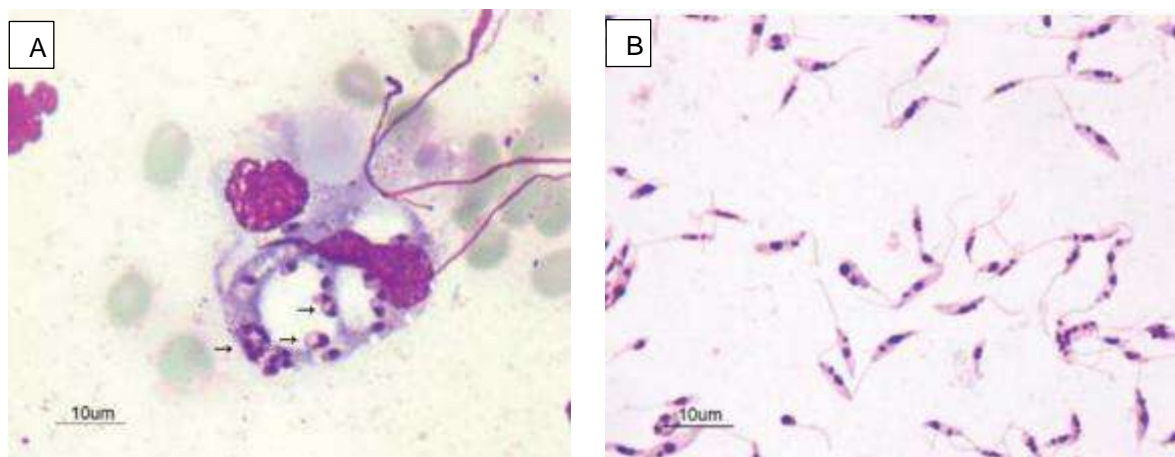


Figura 1: Formas evolutivas do parasito *Leishmania*. Em A, as formas amastigotas. Em B formas promastigotas. Fonte: OPAS, 2019.

1.2 Leishmaniose Visceral Canina: reservatório, sinais clínicos, diagnóstico e tratamento

A *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) é a principal espécie causadora da forma zoonótica da leishmaniose visceral (ALVAR *et al.*, 2004). No Brasil, a leishmaniose visceral é uma zoonose e os cães são considerados os principais reservatórios no ambiente urbano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Além da transmissão vetorial, infecção por transfusão de hemoderivados de doadores infectados, transmissão vertical e venérea são considerados outros modos comprovados de transmissão (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011).

Estudos de SCORZA *et al.*, 2021 mostraram um dermatropismo parasitário em cães infectados verticalmente. Assim, a pele de cães infectados representa uma importante fonte de infecção para o vetor (SCORZA *et al.*, 2021). Casos caninos de

leishmaniose visceral canina (LVC), tem precedido casos humanos de LV e a infecção em cães ocorre de forma mais prevalente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A LVC é uma doença crônica e multissistêmica, entretanto, os cães podem apresentar infecções subclínicas ou sinais clínicos variáveis (BANETH *et al.*, 2008; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011). Existem sinais clínicos que são descritos como mais recorrentes do que outros, como as lesões cutâneas, descritas em mais de 50% dos casos (ALVAR *et al.*, 2004). Dentre as manifestações cutâneas, a alopecia e descamação, generalizada ou em diferentes níveis de dermatite, localizadas pontualmente na pele, face, orelha e membros são frequentemente observados (ORDEIX *et al.*, 2005). Além das manifestações dermatológicas, outras manifestações clínicas incluem: linfadenopatia, (ALVAR *et al.*, 2004; SEMIAO-SANTOS *et al.*, 1995) esplenomegalia considerável (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009; SLAPPENDEL, 1988), manifestações oculares (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009), como conjuntivite (SEMIAO-SANTOS *et al.*, 1995), blefarite, ceratoconjuntivite (KOUTINAS *et al.*, 1999), progredindo até a cegueira (SWENSON *et al.*, 1988), doenças renais (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009) incluindo, glomerulonefrite e nefrite tubulointersticial (COSTA *et al.*, 2003), perda de peso, apatia, anorexia e alteração locomotora (ALVAR *et al.*, 2004; SEMIAO-SANTOS *et al.*, 1995), podendo evoluir para caquexia e atrofia muscular (SLAPPENDEL, 1988; RALLIS *et al.*, 2005). Devido à alta variedade de sinais clínicos, o diagnóstico se torna complexo. Além disso, infecções concomitantes podem dificultar o diagnóstico (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011). Métodos de diagnósticos parasitológicos, moleculares e sorológicos são aplicados para a detecção da infecção por *L. infantum* (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011). O diagnóstico parasitológico, ou seja, a observação de amastigotas através de punção aspirativa de linfonodo, medula óssea ou baço e em biopsias de pele é considerado um método definitivo (RIBEIRO *et al.*, 2018).

De acordo com o guia Leishvet, diferentes protocolos de tratamentos foram sugeridos dependendo do estadiamento clínico dos animais (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011). No Brasil, o produto Milteforan, é o único produto registrado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e da Saúde (MS) para o tratamento da LVC (CFMV, 2018). O tratamento em cães reduz temporariamente os sinais clínicos, mas não previne a ocorrência de recidivas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Além do tratamento, a prevenção do contato do cão com o inseto vetor é de

grande importância (RIBEIRO *et al.*, 2018). Assim, a utilização de redes de malha fina em janelas e canis, utilização de repelentes e eliminação de material orgânico peridomiciliar são consideradas importantes medidas para a prevenção da LVC (RIBEIRO *et al.*, 2018).

1.3 Resposta Imune

Durante a infecção por leishmaniasis, macrófagos são considerados principais células hospedeiras (TOEPP; PETERSEN, 2020) e desempenham um importante papel no controle da infecção através da produção de óxido nítrico (NO) mediando a eliminação intracelular de amastigotas (BANETH *et al.*, 2008). Já foram descritos diferentes perfis de macrófagos dependendo das suas propriedades anti ou pró-inflamatórias, sendo os subgrupos M1 e M2 (M2a, M2b, M2c, M2d) os mais bem definidos (SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018). A polarização para um fenótipo M1 ou M2, é dependente de citocinas Th1 ou Th2 respectivamente e determina a resistência ou susceptibilidade à infecção (CARNEIRO *et al.*, 2021). Em cães com *L. infantum*, respostas mistas entre Th1 e Th2 são observadas e a inclinação da resposta na direção Th2 se associa com a progressão da doença, enquanto uma resposta direcionada ao perfil Th1 é responsável pela resistência à infecção e pela atividade protetora (BANETH *et al.*, 2008). As células T *helper-1* (TH1), responsáveis por produzir interferon- γ (IFN- γ), promovem uma proteção antiparasitária, ao mesmo tempo que, as células T *helper-2* (TH2), responsáveis pela produção de interleucina IL-4 e IL-10 pioram o estado da doença (KEMP, 1997). A indução de IL-10 e a inibição de sinais pró-inflamatórios resultam na polarização de macrófago M2 (CONCEIÇÃO-SILVA e MORGADO, 2019). A polarização dos macrófagos para perfil M2 é fundamental para que a reparação tecidual e a manutenção da homeostase aconteçam (PATEL *et al.*, 2017). No entanto, pode ser utilizada pelo parasito como mecanismo de escape e persistência parasitária (CARNEIRO, 2021). Macrófagos M2 podem ser ativados por IL-4 e IL-13 resultando na expressão de arginase-1 e redução da expressão de NO tornando essas células nichos de replicação do parasito (CARNEIRO *et al.*, 2021).

Macrófagos M1 (ativados pela via clássica) são caracterizados pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, interleucina IL-12 e IL-23, assim como altos níveis de

óxido nítrico (NO) (GORDON, 2003). A expressão de IL-12 por macrófagos promove uma resposta do tipo Th1 e elevados níveis de IFN- γ (TOEPP e PETERSEN, 2020).

