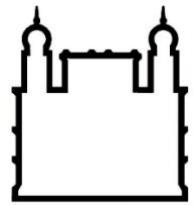




UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ



Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental

**LXPLEEN: ESTUDO DOS GENES E CÉLULAS ENVOLVIDAS COM A
DESORGANIZAÇÃO ESPLÉNICA NA LEISHMANIOSE VISCERAL
RECIDIVANTE**

JONATHAN LUÍS MAGALHÃES FONTES

Salvador - BA

2024
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental

**LXPLEEN: ESTUDO DOS GENES E CÉLULAS ENVOLVIDAS COM A
DESORGANIZAÇÃO ESPLÊNICA NA LEISHMANIOSE VISCERAL
RECIDIVANTE**

JONATHAN LUÍS MAGALHÃES FONTES

Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em
Patologia Humana e Experimental para obtenção do
título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Washington Luis Conrado dos
Santos

Salvador - BA

2024

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

F683I Fontes, Jonathan Luís Magalhães

LXPLEEN: estudo dos genes e células envolvidas com a
desorganização esplênica na leishmaniose visceral recidivante. /
Jonathan Luís Magalhães Fontes. _ Salvador, 2024.

73 f.: il.: 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Washington Luis Conrado dos Santos

Tese (Doutorado em Patologia Humana e Experimental) –
Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Instituto
Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2024.

1. Leishmaniose visceral recidivante. 2. População leucocitária. 3.
Baço. 4. Via de sinalização IL6. I. Título.

CDU 616.993.161

"LXPLEEN: ESTUDO DOS GENES E CÉLULAS ENVOLVIDAS COM A DESORGANIZAÇÃO
ESPLÉNICA NA LEISHMANIOSE VISCERAL RECIDIVANTE".

Jonathan Luis Magalhães Fontes

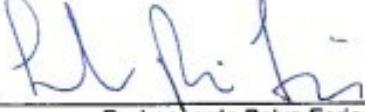
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 10 de julho de 2024.

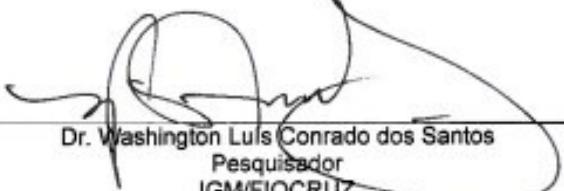
COMISSÃO EXAMINADORA


Dra. Iguaracyra Barreto de Oliveira Araújo
Professora
UFBA


Dra. Juliana Perrone Bezerra de Menezes Fullam
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ


Dr. Leonardo Paiva Farias
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ


Dra. Karine Araújo Damasceno
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ


Dr. Washington Luis Conrado dos Santos
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

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

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus companheiros e amigos do laboratório, em especial a Bia, Regis e Erina, e a todos do grupo WLCS e LAPEM, por todo suporte, carinho e apoio na realização desse trabalho e fora dele.

Também gostaria de agradecer ao meu orientador, Dr. Washington, pelos quase 9 anos de ensinamentos e formação acadêmica, mas também pelos bons momentos para além do laboratório.

Agradeço também a minha família e meus amigos, em especial Urandi, Irlete, Ivan e Euler, que sempre estiveram ao meu lado e vibrando por cada conquista e etapa vencida.

Um agradecimento aos colaboradores diretos, Dra. Carla Pagliari, Dr. Ricardo Khouri, Dra. Cláudia Borges, Dra. Iguaçacyra, Dr. Freitas, Dr. Carlos Henrique e a todas as outras pessoas que indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho.

Agradeço ao apoio de Patrícia Luz e Bruno Valença, nas atividades administrativas e burocráticas que envolvem a pesquisa.

Aos serviços de histotecnologia e ao Instituto Gonçalo Moniz, pela infraestrutura e apoio na produção do material do estudo.

À biblioteca pelas correções e suporte.

Aos pacientes, que em um gesto de altruísmo, aceitaram participar do estudo e colaborar para o entendimento da ciência.

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

Ao Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina – UFBA.

E por fim, a mim mesmo, por ter aceitado entrar nesse desafio e buscar sempre fazer o melhor, mesmo que às vezes parecesse impossível.

Muito obrigado!

FONTES, Jonathan Luís Magalhães. **LXPLEEN**: estudo dos genes e células envolvidas com a desorganização esplênica na leishmaniose visceral recidivante. 2024. 73f. Tese (Doutorado em Patologia Humana e Experimental) – Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2024.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose negligenciada e que tem impactos consideráveis na saúde pública. Um dos problemas relacionados à LV é o surgimento de formas graves que leva ao óbito de 6-8% dos pacientes mesmo na vigência de tratamento. Além disso, alguns pacientes desenvolvem uma forma recidivante, com a ocorrência de múltiplos retornos ao hospital em curto período. O baço, um órgão linfoide responsável pela hemocaterese e vigilância imunológica, é afetado na LV apresentando desorganização da polpa branca (PB) e extensa substituição da celularidade normal da polpa vermelha (PV) por plasmócitos. Apesar disso, pouco se sabe a respeito da contribuição da desestruturação esplênica na LV humana e como e as mudanças na celularidade esplênica mudam o perfil de produção de citocinas no órgão favorecendo a susceptibilidade à infecção. **OBJETIVO:** Nosso objetivo é definir quais as células e vias de sinalização estão envolvidas na desestruturação dos