Os macrófagos M1 são capazes de expressar óxido nítrico sintase 2 (NOS2) induzida que tem como substrato a arginina para a formação de óxido nítrico (NO). De forma antagônica, M2 utiliza a arginina como substrato, no entanto para a produção de ornitina e ureia (LAMPIASI, RUSSO; ZITO, 2016).

As diferenças apresentadas entre os macrófagos M1 e M2 podem ser observadas na figura 2.

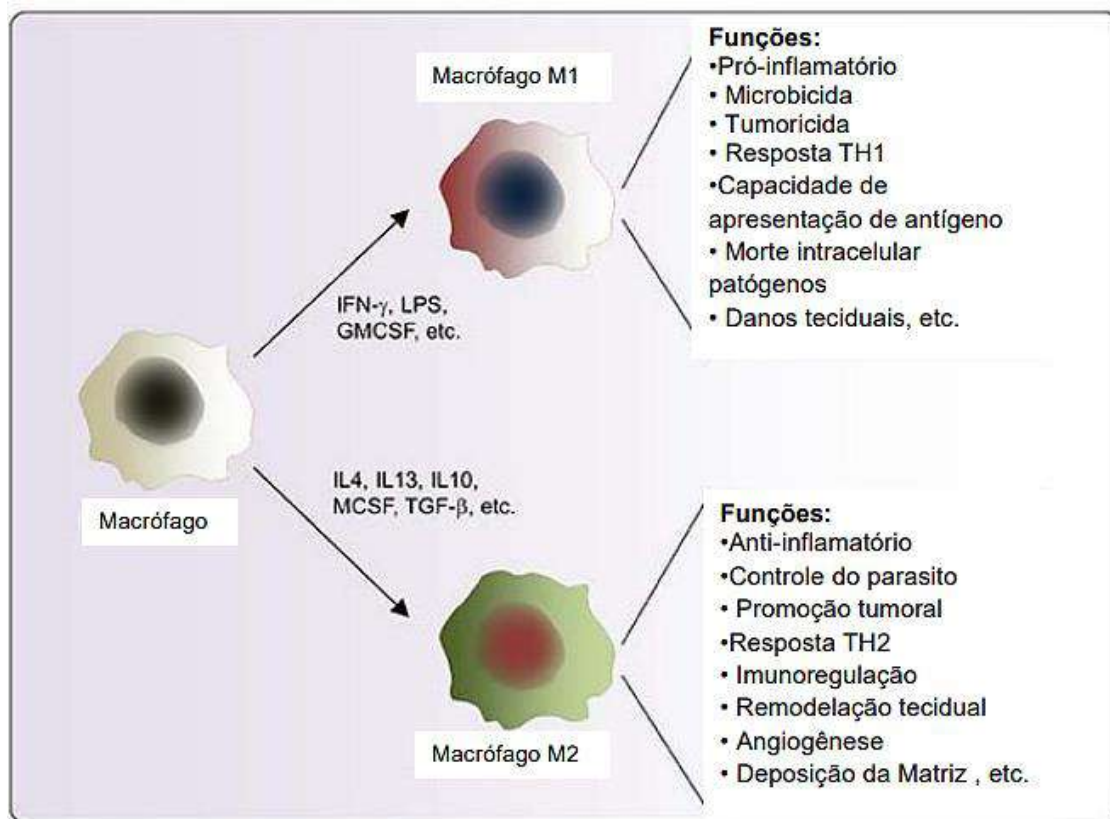


Figura 2: Diferenças apresentadas entre os macrófagos M1 e macrófagos M2. Fonte: Adaptado de Saqib *et al.*, 2018.

1.4 Baço como alvo dos parasitas (histologia)

O baço é um órgão linfoide secundário e está frequentemente comprometido na leishmaniose visceral humana e animal (HERMIDA *et al.*, 2018). Os pacientes desenvolvem esplenomegalia e o baço é um importante local de replicação e

persistência parasitária (HERMIDA *et al.*, 2018). Nele, podem ser observadas alterações histológicas, que se correlacionam com a evolução da infecção, como por exemplo, hiperplasia de polpa vermelha, desorganização da polpa branca esplênica e atrofia dos folículos linfóides, redução do número de células dendríticas foliculares e plasmocitose da polpa vermelha (PV) (HERMIDA *et al.*, 2018; CAVALCANTI *et al.*, 2015). A alta carga parasitária e a piora clínica estão correlacionadas às modificações na estrutura histológica esplênica (LIMA *et al.*, 2014; CAVALCANTI *et al.*, 2015; ABBEHUSEN *et al.*, 2017).

1.5 Exaustão celular

Foi observado em cães naturalmente infectados com o parasita, uma relevante desorganização da polpa branca esplênica (PBE) (SANTANA *et al.*, 2008; CAVALCANTI *et al.*, 2015). Entretanto, os mecanismos que levam a desorganização esplênica e sua relação com os parasitas ou a resposta imune ainda não foram totalmente esclarecidos. O desenvolvimento de respostas imunes específicas e ativação de um perfil eficaz de linfócitos efetores dependem da manutenção da microarquitetura esplênica e de suas áreas de segregação (REIS *et al.*, 2009; RODRÍGUEZ-CORTÉS *et al.*, 2016). A apresentação dos sinais clínicos, a depressão da resposta celular específica e a resposta humoral exacerbada são características que representam a evolução da doença ativa em cães infectados com *L. infantum* (MAIA; CAMPINO, 2012). Diversos estudos já demonstraram a relação entre a progressão da doença e a desorganização da microarquitetura esplênica (SANTANA *et al.* 2008; SILVA *et al.* 2013), resultando na elevação da carga parasitária e diminuição da expressão das citocinas, quimiocinas e receptores de quimiocinas (NASCIMENTO *et al.* 2013), que condiz com o perfil de uma exaustão celular.

A exaustão das células T é caracterizada pela redução da função efetora (WHERRY, 2011). A perda gradativa das funções efetoras, como a redução da produção de TNF- α e IFN- γ , redução na proliferação e na citotoxicidade são observadas durante a exaustão das células T (MARTINIC; VONHERRATH, 2008). Este fenômeno foi inicialmente descrito em infecção viral em camundongos cronicamente infectados pelo vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV), e

evidenciada pela expressão do receptor de morte programada 1 (PD-1) (BARBER *et al.*, 2006). A estimulação antigênica repetida é um dos fatores indutores de exaustão celular presente em uma série de infecções crônicas, e leva a um estado não responsivo (EICHBAUM, 2011).

A ativação de PD-1 promove a apoptose celular e inibe a proliferação, assim como a produção de citocinas (JOSHI *et al.*, 2009). A expressão do ligante de PD-1, PD-L1, já foi evidenciada em linfócitos B, linfócitos T, macrófagos e células dendríticas no baço (EICHBAUM, 2011). A expressão de PD-1 e CTLA-4 em células CD8⁺ periféricas e esplênicas foram demonstradas em humanos com LV (GAUTAM *et al.*, 2014) e também em camundongos experimentalmente infectados por *Leishmania donovani* (JOSHI *et al.*, 2009; GAUTAM *et al.*, 2014; MURPHY *et al.*, 1998).

Diversos estudos vêm demonstrando que a exaustão celular pode ser revertida *in vivo* e *in vitro*, através da administração de anticorpos específicos para o ligante PD-L1, resultando na recuperação da capacidade de proliferação das células CD8⁺, secreção de citocinas, eliminação de células infectadas e redução da carga viral (BARBER *et al.*, 2006). Portanto, receptores e ligantes envolvidos no processo de exaustão celular apresentam grande potencial para novos métodos de imunomodulação e estratégias terapêuticas eficazes. Estratégias terapêuticas que reduzam a carga parasitária a ponto de o cão deixar de ser fonte de infecção para o vetor, seria algo promissor. Entretanto, o mecanismo de exaustão celular em cães não está completamente elucidado. Assim, se faz necessário um melhor entendimento sobre o processo de exaustão celular em cães com LVC. Os receptores e ligantes envolvidos nas vias de exaustão celular nas células T e APCs estão demonstrados na figura 3.

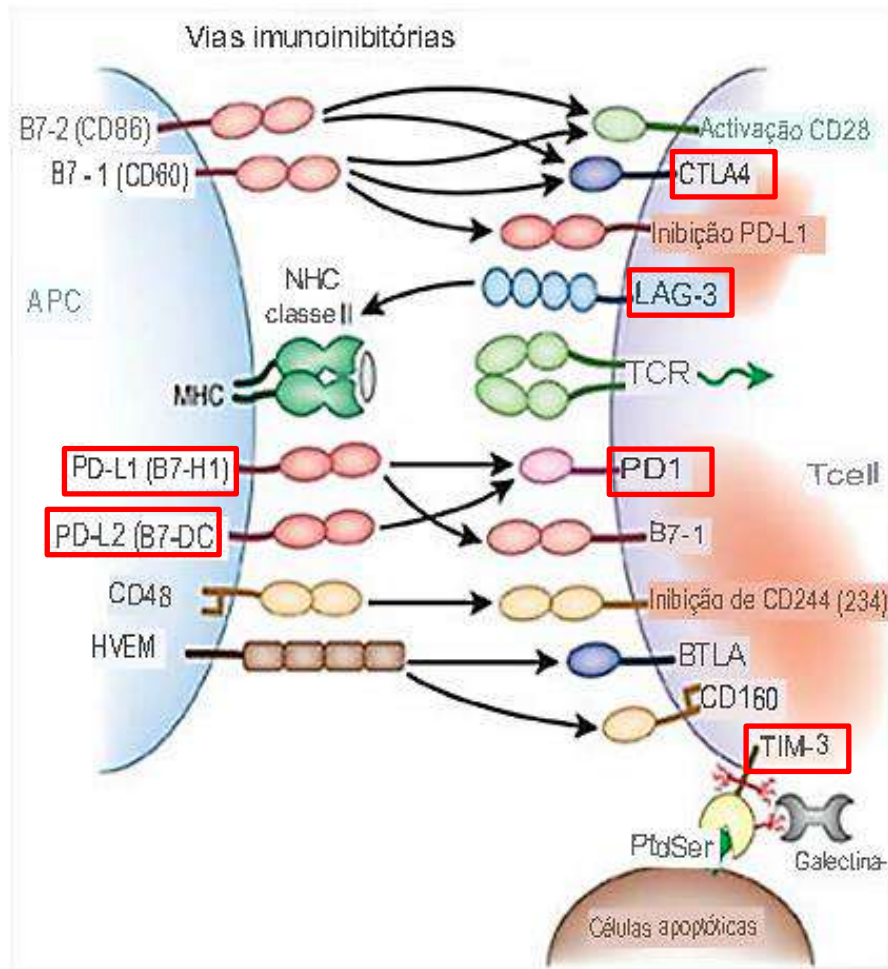


Figura 3 Fonte: Adaptado de Gordon & Sharpe, 2012.

Receptores inibitórios, que podem ser expressos por células T (BLACKBURN *et al.*, 2009). Foi possível, pelo nosso grupo, demonstrar a expressão de PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, PD-L1 e PD-L2, em esplenócitos caninos (de Souza *et al.*, 2019).

2. Objetivos

Verificar a presença de macrófagos exaustos e macrófagos M2 no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum* correlacionando os achados com a

organização da polpa branca esplênica, carga parasitária e os sinais clínicos.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar clinicamente os animais naturalmente infectados;
- Analisar as alterações histopatológicas do baço de cães naturalmente infectados, levando em consideração a organização do tecido linfóide esplênico na polpa branca;
- Verificar por citometria de fluxo o perfil de macrófagos M2 e/ou exaustos em células isoladas do baço de cães naturalmente infectados;
- Verificar a localização e quantificar as amastigotas no baço de cães infectados;
- Correlacionar os dados obtidos com sinais clínicos, carga parasitária e desorganização da polpa branca esplênica.

3. Materiais e métodos

3.1 Animais

Cães (n=31) provenientes do Rio de Janeiro, com LV e encaminhados para a eutanásia compulsória 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 10mL de iodeto de potássio 19,1% (Isofarma) intravenoso. O material foi obtido durante a necrópsia dos animais, momento em que foram coletadas as amostras do baço e sangue periférico, assim como os dados clínicos. Foram considerados 6 sinais clínicos da LVC: dermatite, onicogribose, conjuntivite, perda de condição corporal, alopecia e linfadenopatia. Cada sinal foi avaliado em uma escala de 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado) a 3 (grave) pontos, segundo Quinnell *et al.* (2001). A classificação final se deu pela soma dos pontos obtidos, podendo o animal ter baixo (0 a 2), médio (3 a 6) e alto escore clínico (7 a 18).

3.2 Aspectos éticos

As amostras de baço 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 LV e encaminhados para a eutanásia compulsória. As amostras foram doadas após as necropsias, não necessitando de licença ética para esta etapa segundo orientação do Comitê de Ética em Uso de Animais da Fiocruz e de acordo com a lei brasileira 11794/08. O acesso ao patrimônio genético está cadastrado no SISGEN pelo número AFB4BD9, projeto “Estudo imunopatológico do baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*”. Haverá correlação entre a exaustão celular, o remodelamento da matriz extracelular esplênica e a falha no controle da carga parasitária?”.

3.3 Preparo de Soluções

Diferentes soluções foram utilizadas nos processos de isolamento de células do sangue periférico e baço, assim como nas técnicas de citometria de fluxo e imunofluorescência. As soluções que foram mais frequentemente preparadas são as seguintes: tampão de anexina: 10 mM de HEPES, 140 mM de NaCl e 2,5 mM de CaCl₂, em pH 7.4; tampão de lavagem: PBS1x contendo 0,1% de BSA e 0,05% de azida sódica; tampão de permeabilização: PBS/BSA, contendo 0,5% de saponina; tampão de PBS: Adicionadas 1 pastilha a cada 100 mL de água miliQ.

3.4 Análise do baço

Cortes de 5 µm de espessura, de tecido do baço, foram fixados em solução tamponada de formol e introduzidos em parafina. Foram analisadas algumas alterações teciduais, como o nível de inflamação do baço (ausente, pouca, média e intensa). Foi feita a análise do grau de organização da polpa branca esplênica. As regiões histológicas que abrangem a organização da polpa branca, são chamadas de bainha linfática periarteriolar, arteríola central, folículos linfóides, centro germinativo, zona do manto e zona marginal. As perdas de definições de certos pontos da polpa branca, assim como algum grau de hiperplasia ou hipoplasia

caracterizaram a polpa branca como pouco desorganizada. A desorganização moderada foi caracterizada quando a polpa branca ainda se mostrava perceptível, porém com áreas minimamente individualizadas ou indefiníveis. Alta desorganização se apresentava a partir da estrutura folicular com pouca distinção da polpa vermelha e da região de células T.

3.5 Isolamento de PBMC – Células mononucleares do sangue periférico

As PBMCs foram isoladas a partir do sangue periférico utilizando-se um gradiente Histopaque (Sigma). Em seguida foram feitas duas lavagens em meio RPMI suplementado com hepes e glutamina (Gibco). Ao final, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas com 1mL de meio RPMI, para contagem celular em câmara de Neubauer e usando corante de exclusão azul de Trypan (Sigma). Por fim, o congelamento foi feito com 5×10^6 a 1×10^7 células por criotubo, adicionado o meio de congelamento contendo soro fetal bovino 90% e DMSO 10%.

3.6 Isolamento de esplenócitos

Fragmentos de baço foram macerados utilizando-se uma tela de malha fina estéril, meio RPMI suplementado e placa de petri. Após decantação das células a 4°C , o sobrenadante foi descartado e as células foram submetidas a 2 lavagens com meio RPMI suplementado. Ao final, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas com 2-5mL de meio RPMI, para contagem celular em câmara de Neubauer e usando corante de exclusão azul de Trypan (Sigma). Por fim, o congelamento foi feito com 5×10^6 a 1×10^7 células por criotubo, adicionado o meio de congelamento contendo soro fetal bovino 90% e DMSO 10%.