compartimentos esplênicos e qual a provável associação com a progressão na LV recidivante. **MATERIAL E MÉTODOS:** Utilizando baços de 6 pacientes com LV recidivante e 5 pacientes controle, realizamos imuno-histoquímica para avaliar a distribuição e a relação de leucócitos (Linfócitos T e Treg, Linfócitos B e Macrófagos) e citocinas (IL1B, IL4, IL6, IL10, IL17, IFN α , TNF α e TGF β) nos compartimentos de PB e PV do baço. Além disso, foi feita análise da expressão gênica e identificação de perfis de DEG e redes de interação gênica envolvidas com a LV recidivante. **RESULTADOS:** Há acúmulo de macrófagos e plasmócitos na PV de pacientes com LV, com redução de apoptose e da expressão de genes relacionados à migração de linfócitos; Há aumento da expressão de BCL10 e ICOSLG; A via de sinalização de IL6 está super-expressa nos pacientes com LV, e há aumento da quantidade de IL6 total e correlação negativa entre IL6 e porcentagem de PB esplênica; Há correlação negativa entre número de leucócitos circulantes e número de leucócitos esplênicos. **CONCLUSÕES:** Nos pacientes com LV recidivante ocorre acúmulo de células no baço mediado pela redução de apoptose e migração de células, corroborando para o hiperesplenismo. Além disso, a via de sinalização por IL6 contribui para a desorganização do baço.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral recidivante. População leucocitária. Baço. Via de sinalização IL6.

FONTES, Jonathan Luís Magalhães. **LXPLEEN**: study of genes and cells involved in splenic disorganization in relapsing visceral leishmaniasis. 2024. 73f. Tese (Doutorado em Patologia Humano e Experimental) – Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2024.

ABSTRACT

BACKGROUND: Visceral leishmaniasis (VL) is a neglected zoonosis that has considerable impacts on public health. One of the problems related to VL is the emergence of severe forms that lead to the death of 6-8% of patients, even during treatment. In addition, some patients develop a recurrent form, with the occurrence of multiple returns to the hospital in a brief period. The spleen is a lymphoid organ responsible for hemocateresis and immunological surveillance and it engages in pathogenesis of VL, presenting disorganization of the white pulp (WP) and extensive replacements of the normal cellularity of the red pulp (RP) by plasma cells. Despite this, little is known about the contribution of splenic disruption in human VL and how changes in splenic cellularity change the profile of cytokine production in the organ, favoring susceptibility to infection. **AIM:** Our objective is to define which cells and signaling pathways

participate in the disruption of splenic compartments and what is the association with progression in relapsed VL. **MATERIAL AND METHODS:** Using spleens from 6 patients with relapsed VL and 5 control patients, we performed immunohistochemistry to evaluate the distribution and relationship of leukocytes (T and Treg lymphocytes, B lymphocytes, macrophages and plasma cells) and cytokines (IL1B, IL4, IL6, IL10, IL17, IFN γ , TNF \square and TGF \square) in the WP and RP of the spleen. Furthermore, were performed the gene expression analysis and identification of DEG profiles and gene interaction networks involved with relapsing VL. **RESULTS:** There is an accumulation of macrophages and plasma cells in the RP of patients with VL, with reduced apoptosis and expression of genes related to lymphocyte migration; There is increased expression of BCL10 and ICOSLG; The IL6 signaling pathway is overexpressed in VL patients, and there is an increase in the amount of total IL6 and a negative correlation between IL6 and splenic WP percentage; There is negative correlation between the number of circulating leukocytes and the number of splenic leukocytes. **CONCLUSIONS:** In patients with recurrent VL, there is an accumulation of cells in the spleen mediated by reduced apoptosis and cell migration, corroborating to hypersplenism. Furthermore, the IL6 signaling pathway contributes to spleen disorganization.

Keywords: Visceral leishmaniasis relapse. Leukocyte population. Spleen. IL6 signaling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Imagem representativa da quantificação de células na Polpa vermelha	29
Figura 2	Análise histológica dos baços corados em HE	36
Figura 3	Gráfico da frequência de leucócitos na PV	37
Figura 4	Fotomicrografia leucócitos esplênicos marcados por IHQ	39
Figura 5	Gráficos da densidade de leucócitos no baço.	41
Figura 6	Razão entre marcação de CD20 e CD3 na polpa branca.	42
Figura 7	Fotomicrografias das marcações por IHQ para citocinas na PB	44
Figura 8	Fotomicrografias das marcações por IHQ para citocinas na PB	45
Figura 9	Fotomicrografias das marcações por IHQ para citocinas na PV	47
Figura 10	Fotomicrografias das marcações por IHQ para citocinas na PV	48
Figura 11	Gráficos representativos da densidade de citocinas no baço	50
Figura 12	Avaliação da quantidade absoluta de leucoócitos no baço	52
Figura 13	Avaliação da quantidade absoluta de células produtoras de citocinas no baço	53
Figura 14	Correlação da densidade de células, citocinas e parâmetros laboratoriais	54
Figura 15	Correlação da quantidade absoluta de células, citocinas e dos	55

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
APRIL	A proliferation-inducing ligand
BAFF	B cell activating factor
CCL	C-C Ligante
CCR	C-C Receptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
CG	Centro germinativo
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CXCL	C-X-C Ligante
CXCR	C-X-C Receptor
Foxp3	Forkhead box P3
HE	Hematoxilina e Eosina
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HRP	Horseradish Peroxidase
HTC	Hematórito
ICOS	Inducible T Cell Costimulator

ICOSLG	Inducible T Cell Costimulator ligand
IFNγ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
IPA	<i>Igenuity Pathway Analysis</i>
LV	Leishmaniose visceral
M	Manto
M1	Macrófago inflamatório
M2	Macrófago anti-inflamatório
MARCO	Macrophage Receptor With Collagenous Structure
MUM-1	Multiple myeloma oncogene-1
NK	Natural Killer
PALS	Bainha linfoide perিarteriolar
PAX5	<i>Paired box protein 5</i>
PB	Polpa branca
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PD1	Programed death cell protein 1
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PMN	Célula polimorfonuclear
PV	Polpa vermelha
RCD	Rebordo costal direito
RCE	Rebordo costal esquerdo
RIN	RNA Integrity number
SIGLEC1	Sialic Acid Binding Ig Like Lectin 1
TA	Temperatura ambiente
Tfh	<i>T helper folicular</i>
TGFβ	<i>Transforming growth factor beta</i>
TGO	Transaminase glutâmico oxalacético
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
Th	<i>T-helper</i>
TLR	<i>Toll like receptors</i>
TNFα	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
Treg	Linfócitos T regulatórios