3.7 Congelamento

As células separadas e acondicionadas em criotubos contendo o meio de congelamento foram mantidas por 1 hora a -20°C , depois eram mantidas overnight a -60°C e então eram transferidas para o container de nitrogênio líquido a -196°C .

3.8 Descongelamento

Os criotubos retirados do container de nitrogênio líquido foram deixados por 1 minuto no gelo comum, em seguida foram transferidos para o banho-maria a 37°C até o descongelamento total. As células foram transferidas para um tubo de 15 ml graduado e, em seguida, o meio de descongelamento (RPMI contendo 20%SFB) aquecido à 37°C foi adicionado lentamente às células como descrito a seguir: 1ml por 1 minuto, mais 1 ml por 1 minuto, 2 ml por 1 minuto e 4 ml por um minuto. Foram feitas três lavagens em RPMI a 1800 rpm, por 10 minutos e a 7°C.

3.9 Citometria de fluxo

A suspensão de células foi ajustada para 1×10^7 células/mL e submetida ao bloqueio de receptores Fc com meio RPMI contendo soro de cavalo ou carneiro 10% e SFB 10% em gelo por 30 minutos. Após centrifugação a 1800rpm, por 10min, a 7°C, a concentração de células foi ajustada para 1×10^7 células/ mL através da contagem em câmara de Neubauer com azul de Trypan. Apenas as amostras com recuperação de células viáveis acima de 60% foram submetidas ao protocolo de marcação. Como marcador de viabilidade para a citometria de fluxo foi utilizado o corante Zombie Aqua (Invitrogen). As células (1×10^6 células por tubo) foram lavadas com 200 mL de PBS e incubadas com 100 µL de Zombie, por 20 minutos, em temperatura ambiente. Após uma lavagem com PBS, foi realizada a marcação de superfície. O anticorpo primário anti-PD-L1 (Biolegend, EUA) foi incubado por 20 minutos a 4°C. Após a lavagem com PBS/BSA (PBS contendo 0,1% de BSA, 0,05% de azida sódica), o anticorpo secundário anti-camundongo PE (Invitrogen) foi adicionado e incubado por 20 minutos a 4°C. Após nova lavagem com PBS/BSA, o anticorpo anti-CD14-APC (BD Biosciences, EUA) foi adicionado e incubado por 20 minutos a 4°C. Após lavagem com PBS/BSA, as células foram fixadas/permeabilizadas com a adição de Cytofix/Cytoperm (BD), lavadas com tampão de permeabilização PBS/BSA/SAP (tampão PBS/BSA contendo 0,5% saponina). As células foram ressuspensas em 30 µL de PBS/BSA/SAP e foi adicionado o anticorpo anti-arginase 1-PE-Cyanine 7 (Invitrogen). Após a incubação

de 30 minutos a 4°C, as amostras foram lavadas em PBS/BSA e ressuspensas em PBS para posterior aquisição no citômetro de fluxo.

A citometria de fluxo foi realizada utilizando o citômetro de fluxo CytoFLEX de 12 cores equipado com 4 lasers de 405nm, 488nm, 565nm e 638nm (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) da plataforma multiusuário de Citometria de Fluxo do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. O protocolo de aquisição foi realizado utilizando o programa CytExpert (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Os fluorocromos PE, PECy7 (ambos laser 565nm) e APC (laser 635nm) foram avaliados nos filtros 585/42, 780/60 e 660/10, respectivamente. O Zombie foi avaliado no filtro 525/40 do laser 405nm.

As análises foram realizadas através do software FlowJo 7.8.1 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Para a estratégia de *gates* foi feito, primeiramente, um dot plot de tamanho (FSC) vs. granularidade (SSC) para identificação do *gate* de células. A partir deste *gate*, foi feita a exclusão de *doublets* pelo *dot plot* de tamanho área (FSC-A) vs. tamanho altura (FSC-H). Dentro do *gate* de *singlets*, foi avaliada a viabilidade celular a partir do histograma da marcação com Zombie. Apenas as amostras com viabilidade superior a 50% foram consideradas. A partir das células viáveis (células Zombie negativas, *gate* vivas) foi verificado o percentual de marcação para CD14, arginase e PD-L1. Os perfis de marcação simples, dupla ou tripla para CD14, arginase e/ou PD-L1 foram gerados utilizando a ferramenta de *combination gate* do FlowJo.

3.10 Imunofluorescência

Cortes de baço com 5 µm de espessura foram colocados em lâminas silanizadas (Dako, Carpinteria, CA, EUA) e fixados com acetona P.A. (Merck) por 10 minutos. Para a inibição de ligações não específicas, foi feito um bloqueio em solução contendo 0,4% de BSA por 20 minutos à temperatura ambiente. O excesso da solução de bloqueio foi descartado e os anticorpos primários foram adicionados para a detecção da enzima arginase-1 (Cell Signaling Technology, EUA) e amastigotas de *L. infantum*. Estes foram revelados por anticorpos secundários anti-rato IgG conjugado com Dylight 633 e anti-coelho IgG conjugado com Alexa 488. A incubação com os anticorpos secundários foi realizada em câmara escura por 30 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram montadas usando o

Fluoromount-g contendo DAPI (4', 6-diamino-2-fenilindole) (Termo Fisher Scientific) e a reação foi observada sob um microscópio de fluorescência. As imagens foram processadas e sobrepostas com o *software* ImageJ (NIH, EUA). Brilho e contraste foram ajustados em Programa Photoshop.

3.11 Análise estatística

Foram usados os testes não paramétricos Mann-Whitney e Kruskal-Wallis para amostras independentes e teste de correlação de postos de Spearman utilizando o GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. Resultados

4.1 Detecção de células PD-L1⁺ e arginase-1⁺ em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*

Através da técnica de citometria de fluxo, foi possível avaliar células Arginase-1⁺, PD-L1⁺ e CD14⁺ (Tabela 1 e Figura 4). Células Arginase-1^{high+} foram detectadas, tendo sido a maioria células CD14⁻. Quando consideramos a sintomatologia e a organização da polpa branca esplênica, observamos algumas diferenças estatísticas. O percentual de células arginase-1⁺CD14⁺ diminuía de acordo com a piora do quadro clínico (Figura 5). Houve aumento do percentual de células PD-L1 e células Arginase-1⁺CD14⁻PD-L1⁺ nos animais que apresentavam moderada a intensa desorganização da polpa branca esplênica (Figura 6). Houve correlação entre percentual de células Arginase-1⁻CD14⁺PD-L1⁺ e Arginase-1⁺CD14⁻PD-L1⁻ (Figura 7). Não houve diferenças em relação à carga parasitária.