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Leishmanioses	14
1.1.1	Epidemiologia da LV	15
1.1.2	Leishmaniose visceral humana	15
1.1.3	Patogênese	15
1.1.4	Apresentação clínica da LV	17
1.1.5	Coinfecção LV e HIV	19
1.2	O baço	20
1.2.1	O baço na LV	22
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	25
2.1	Justificativa	25
2.2	Hipótese	25
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo Geral	26
3.2	Objetivos Específicos	26
4	METODOLOGIA E ESTRATÉGIAS DE AÇÃO	27
4.1	Pacientes	27
4.2	Variáveis clínicas e sociodemográficas	27
4.3	Processamento histológico	27
4.4	Processamento imunohistoquímico	27
4.5	Avaliação histológica	27
4.6	Análise de IHQ	29
4.7	Processamento para expressão gênica	30
4.8	Extração de RNA	30
4.9	Análise da expressão gênica	31
4.10	Amostra de pacientes saudáveis para expressão gênica	31
4.11	Enriquecimento de vias de interações	31
4.12	Expressão dos resultados	32
5	RESULTADOS	33
5.1	Dados clínicos e laboratoriais	33
5.2	Aspectos histológicos do baço	35
5.3	Distribuição e densidade de leucócitos no baço	37

5.4	Distribuição e densidade das citocinas no baço	42
5.5	Avaliação da quantidade total de leucócitos e citocinas	51
5.6	Análise integrada	54
5.7	Avaliação da expressão gênica em pacientes com LV	55
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	65
	APÊNDICE	73

1 INTRODUÇÃO

Desde a primeira definição do gênero *Leishmania*, em 1903, pelo médico britânico Ronald Ross, até os dias atuais, diversos estudos foram realizados para a caracterização da patogênese, prevenção e tratamento da Leishmaniose visceral (LV). Entretanto, essa é uma enfermidade que ainda tem impactos na saúde pública, principalmente do Brasil.

Sabe-se que a LV é uma doença que afeta diversos órgãos, dentre eles, o baço, e que as alterações esplênicas decorrentes da infecção pelo protozoário contribuem para o agravamento da enfermidade, destacando-o como órgão-alvo e de interesse de estudos(Costa et al., 2010).

O nosso grupo tem se dedicado à avaliação das alterações microestruturais esplênicas, e em estudos com modelos de infecção natural (cães) e experimental (hamsters e camundongos), observou a redução de populações leucocitárias, atrofia de regiões de polpa branca, e alterações gênicas que podem prejudicar as funções fisiológicas do baço e torná-lo um órgão permissivo à sobrevivência do parasito (De Melo et al., 2021; Hermida et al., 2018; Lima et al., 2014; Melo et al., 2020). Em estudos preliminares, também observamos alterações esplênicas em baços de pacientes humanos com LV, com redução de áreas da polpa branca e acúmulo de plasmócitos na polpa vermelha.

Decidimos, portanto, aprofundar as investigações e entender como se distribuem os leucócitos no baço desses pacientes, e quais são as possíveis alterações gênicas observadas nesse órgão que o torna tão alterado durante o curso da doença.

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são um conjunto de enfermidades causadas por parasitos do gênero *Leishmania* que são transmitidos por intermédio da fêmea do vetor flebotomíneo (*Lutzomyia sp* – no continente americano; *Phlebotomus sp* – na Europa, África e Ásia) (Sharma; Singh, 2008).

A depender da espécie do protozoário e das interações com o sistema imunológico do hospedeiro, a doença pode apresentar quatro formas clínicas distintas: a Leishmaniose cutânea, com presença de lesões focais na pele; Leishmaniose mucocutânea, apresentando úlceras e lesões em regiões mucosas (geralmente na mucosa nasal); Leishmaniose cutânea disseminada, apresentando lesões ulceradas ou não, disseminadas pelo corpo, geralmente em pacientes alérgicos ou após tratamento para leishmaniose visceral; Leishmaniose visceral (LV), forma sistêmica que afeta o sistema fagocítico mononuclear e que será abordada em detalhes nessa revisão (Burza; Croft; Boelaert, 2018; Prata; Silva, 2005; Sharma; Singh, 2008).

1.1.1 Epidemiologia da LV

A LV tem sido reportada em diversos países ao redor do mundo, mas a maioria dos 12.739 casos reportados no ano de 2020 estão concentrados em 10 países das regiões tropical e subtropical: China, Eritreia, Índia, Quênia, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia, Somália, Yemen e Brasil (World Health Organization, 2022). De acordo com o último boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, em 2020, mesmo com a mobilização de leitos e recursos da saúde devido ao curso da pandemia pelo Sars-CoV-2, 1933 casos de LV foram reportados no Brasil; destes 165 foram a óbito (Brasil, 2022).

No que diz respeito à distribuição dos casos de LV no país, observa-se que há predomínio nas regiões Norte e Nordeste, principalmente em áreas rurais, estando relacionado a fatores socioeconômicos e climáticos (Da Silva Santana Cruz et al., 2021). Entretanto, nos últimos anos, nota-se o aparecimento de casos endêmicos na região Sul e em áreas urbanas de outras regiões. Isso pode significar a expansão da doença e mudanças na tríade epidemiológica da LV (Brasil, 2022; Reis et al., 2017).

1.1.2 Leishmaniose visceral humana

Em seres humanos, a LV pode se apresentar de formas aguda à crônica, estando o baço envolvido em todas as apresentações da doença. Além disso, observa-se maior prevalência de casos em pessoas do sexo masculino e crianças entre 1 e 4 anos de idade (Da Silva Santana Cruz et al., 2021).

1.1.3 Patogênese

A infecção pelo protozoário se dá no momento do repasto sanguíneo, quando a fêmea infectada do flebótomo regurgita, na derme do hospedeiro, formas promastigotas de *Leishmania infantum* (maia et al., 2011; Rogers; Chance; Bates, 2002) A picada do vetor induz a geração de resposta inflamatória local, que atrai neutrófilos e monócitos para a região (Ribeiro-Gomes; Sacks, 2012).

O recrutamento inicial de células inflamatórias é mediado pela ação de citocinas como IL-12, INF γ e TNF α , citocinas pró-inflamatórias que induzem a ativação de linfócitos T,

produção de espécies reativas de oxigênio pelos monócitos e fagocitose das formas promastigotas para eliminar o parasito(Volpedo et al., 2021).

Uma vez fagocitados, os parasitos sofrem mudança para a forma amastigota e podem modular a resposta do macrófago. Já tem sido observado que macrófagos infectados por *L. infantum* produzem baixas quantidades de TNF α e possuem menor razão de TNF α /IL-10, tornando-os menos inflamatórios e favorecendo a sobrevivência do parasito dentro dos vacúolos parasitóforos (Singh et al., 2018; Viana et al., 2018).

As formas amastigotas nos vacúolos parasitóforos se proliferam por divisão binária. Quando a quantidade de parasitos excede a capacidade suportada pela célula, ocorre a lise e a liberação de novos parasitos. Os antígenos ali presentes induzem resposta inflamatória e atração de novos fagócitos para o local, consistindo em novas células de sobrevivência para as formas amastigotas (David Sibley, 2011).

Outrossim, a infecção de macrófagos e células dendríticas por *L. infantum*, altera a expressão de moléculas de adesão, aumentando a quimiotaxia pela expressão de CCR7 e migração pela via PI3K, contribuindo para a disseminação do parasito para nichos distantes do sítio da infecção, como por exemplo a medula óssea, fígado e baço(Rebouças et al., 2021; Rocha et al., 2020).

A persistência do protozoário nesses órgãos, cria um ambiente inflamatório, com participação de linfócitos Th1, como os CD4 $^{+}$ citotóxicos, e liberação de citocinas como INF γ e TNF α . Essas citocinas atuam ativando macrófagos e células NK que podem eliminar o parasito às custas do dano às células do hospedeiro, levando ao aparecimento de sinais clínicos da enfermidade (Dayakar et al., 2019; Ghosh et al., 2021).

Além dos macrófagos não-responsivos, sabe-se que os linfócitos T, especialmente os linfócitos T regulatórios (Treg), contribuem para a patogênese da LV. Em um estudo utilizando sangue periférico de pacientes com LV, observou-se que havia aumento da população de Treg com fenótipo CD4 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$ associado a elevação de IL-10, impedindo a ativação de Linfócitos T com perfil Th1 (Ghosh et al., 2021; Rai et al., 2012).

Portanto, o estabelecimento ou não da infecção pelos parasitos depende, sobretudo, da capacidade do hospedeiro em subverter a modulação da resposta de perfil regulatório. Tem sido observado que em indivíduos sintomáticos, há predomínio de resposta do tipo Th2, com envolvimento de citocinas como IL10, IL6 e IL4. Já naqueles que apresentam perfil misto de ativação Th1/Th2, tem sido relacionado com menor carga parasitária e doença mais branda (Samant et al., 2021a).

Devido a essa complexa interação parasito-hospedeiro, as manifestações clínicas na LV humana assumem um espectro que vai desde indivíduos assintomáticos, à indivíduos com apresentação crônica e refratários ao tratamento convencional, e ao óbito (Saporito et al., 2013).

Sabe-se que a capacidade de transmissão da LV permanece mesmo em indivíduos assintomáticos (Laurenti et al., 2013). Assim, quando um vetor não infectado, no momento do repasto sanguíneo, ingere formas amastigotas presentes em monócitos circulantes e macrófagos da derme, essas formas amastigotas ao alcançarem o intestino do vetor flebotomíneo irão sofrer modificação para a forma promastigota, forma infectante do protozoário (Rogers; Chance; Bates, 2002).

1.1.4 Apresentação clínica da LV

As formas de apresentação clínica podem variar de acordo com características imunológicas, genéticas e socioambientais às quais o paciente está inserido. Em regiões endêmicas, estima-se que há prevalência de 69% de casos assintomáticos. Nesses casos, a presença de sinais inespecíficos e passageiros, como febre branca, tosse seca e sudorese, não levam o indivíduo à procura por atendimento médico, e o diagnóstico nesses pacientes é quase sempre acidental (Mannan et al., 2021).

De acordo com os parâmetros preconizados pelo Ministério da Saúde, casos de febre alta associada à esplenomegalia devem ser tratados como suspeita de LV, e a confirmação através da identificação direta ou por cultura do parasito, ou imunofluorescência indireta (Brasil, 2014).

Em alguns casos, geralmente em crianças e indivíduos de área não endêmica, a LV pode ser aguda. Nesses, ocorre a presença de febre alta, tosse não produtiva, diarreia e hepatoesplenomegalia discreta, além de quantidades elevadas de IgG sérica anti-*Leishmania*. A evolução do quadro usualmente não ultrapassa os 2 meses, podendo evoluir para cura espontânea (Michalick; Ribeiro; Da Silva, 2016).