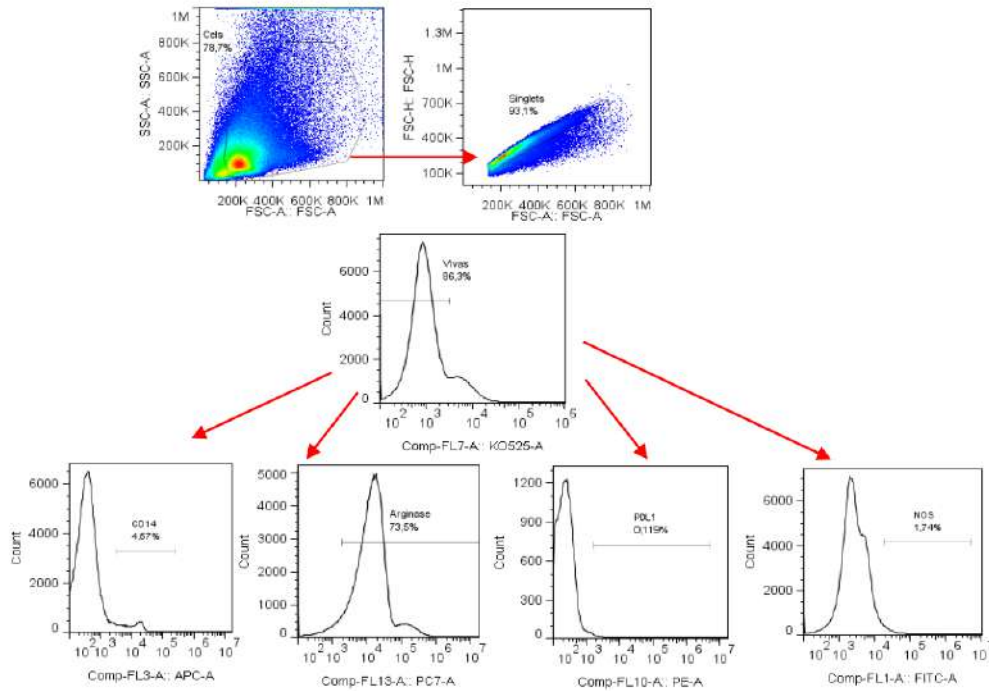


Figura 4. Figura representativa do *gate* de células e das quantificações obtidas por citometria de fluxo. Os perfis de marcações foram avaliados dentro da população de células vivas (Zombie⁻).

Tabela 1: Dados obtidos pela análise dos marcadores usados nos experimentos de citometria de fluxo. Dados representados como mediana (valores mínimo-máximo).

Marcador (%)	Baixo escore clínico	Médio escore clínico	Alto escore clínico
Arginase	73,60 (69,10 – 79,40)	72,9 (65,5 – 77,2)	70,10 (67,0 – 78,5)
Arginase high	7,02 (1,94 – 11,40)	4,16 (0,68 – 8,24)	7,22 (0,06 – 10,10)
CD14	2,38 (0,67 – 4,76)	1,11 (0,28 – 3,99)	0,48 (0,12 – 3,75)
PD-L1	0,4 (0,12 – 0,75)	0,14 (0,05 – 0,81)	0,34 (0,19 – 0,56)
Arginase ⁺ CD14 ⁺ PDL1 ⁺	0,023 (0,008 – 0,081)	0,02 (0,005 – 0,034)	0,011 (0,004 – 0,023)
Arginase ⁺ CD14 ⁺ PDL1 ⁻ *	1,90 (0,44 – 3,98)	1,09 (0,33 – 2,13)	0,31 (0,09 – 2,54)
Arginase ⁺ CD14 ⁻ PDL1 ⁺	0,36 (0,056 – 2,5)	0,09 (0,024 – 1,9)	0,38 (0,19 – 2,94)
Marcador (%)	Carga parasitária baixa		Carga parasitária alta
Arginase	73,55 (67,0 – 79,40)		72,50 (65,5 – 77,2)

Arginase high	4,4 (0,06 – 11,4)	4,94 (0,85 – 8,0)
CD14	1,5 (0,12 – 4,8)	0,76 (0,4 – 2,9)
PD-L1	0,32 (0,05 – 1,3)	0,16 (0,13 – 0,47)
Arginase ⁺ CD14 ⁺ PDL1 ⁺	0,018 (0,004 – 0,081)	0,02 (0,009 – 0,034)
Arginase ⁺ CD14 ⁺ PDL1 ⁻ *	1,08 (0,09 – 4,0)	0,77 (0,15 – 2,13)
Arginase ⁺ CD14 ⁻ PDL1 ⁺	0,37 (0,02 – 2,9)	0,11 (0,04 – 0,7)
Marcador (%)	Polpa branca esplênica organizada #	Polpa branca esplênica desorganizada #
Arginase	75,4 (69,1 – 78,5)	72,1 (65,5 – 79,4)
Arginase high	3,78 (0,26 – 8,24)	5,71 (0,06 – 11,4)
CD14	2,25 (0,67 – 3,99)	1,11 (0,12 – 4,76)
PD-L1	0,09 (0,05 – 0,53)	0,3 (0,11 – 1,27)
Arginase ⁺ CD14 ⁺ PDL1 ⁺	0,068 (0,005 – 0,82)	0,035 (0 – 0,56)
Arginase ⁺ CD14 ⁺ PDL1 ⁻ *	1,31 (0,44 – 2,54)	1,03 (0,09 – 3,98)
Arginase ⁺ CD14 ⁻ PDL1 ⁺	0,05 (0,024 – 0,36)	0,38 (0,04 – 2,94)

Polpa branca organizada: organizada à pouco desorganizada; Polpa branca desorganizada: média à intensa desorganização

*p < 0,05

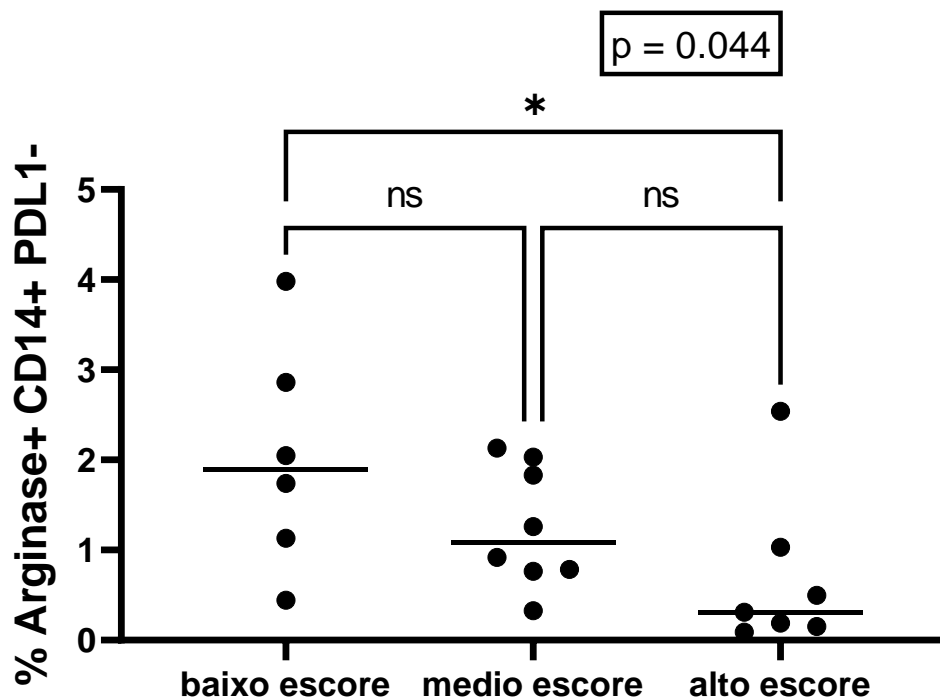


Figura 5. Percentual de células Arginase-1⁺CD14⁺PD-L1⁻ no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum* de acordo com o escore clínico. *Kruskal-Wallis test*.

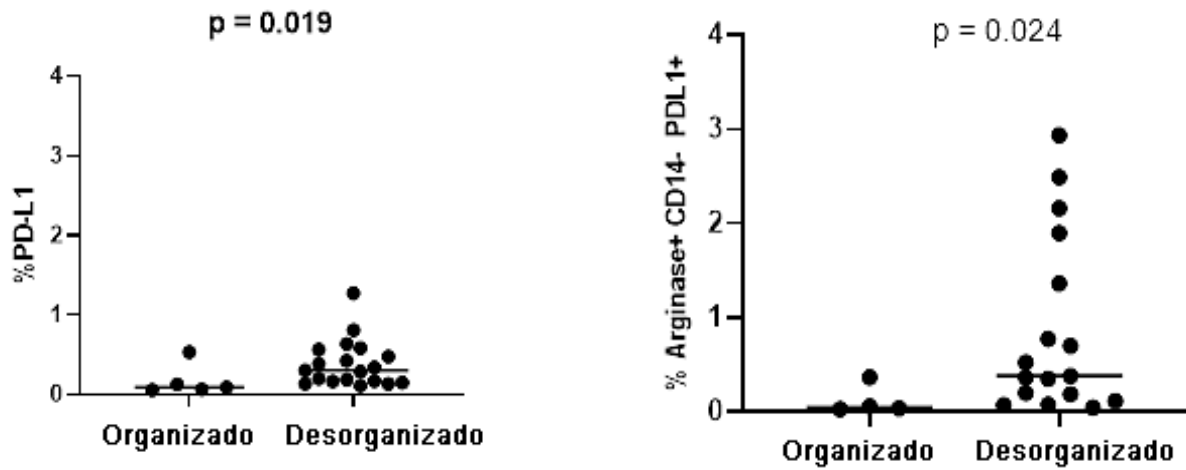


Figura 6. Percentual de células PD-L1⁺ e Arginase-1⁺CD14⁺PD-L1⁺ no baço de cães infectados naturalmente com *L. infantum* de acordo com a organização da polpa branca esplênica. *Mann-Whitney test*. # Polpa branca organizada: organizada à pouco desorganizada; Polpa branca desorganizada: média à intensa desorganização.