No período em que alguns autores consideram como período de estado ou fase crônica, os pacientes com LV apresentam febre intermitente, palidez de mucosas, tosse, emagrecimento, aumento do volume abdominal em decorrência de hepatoesplenomegalia e em alguns casos, apresentam linfadenopatia (Michalick; Ribeiro; Da Silva, 2016; Queiroz; Alves; Correia, 2004; Saporito et al., 2013).

Além das alterações clínicas, esses pacientes cursam com alterações laboratoriais como a anemia, trombocitopenia, leucopenia, alteração da razão albumina/globulina e das enzimas

hepáticas (TGO e TGP), assim como discreto aumento dos níveis séricos de ureia e creatinina (Costa et al., 2010; De Araújo et al., 2012; Queiroz; Alves; Correia, 2004). As alterações laboratoriais acompanham as manifestações clínicas e podem se intensificar a medida em que piora o estado geral do paciente.

Quando a doença não é diagnosticada ou quando o paciente não responde ao tratamento adequado, os sinais e sintomas podem se agravar. Nesses pacientes em estado grave é possível observar, além dos outros sinais descritos: desnutrição acentuada, fraqueza, pele opaca e cabelos quebradiços, sangramentos espontâneos, edema de membros inferiores, icterícia e surgimento de coinfeções bacterianas. Estando esses sinais associados ao prognóstico ruim e desfecho com óbito do paciente (Costa et al., 2010; Da Silva et al., 2020; De Araújo et al., 2012).

No Brasil, o tratamento de primeira escolha é feito com antimoniais pentavalentes, com duração entre 20 e 30 dias. Se após esse período não ocorrer a cura clínica, é reiniciado o tratamento por período mais prolongado, não ultrapassando 40 dias. Os casos em que não apresentem cura clínica nesse período (ausência de febre, melhora dos parâmetros hematológicos e redução da hepatoesplenomegalia) são classificados como casos de falha terapêutica, podendo ser instituídas outras terapias, como a Anfotericina B e Anfotericina B Lipossomal, por exemplo (Brasil, 2014; Pelissari et al., 2011).

Não é incomum que, mesmo após o tratamento efetivo, pacientes apresentem novos sintomas de LV em um período de até 12 meses após cura clínica, classificando-os como casos de recidivas de LV. Alguns estudos identificaram como fatores preditores de recidivas em pacientes imunocompetentes: ser do sexo masculino e com idade < 5 anos e > 45 anos, presença baços maiores na admissão hospitalar e menor redução da esplenomegalia após o tratamento (Burza et al., 2014; Gorski et al., 2010).

Esses fatores põem em destaque a participação do baço na patogênese da LV. Apesar de não haver indicação da esplenectomia como terapia alternativa em casos de LV recidivante (Brasil, 2014), existe uma série de casos em que a esplenectomia eletiva realizada em pacientes refratários ao tratamento e com múltiplas recidivas foi eficaz em promover a cura clínica (Campos et al., 2021; Dutra et al., 2012; Reinaldo et al., 2022).

Ainda não se sabe qual a implicação da retirada do baço para o tratamento da LV, mas acredita-se que devido ao tamanho elevado do órgão, a quantidade de medicamento administrada seja insuficiente para eliminação dos parasitos, portanto, a remoção cirúrgica de um importante órgão do sistema retículo-endoacial contribua para a efetividade do tratamento, assim como reduz o efeito do hiperesplenismo (Lekic et al., 2022; Reinaldo et al., 2022).

Outro fator relacionado ao aparecimento de recidivas é o estado imunológico do paciente. Em um estudo que avaliou pacientes em diferentes condições de imunossupressão, foi observado que aproximadamente 40% deles apresentaram ao menos uma recidiva (FernándezGuerrero et al., 2004). Dentre as condições de imunossupressão, a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é uma condição frequente observada em pacientes com LV grave, e será abordada em detalhes.

1.1.5 Coinfecção LV e HIV

No Brasil, no ano de 2020, aproximadamente 12% dos casos de LV diagnosticados eram também HIV positivos (Brasil, 2022). Ambas as enfermidades são de caráter imunossupressor, e já se tem notado que pacientes com LV-HIV podem progredir mais rapidamente para AIDS, aumentando o risco de morte (Pintado et al., 2001).

O HIV e *L. infantum* possuem células alvo em comum, monócitos, e em estudos *in vitro* foi percebido que há atuação sinérgica entre o protozoário e o HIV. Enquanto macrófagos derivados de pacientes HIV+ aumentam a capacidade de fagocitar *Leishmania*, amastigotas em células dendríticas induzem a replicação viral em linfócitos T CD4+ pela secreção de IL6 e TNF \square (Garg et al., 2009; Maksoud et al., 2022).

Outro aspecto em comum às duas enfermidades é que em ambas observamos a redução de linfócitos T CD4+. Esse dano à essa população de células se mantém mesmo após o tratamento para LV e cura clínica, em que se observa números de T CD4+ abaixo de 200 células/mL de sangue nos pacientes fazendo uso de antirretrovirais (Alexandrino - de - Oliveira et al., 2010).

A diminuição de TCD4+, gera um ambiente propício à proliferação do protozoário, levando o paciente à um estado de infecção crônica e imune estimulação persistente, ativando, portanto, mecanismos de tolerância e exaustão imunológica observado pelo aumento da expressão de marcadores como PD1 e CTLA4 na superfície de linfócitos T regulatórios nesses pacientes (Lindoso et al., 2018; Vallejo et al., 2015). Além disso, Guedesid et al. (2022) demonstraram que há elevação do nível sérico de citocinas como IL6, IL10 e IL17A, em pacientes sintomáticos LV-HIV positivos, indicando que nesses, também há susceptibilidade ao desenvolvimento da doença relacionada ao perfil Th2 de resposta.

As alterações da população de TCD4+ impactam diretamente na apresentação clínica. Por possuírem ambiente menos inflamatório, desenvolvem sintomas iniciais mais brandos e sinais que se confundem muitas vezes com outras infecções oportunistas, como a presença de

tosse e diarreia. Isso leva ao aumento do tempo entre aparecimento dos sintomas e o diagnóstico, impactando na resposta ao tratamento (Henn et al., 2018; Lindoso et al., 2018).

Para mais, apesar das alterações laboratoriais normalmente encontradas em pacientes com LV, também serem observadas em pacientes coinfetados, nesses, a leucopenia, linfopenia e anemia são mais frequentes e apresentam valores absolutos menores que nos pacientes somente com LV (Henn et al., 2018; Pintado et al., 2001).

Pacientes coinfetados LV-HIV apresentam maiores chances de recidivas e morte (Nascimento et al., 2011). Portanto, é importante avaliar a presença de redução de TCD4+, baixa dosagem da produção de IFN- α e alta expressão de PD1 ao final do tratamento, pois esses dados podem predizer se o paciente LV-HIV irá apresentar recidivas dentro de 3 meses (Takele et al., 2022b).

1.2 O baço

O baço é um órgão localizado entre a 9^a e 11^a costelas, no hipocôndrio esquerdo do corpo humano, normalmente pesando aproximadamente 200g. É um órgão parenquimatoso, circundado por uma cápsula de tecido conjuntivo, que se projeta para o interior formando trabéculas. Este órgão é irrigado através da artéria esplênica e drenado para a circulação sistêmica através da veia esplênica (Chadburn, 2000; Redmond et al., 2005; Stingl et al., 2002).

O baço possui principalmente duas funções: retenção e destruição de hemácias senescentes com reciclagem do ferro; órgão linfoide secundário participando da vigilância imunológica para抗ígenos circulantes no sangue. Essas funções estão diretamente relacionadas ao padrão organizacional desse órgão, histologicamente dividido em polpa branca (PB) e polpa vermelha (PV) (Chadburn, 2000).

A artéria esplênica adentra ao baço através das trabéculas, e se ramifica em diversas outras arteríolas menores pelo parênquima esplênico, chamadas de arteríolas centrais. Essas, desembocam em sinusoides rodeados pelos cordões esplênicos espalhados pela PV, e o sangue é coletado por capilares e vênulas dispostas pelo órgão.

Os cordões esplênicos são estruturas formadas por fibras colágenas e reticulares produzidas por fibroblastos locais, além de serem povoados principalmente por monócitos e macrófagos, mas também são encontrados outros componentes como eritrócitos, linfócitos B e T, plaquetas e eventualmente plasmócitos (Kraus, 2003; Steiniger, 2015).

Os macrófagos da PV se localizam, especialmente, próximos aos sinusoides, pois facilita o processo de fagocitose das hemácias envelhecidas. Assim, ocorre o processo de degradação

dessas células e reciclagem do ferro. Ademais, esses macrófagos residentes da PV expressam receptores de IgG na membrana, indicando papel fundamental na remoção de moléculas opsonizadas da circulação sanguínea (Kurotaki; Uede; Tamura, 2015; Nagelkerke et al., 2018).

As arteríolas centrais são circundadas por umas camadas de linfócitos T, formando o que se chama de bainha linfoide periarteriolar (*Periarteriolar Lymphoid Sheats* – PALS), e podem se abrir em sinusoides que circundam os folículos linfoides, em uma região conhecida como seio marginal. Nessa região são encontrados macrófagos metalofílicos e é onde acontece a recirculação de linfócitos T e B (Steiniger; Rüttinger; Barth, 2003).

As células se mantêm nas regiões determinadas graças à expressão de fatores de quimioatração pelas células do estroma, como por exemplo CCL19 e CCL21 para linfócitos T e células dendríticas na PALS e CXCL13 para os linfócitos B nos folículos (Ohl et al., 2003). Essa região da PB é a parte esplênica responsável pela formação de resposta imunológica e é onde são ativados os linfócitos B.

O folículo linfoide apresenta uma região chamada de zona do manto, rica em linfócitos B imaturos, e pode apresentar uma região de centro germinativo (CG), que aparece após estimulação antigênica. Essa, consiste em um local de intensa proliferação de clones de linfócitos B, além de conter células dendríticas foliculares, que auxiliam no processo de seleção de linfócitos B maduros (Cesta, 2006; Mebius; Kraal, 2005).

Entre a PB e a PV, existe uma região de transição, conhecida como zona marginal, é através dela em que ocorre a interação entre as moléculas e células oriundas da corrente sanguínea e a PB ou PV. Na zona marginal é possível encontrar dois tipos de macrófagos com perfis fenotípicos distintos: macrófagos da zona marginal com expressão de lectina do tipo C (SIGNR1) e receptor MARCO, ligado ao reconhecimento de bactérias Gram + e Gram -; macrófagos metalofílicos da zona marginal que expressam moléculas de adesão do tipo SIGLEC1 principalmente (Mebius; Kraal, 2005).

No baço, podem ser observadas tanto resposta imune inata quanto adaptativa. A resposta imune inata se dá principalmente frente a bactérias circulantes na corrente sanguínea, como *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Neisseria meningitidis*. Essas são reconhecidas e fagocitadas pelos macrófagos da zona marginal (Mebius; Kraal, 2005; Perez et al., 2017).