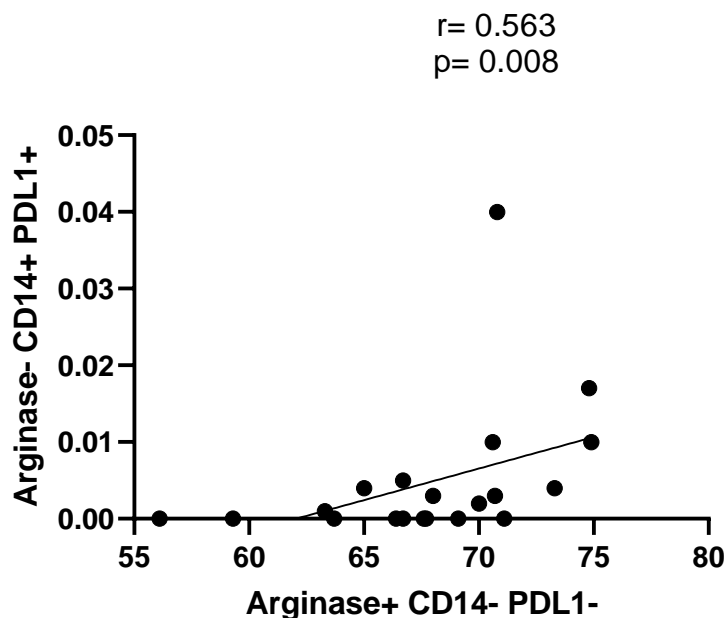


Figura 7. Correlação entre percentual de células Arginase-1⁻CD14⁺PDL-1⁺ e Arginase-1⁺CD14⁻PDL-1⁻ no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Correlação de postos de Spearman.

4.2 Detecção de amastigotas em células arginase-1⁺

Através da técnica de imunofluorescência foi possível avaliar simultaneamente *in situ* a presença de células arginase-1⁺ (vermelho) e amastigotas (verde) de *L. infantum* (Figura 8). Foram detectadas amastigotas íntegras no interior de células arginase-1⁺ e também em células arginase-1⁻. Como as células arginase-1 produzem poliaminas que favorecem o crescimento de amastigotas, e ao mesmo tempo competem com a NOS2 pela arginina, reduzindo a capacidade de produção de NO, estas células arginase-1⁺ poderiam funcionar como nichos seguros para a replicação e persistência parasitária.

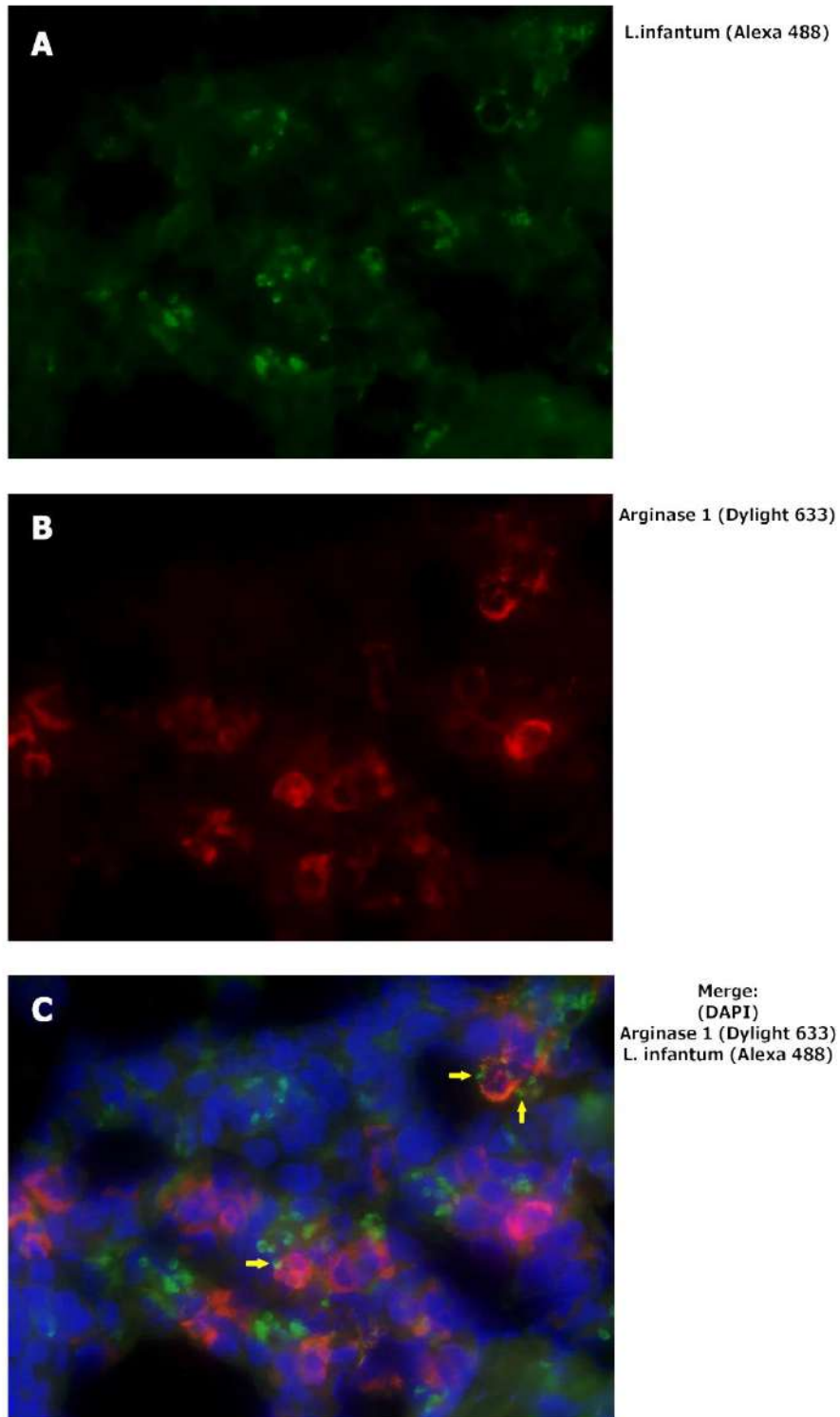


Figura 8: Identificação por imunofluorescência da presença de formas amastigotas de *L. infantum* (A), arginase-1 (B) e imagens sobrepostas (C) no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Barra de ampliação 10 μ m. Brilho e contraste foram ajustados no programa Photoshop.