A resposta imune adaptativa, por sua vez, inicia após a entrada de células apresentadoras de antígeno, pela zona marginal, nas áreas de células T. Isso induz que linfócitos T da PALS passem a expressar CXCR5 e migrem para região de contato com a zona de linfócitos B no folículo linfoide, enquanto linfócitos B foliculares aumenta a expressão de CCR7 para migrar

em direção à zona de células T. O contado de linfócitos T helper, especialmente T CD4+, com células B foliculares, induz a proliferação dessas através da co-estimulação ICOS-ICOSLG e da secreção de citocinas como a IL-21 (Lewis; Williams; Eisenbarth, 2019).

Após a proliferação, que acontece na zona escura do CG, as células B adentram à zona clara do CG onde serão selecionadas através do contato com células dendríticas foliculares que possuem抗ígenos aderidos à superfície. Aquelas que se ligarem com alta afinidade, são selecionadas e podem se diferenciar em plasmócitos ou células B de memória (Lewis; Williams; Eisenbarth, 2019; Maclennan, 1994; Mebius; Kraal, 2005).

1.2.1 O baço na LV

O baço é um órgão alvo da LV, afetado em todas as apresentações clínicas da enfermidade. Consiste em um importante nicho de replicação parasitária, e as alterações observadas no órgão se relacionam com alguns dos sinais clínicos dos pacientes com LV.

Um dos marcadores clínicos de suspeita da LV é a presença da esplenomegalia. Essa alteração, que não é específica da LV, pode ser em virtude do aumento das funções esplênicas, observado em doenças hematológicas, ou infiltração de células do sistema imune, como visto em doenças crônicas e inflamatórias (malária e LV) (McKenzie et al., 2018). Assim, a esplenomegalia pode levar à um quadro de hiperesplenismo, condição em que o baço passa a reter grande quantidade das células sanguíneas, e o paciente pode ter alterações laboratoriais como anemia, trombocitopenia e leucopenia.

Não só modificações macroscópicas são observadas nesse órgão, como também na organização estrutural e composição celular do baço, descritas por Veress et al. (1977). Nesse trabalho utilizando baços de pacientes humanos, foram observadas atrofia da polpa branca esplênica, presença de macrófagos parasitados e acúmulo de plasmócitos na PV dos pacientes com LV.

De fato, a redução da área de polpa branca é um achado também em estudos experimentais. Em camundongos, a infecção por *L. donovani* promoveu a redução de células dendríticas foliculares, comprometendo a ativação de linfócitos B e formação de CG (Smelt et al., 1997). O comprometimento da formação de CG se relaciona com a resposta ineficiente frente à patógenos circulantes no sangue, haja vista que pacientes com LV frequentemente vêm à óbito em decorrência de infecções bacterianas (Endris et al., 2014).

Outro fator observado é que em cães com LV, as alterações da organização da PB esplênica estão associadas à maior parasitismo no órgão, e maior frequência de sinais clínicos,

indicando o papel do comprometimento do baço com o aumento da susceptibilidade à LV (Lima et al., 2014).

Diversos estudos têm demonstrado que a alteração da PB esplênica na LV acontece à medida em que progride a doença, observando primeiro uma hiperplasia dos folículos, seguida de atrofia e desaparecimento das sub-regiões de PB. Com isso, pôde-se graduar a organização da PB em três níveis: Organizado – PALS e folículos linfoides presentes, com CG, zona do mantos e marginais preservadas; moderadamente desorganizado – desaparecimento de CG, e leve atrofia dos folículos; desorganizado – atrofia de folículos linfoides e desaparecimento dos limites entre PB e PV (Hermida et al., 2018; Santana et al., 2008).

Compreender de que maneira ocorre a desorganização esplênica tem sido objeto de investigação em uma série de estudos experimentais e de infecção natural. O que se observa é que ocorre redução de linfócitos B na PB, acúmulo de plasmócitos na PV, redução células dendríticas foliculares e de linfócitos T, e elevação de marcadores de exaustão (PD1 e CTLA4), alterando o perfil celular no baço desorganizado (De Souza et al., 2019; Hermida et al., 2018).

O processo de remodelamento da PB parece também estar relacionado ao parasitismo e com a produção de citocinas no órgão. Observa-se que a produção de TNF α por macrófagos infectados leva à secreção de IL-10, essa citocina suprime a migração de células dendríticas via CCR7, contribuindo para a desorganização da PB (Montes De Oca; Engwerda; Kaye, 2020).

Já as alterações foliculares na LV são mediadas pela redução da expressão de CXL13, CCL19 e CCL21, quimiocinas importantes para manutenção da organização folicular. Também foram observadas redução na expressão de genes como DLK1, envolvido com a ativação de células B, em baços desorganizados, e aumento da expressão de CDKN2A, grupo gênico relacionado à inibição do ciclo celular e senescência (De Melo et al., 2021; Silva et al., 2012).

Alguns estudos dedicaram-se ao entendimento dessas alterações histológicas em baço de seres humanos, investigando as alterações leucocitárias, e observaram que há alteração na razão de linfócitos TCD4 $^{+}$ /TCD8 $^{+}$, elevação de IL10, e resultados divergentes quanto o acúmulo ou não de linfócitos Treg (CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$) (Dos-Santos et al., 2014; Maurya et al., 2010; Nylén et al., 2007).

Apesar disso, como muitos dos estudos realizados com pacientes humanos utilizam aspirados esplênicos e citometria de fluxo para caracterização fenotípica, pouco se sabe a respeito das alterações e distribuição dos leucócitos e citocinas no contexto histológico do baço, destacando a necessidade de investigações nesse sentido.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

2.1 Justificativa

De acordo com o que foi exposto na revisão de literatura, existem uma série de estudos experimentais que demonstram as alterações leucocitárias e esplênicas na LV e como essas contribuem para o agravamento da doença.