5 Discussão

No presente estudo, células do baço de cães naturalmente infectados foram analisadas *ex vivo* por citometria de fluxo para a identificação e quantificação de células CD14, arginase-1 e PD-L1⁺. Além disso, através da técnica de imunofluorescência, realizamos um estudo de colocalização *in situ* de amastigotas e células arginase-1⁺. Apesar de termos observado diversas amastigotas no interior de células arginase-1⁺, não houve uma correlação entre a carga parasitária e a expressão desta enzima. A ausência de associação entre estes dois parâmetros, pode ocorrer pelo fato de outras células arginase-1⁻ também favorecerem a replicação dos parasitos. Neste estudo, observamos diversas células arginase-1⁻ albergando parasitos o que corrobora esta hipótese. Neste sentido, seria interessante avaliar se estas células também falham em expressar NOS2, e se, neste caso, poderiam ser células com perfil de exaustão que perderam a sua capacidade funcional. Infelizmente, o modelo atual não permitiu fazer esta análise devido à carência de insumos para o estudo de células caninas. No entanto, nosso grupo vem observando uma redução também da quantidade de macrófagos M1 (NOS2⁺) nos cães em fase mais avançada de infecção que apresentam polpa branca esplênica desorganizada e alta carga parasitária (dados não mostrados).

Ainda nesta linha de raciocínio, observamos uma redução no percentual de macrófagos M2 (arginase-1⁺CD14⁺PD-L1⁻) nos animais com escore clínico alto, sugerindo que a redução neste perfil celular contribua para a piora do quadro clínico. A associação entre a piora do quadro clínico e a desorganização da polpa branca esplênica já foi demonstrada em trabalhos prévios do grupo (CAVALCANTI *et al.*, 2015; De Souza *et al.*, 2019). No presente trabalho, evidenciamos uma relação entre a desorganização da polpa branca esplênica e o aumento tanto da expressão percentual de PD-L1 geral, quanto do percentual de células arginase-1⁺. Este dado sugere um envolvimento destes dois mecanismos de regulação (Arginase e PD-L1) no desenvolvimento do dano tecidual. A correlação entre macrófagos exaustos (Arginase-1⁻CD14⁺PD-L1⁺) e células Arginase-1⁺CD14⁻PD-L1⁻ corrobora esta hipótese, além de sugerir que as duas vias estão interligadas. A associação entre a exaustão celular e o perfil M2 já foi descrita na infecção experimental em modelo murino de leishmaniose e também em outros modelos (LAI *et al.*, 2018; PESSENDA & SILVA 2020). Em estudo *in vitro* não infeccioso, foi demonstrado que em meio

ambiente enriquecido com VEGF, a expressão de PD-L1 era estimulada, e o bloqueio da via de exaustão diminuía a diferenciação dos macrófagos no perfil M2 (LAI *et al.*, 2018).

Um dado interessante obtido neste estudo foi a evidência de células arginase-1^{high}, em sua maioria CD14⁻. O fato de serem CD14⁻ não exclui a possibilidade de serem macrófagos em estágios mais avançados de diferenciação, e por isso, outros marcadores de macrófagos devem ser e serão avaliados pelo grupo. Também se faz necessário incluir na análise a possibilidade de investigação de outros tipos celulares, já que leucócitos diversos podem expressar a enzima arginase.

6 Conclusões

Amastigotas replicam em células com expressão positiva e negativa da enzima arginase, mostrando que ambas podem favorecer a sobrevivência do parasito no meio intracelular. E estas células arginase-1⁻ podem ser macrófagos exaustos que perderam a sua capacidade funcional.

A redução de células M2 (CD14⁺arginase⁺) e o aumento do perfil de exaustão (PD-L1⁺) contribuem para a patogenia e progressão da Leishmaniose Visceral Canina, pois ambas estão associadas à piora do quadro clínico e ao dano tecidual.

As vias de regulação por exaustão e expressão de arginase mostraram uma associação no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum*.

Células arginase-1^{high} participam da resposta imune no baço de cães com leishmaniose visceral, e a identificação do perfil celular responsável por esta expressão segue sendo investigada.

7 Referências Bibliográficas

Abbehusen MMC, Almeida VDA, Solcà MDS, Pereira LDS, Costa DJ, Gil-Santana L, Bozza PT, Fraga DBM, Veras PST, Dos-Santos WLC, Andrade BB, Brodskyn CI. Clinical and immunopathological findings during long term follow-up in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. **Sci Rep.** 2017 Nov 21;7(1):15914. doi: 10.1038/s41598-017-15651-8. PMID: 29162847; PMCID: PMC5698407.

Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. **Adv Parasitol.** 2004;57:1-88. doi: 10.1016/S0065-308X(04)57001-X. PMID: 15504537.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One.** 2012;7:e35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671.

Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniasis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology.** 2008;24(7):324–330.

Barber DL, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. **Nature.** 2006;439:682–687. doi: 10.1038/nature04444.

Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, Betts MR, Freeman GJ, Vignali DA, Wherry EJ. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. **Nat Immunol.** 2009 Jan;10(1):29-37. doi: 10.1038/ni.1679. Epub 2008 Nov 30.

Carneiro MB, Vaz LG, Afonso LCC, Horta MF, Vieira LQ. Regulation of macrophage subsets and cytokine production in leishmaniasis. **Cytokine.**

Cavalcanti A.S., Ribeiro-Alves M., Pereira L.D.O.R., Mestre G.L., Ferreira A.B.R., Morgado F., Boité M.C., Cupolillo E., Moraes M.O., Porrozzi R. Parasite Load Induces Progressive Spleen Architecture Breakage and Impairs Cytokine mRNA Expression in *Leishmania infantum*-Naturally Infected Dogs. **PLoS ONE**. 2015;10:e0123009. doi: 10.1371/journal.pone.0123009.

Conceição-Silva F, Morgado FN. *Leishmania* Spp-Host Interaction: There Is Always an Onset, But Is There an End? **Front Cell Infect Microbiol** (2019) 9:330. doi: 10.3389/fcimb.2019.00330.

CFMV, 2018. **Conselho Federal de Medicina Veterinária**. Disponível em: <https://www.cfmv.gov.br/medicamento-para-tratamento-de-lvc-deve-ser-emitido-somente-via-sipeagro/comunicacao/noticias/2019/02/12/>. Acesso em: 08 de maio de 2023.

Costa FAL, Goto H, Saldanha LCB, et al. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Pathology**. 2003;40(6):677–684.

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

De Melo C.V.B., Hermida M.D.-R., Mesquita B.R., Fontes J.L.M., Koning J.J., Solcà M.D.S., Benevides B.B., Mota G.B.S., Freitas L.A.R., Mebius R.E., et al. Phenotypical Characterization of Spleen Remodeling in Murine Experimental Visceral Leishmaniasis. **Front. Immunol**. 2020;11:653. doi: 10.3389/fimmu.2020.00653.

de Souza TL, da Silva AVA, Pereira LOR, Figueiredo FB, Mendes Junior AAV, Menezes RC, Mendes-da-Cruz DA, Boité MC, Cupolillo E, Porrozzi R, Morgado FN. Pro-Cellular Exhaustion Markers are Associated with Splenic Microarchitecture Disorganization and Parasite Load in Dogs with Visceral

Leishmaniasis. **Sci Rep**. 2019 Sep 10;9(1):12962. doi: 10.1038/s41598-019-49344-1. PMID: 31506501; PMCID: PMC6736856.

Eichbaum Q. PD-1 signaling in HIV and chronic viral infection--potential for therapeutic intervention? **Curr Med Chem**. 2011;18(26):3971-80. doi: 10.2174/092986711796957239.

Freeman, G., Sharpe, A. A new therapeutic strategy for malaria: targeting T cell exhaustion. **Nat Immunol** 13, 113–115 (2012). <https://doi.org/10.1038/ni.2211>

Gautam S, Kumar R, Singh N, Singh AK, Rai M, Sacks D, et al.. CD8 T Cell Exhaustion in Human Visceral Leishmaniasis. **J Infect Dis** (2014) 209:290–9. doi: 10.1093/infdis/jit401.

Gordon S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**. 2003 Jan;3(1):23-35. doi: 10.1038/nri978.

Handman E, Bullen DV. Interaction of Leishmania with the host macrophage. **Trends Parasitol**. 2002 Aug;18(8):332-4. doi: 10.1016/s1471-4922(02)02352-8.

Hermida MD, de Melo CVB, Lima IDS, Oliveira GGS, Dos-Santos WLC. Histological Disorganization of Spleen Compartments and Severe Visceral Leishmaniasis. **Front Cell Infect Microbiol**. 2018 Nov 13;8:394. doi: 10.3389/fcimb.2018.00394. PMID: 30483481; PMCID: PMC6243053.

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. doi: 10.1371/journal.ppat.1000431. Epub 2009 May 15. PMID: 19436710; PMCID: PMC2674929.

Kemp M: Regulator and effector functions of T-cell subsets in human Leishmania infections. **APMIS Suppl** 68:1–33, 1997.

KILLICK-KENDRICK, R.; LAINSON, R.; RIOUX, J. A.; SAF-JANOVA, V. M. The taxonomy of Leishmania-like parasites of reptiles. *In: Leishmania. Taxonomie et phylogenese. Applications eco-epidemiologique.* 1986 IMEEE, Montpellier, . p. 143–148.

Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A, Plevraki KG. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **J Am Anim Hosp Assoc.** 1999 Sep-Oct;35(5):376-83. doi: 10.5326/15473317-35-5-376.

Lai Y, Wahyuningtyas R, Aui S, Chang K. Autocrine VEGF signalling on M2 macrophages regulates PD-L1 expression for immunomodulation of T cells. **J Cell Mol Med.** 2019;23:1257–1267.

Lampiasi N, Russo R, Zito F. The Alternative Faces of Macrophage Generate Osteoclasts. **Biomed Res Int.** 2016;2016:9089610. doi: 10.1155/2016/9089610. Epub 2016 Feb 8. PMID: 26977415; PMCID: PMC4761668.

Lima IS, Silva JS, Almeida VA, Junior FG, Souza PA, Larangeira DF, Moura-Neto JP, Fraga DB, de Freitas LA, dos-Santos WL. 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. doi: 10.1371/journal.pone.0087742. PMID: 24498367; PMCID: PMC3911999.

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.

Maia C, Campino L. Cytokine and Phenotypic Cell Profiles of *Leishmania infantum* Infection in the Dog. **J Trop Med.** 2012;2012:541571. doi: 10.1155/2012/541571. Epub 2011 Aug 9. PMID: 21845197;

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral. 2014. 1ª edição. 5ª reimpressão – Brasília.

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. PMID: 9780188.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. **Lancet.** 2005 Oct 29-Nov 4;366(9496):1561-77. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67629-5. PMID: 16257344.

Nascimento MS, Albuquerque TD, Do-Valle-Matta MA, Caldas IS, Diniz LF, Talvani A, Bahia MT, Andrade CM, Galvão LM, Câmara AC, Guedes PM. 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. doi: 10.1016/j.vetimm.2013.02.015. Epub 2013 Mar 5. PMID: 23545087.

Olobo-Okao J, Sagaki P. Leishmaniasis in Uganda: historical account and a review of the literature. **Pan Afr Med J.** 2014 May 4;18:16. doi: 10.11604/pamj.2014.18.16.1661. PMID: 25360200; PMCID:PMC4213517.

Ordeix L, Solano-Gallego L, Fondevila D, Ferrer L, Fondati A. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. **Vet Dermatol.** 2005 Jun;16(3):187-91. doi: 10.1111/j.1365-3164.2005.00454.x. PMID: 15960633.

Organização Mundial da Saúde. Magnitude do problema, 2012. Disponível em:

http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html . Acesso em 7 de junho de 2022.

Organización Panamericana de la Salud. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. Washington, D.C.: OPS; 2019.

Patel U, Rajasingh S, Samanta S, Cao T, Dawn B, Rajasingh J. Macrophage polarization in response to epigenetic modifiers during infection and inflammation. **Drug Discov Today.** 2017 Jan;22(1):186-193.doi:10.1016/j.drudis.2016.08.006. Epub 2016 Aug 21.

Pessenda G, Silva JS. Arginase and its mechanisms in *Leishmania* persistence. **Parasite Immunology.** 2020;42:e12722. <https://doi.org/10.1111/pim.12722>.

Peters, W. and Killick-Kendrick, R. (1987a). *The Leishmaniases in Biology and Medicine. Vol. I: Biology and Epidemiology*, pp. 1-550. London:Academic Press.

Rallis T, Day MJ, Saridomichelakis MN, Adamama-Moraitou KK, Papazoglou L, Fytianou A, Koutinas AF. Chronic hepatitis associated with canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. **J Comp Pathol.** 2005 Feb-Apr;132(2-3):145-52. doi: 10.1016/j.jcpa.2004.09.004. PMID: 15737341.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, Tafuri WL, Corrêa-Oliveira R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol.** 2009 Mar 15;128(1-3):87-95. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.10.307. Epub 2008 Oct 17. PMID: 19054576.

Ribeiro RR, Michalick MSM, da Silva ME, Dos Santos CCP, Frézard FJG, da Silva SM. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status

And Strategies for Control. **Biomed Res Int.** 2018;2018:3296893. Published
2018 Mar 29. doi:10.1155/2018/3296893.

Rodríguez-Cortés A, Carrillo E, Martorell S, Todolí F, Ojeda A, Martínez-Flórez A, Urniza A, Moreno J, Alberola J. Compartmentalized Immune Response in Leishmaniasis: Changing Patterns throughout the Disease. **PLoS One.** 2016 May 12;11(5):e0155224. doi: 10.1371/journal.pone.0155224. PMID: 27171409; PMCID: PMC4865036.

Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu Rev Microbiol.** 2001;55:453-83. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.453.

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. doi: 10.1111/j.1365-3024.2008.01051.x. Epub 2007 Jun 28. PMID: 18665902; PMCID: PMC2592477.

Saqib U, Sarkar S, Suk K, Mohammad O, Baig MS, Savai R. Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation. **Oncotarget.** 2018 Apr 3;9(25):17937-17950. doi: 10.18632/oncotarget.24788.

Scorza BM, Mahachi KG, Cox AC, Toepp AJ, Leal-Lima A, Kumar Kushwaha A, Kelly P, Meneses C, Wilson G, Gibson-Corley KN, Bartholomay L, Kamhawi S, Petersen CA. Leishmania infantum xenodiagnosis from vertically infected dogs reveals significant skin tropism. **PLoS Negl Trop Dis.** 2021 Oct 6;15(10):e0009366. doi: 10.1371/journal.pntd.0009366.

Semião-Santos SJ, el Harith A, Ferreira E, Pires CA, Sousa C, Gusmão R. Evora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. **Parasitol Res.** 1995;81(3):235-9. doi: 10.1007/BF00937115. PMID: 7770430.

Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili

SA, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT, Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **J Cell Physiol**. 2018 Sep;233(9):6425-6440. doi: 10.1002/jcp.26429. Epub 2018 Mar 1. PMID: 29319160.

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. doi: 10.1111/iep.12010. Epub 2013 Feb 19. PMID: 23419132; PMCID: PMC3607142.

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.

Slappendel RJ. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. **Vet Q**. 1988 Jan;10(1):1-16. doi: 10.1080/01652176.1988.9694140. PMID: 3287754.

Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol**. 2009 Oct 28;165(1-2):1-18. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.022. Epub 2009 Jun 6. PMID: 19559536.

Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G, The LeishVet Group. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasit Vectors**. 2011 May 20;4:86. doi: 10.1186/1756-3305-4-86. PMID: 21599936; PMCID: PMC3125381.

Steverding D. The history of leishmaniasis. **Parasit Vectors**. 2017 Feb 15;10(1):82. doi: 10.1186/s13071-017-2028-5. PMID: 28202044; PMCID: PMC5312593.

Toepp AJ, Petersen CA. The Balancing Act: Immunology of Leishmaniosis. **Res Vet Sci** (2020) 130:19–25. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.02.004.

Wherry EJ. T cell exhaustion. **Nat Immunol**. 2011 Jun;12(6):492-9. doi: 10.1038/ni.2035. PMID: 21739672.