A desorganização esplênica também ocorre em seres humanos, e geralmente são observadas em pacientes crônicos e com maior gravidade, destacando uma possível associação entre as modificações da organização do baço e o maior número de recidivas e falha terapêutica. A importância do comprometimento esplênico nesses pacientes fica evidente quando se observa melhora do quadro após a remoção cirúrgica do baço.

Dessa forma, compreender o remodelamento estrutural do baço, entendendo quais são as vias gênicas associadas às alterações das populações de leucócitos e citocinas esplênicas de pacientes humanos pode auxiliar na identificação de biomarcadores que auxiliem no prognóstico de pacientes que não responderão adequadamente ao tratamento convencional, e necessitarão de abordagens terapêuticas distintas.

O nosso grupo tem se dedicado no estudo da desorganização esplênica e identificou algumas moléculas e vias de sinalização em infecções experimentais que estão envolvidas nas alterações esplênicas. E em um estudo preliminar, ainda não publicado, utilizando baço de três pacientes com LV recidivante, pudemos identificar assinatura gênica distinta entre os pacientes controle e com LV, assim como entre o baço desorganizado e os que ainda apresentavam alguma organização da PB.

Buscando melhor compreender os resultados observados e refinar as análises, ampliamos o número de pacientes em nosso estudo, e propomos realizar uma análise de sequenciamento gênico, correlacionando aos achados clínicos, laboratoriais, histopatológicos e de fenótipo celular no baço de pacientes com LV recidivante.

2.2 Hipótese

A nossa hipótese é que pacientes com LV recidivante apresentam desestruturação dos microambientes esplênicos com alteração da relação entre células responsáveis pela imunidade contra *Leishmania* e outros patógenos, associada a um perfil de expressão de citocinas que favorece a manutenção da infecção por *Leishmania*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Definir quais as células e vias de sinalização potencialmente envolvidas na desestruturação dos compartimentos esplênicos e provável associação com progressão da doença na leishmaniose visceral humana.

3.2 Objetivos específicos

#1 – Comparar a distribuição de leucócitos (linfócitos T [CD3, CD4, CD8] e B, Macrófagos e Plasmócitos) em baços de pacientes com LV recidivante e em indivíduos sem doenças crônicas;

#2- Comparar a distribuição de leucócitos produtores das citocinas (IFN γ , TNF α , TGF β , IL1B, IL4, IL6, IL10 e IL17) em baços de pacientes com LV recidivante e em indivíduos sem doenças crônicas;

#3 – Comparar o perfil de expressão genética entre baços de pacientes com LV recidivante e em indivíduos saudáveis.

#4–Identificar células e vias de sinalização diferencialmente representadas na desestruturação dos compartimentos esplênicos em indivíduos com LV recidivante;

4 METODOLOGIA E ESTRATÉGIAS DE AÇÃO

4.1 Pacientes

Nesse estudo, foram utilizados 6 baços de pacientes com LV submetidos à esplenectomia para controle da infecção por *Leishmania*, oriundos do Instituto de Doenças Tropicais Nathan Portela (Teresina-PI), e 5 baços de pacientes sem LV submetidos à esplenectomia por trauma ou outras razões (não infecciosas) obtidos do Hospital do Subúrbio (Salvador-BA). Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e quando não possível (óbito do paciente), a autorização foi obtida junto aos familiares.

4.2 Variáveis clínicas e sociodemográficas

Também foram coletadas informações clínico-laboratoriais (hemograma, exames bioquímicos, histórico de doenças, entre outras informações) e variáveis sociodemográficas (idade, sexo, grau de instrução, entre outras) a partir dos prontuários hospitalares.

4.3 Processamento histológico

Os fragmentos do baço, contendo de 3 a 4 mm de espessura, foram fixados em paraformaldeído ou formalina alcoólica ácida, por 24h à temperatura ambiente. Então, foram embebidos em parafina e feitas secções histológicas com 4 a 5 mm de espessura. As lâminas foram coradas em HE para avaliação histopatológica do baço, ou processadas para imunohistoquímica.

4.4 Processamento imunohistoquímico

Secções de 4-5mm de espessura foram acondicionadas em lâminas silanizadas e acondicionadas à 4°C até o momento do uso. Então processou-se a reação de imunohistoquímica da seguinte maneira: para os marcadores celulares, CD3 (coelho policlonal), CD4 (4B12), CD8 (C8/144B), CD20 (L26), CD68 (KP1) e MUM1, a desparafinização e a recuperação do antígeno foram realizadas usando um módulo de pH alto (Dako PT Link (PT100 / PT101)) à 97°C por 20 minutos. O kit DAKO EnVision + HRP foi usado como sistema de amplificação e o DAB como cromógeno; para a detecção de citocinas e outros marcadores foram utilizados os anticorpos primários anti- INF γ , TNF α , TGF β , IL-10, IL-4, IL-6, IL-17, IL-1b, Foxp3 e Caspase-3, feita a desparafinização e reidratação em xilol, seguidas de uma série decrescente de soluções de etanol e o bloqueio da peroxidase tecidual endógena em peróxido de hidrogênio a 3%. A recuperação antigênica foi realizada em banho-maria com Retrieval Buffer por 25 minutos a 95 ° C, pH 9,0. Em seguida, os cortes foram incubados em solução de saponina (0,1% em PBS 0,01 M, pH 7,4) por 10 minutos em temperatura ambiente, seguida de incubação em leite desnatado 10% por 30 minutos e incubação final com os anticorpos primários diluídos em albumina bovina a 1% - solução PBS, *overnight* a 4°C. Em seguida foi utilizado anticorpo secundário e o sistema LSAB (Dako Corporation, Carpinteria CA, EUA, K690) por 30 minutos a 37 ° C. Todas as reações foram

reveladas usando uma solução de cromógeno 3'3 diaminobenzidina e contrastadas com hematoxilina de Harris.

4.5 Avaliação histológica

A análise histológica do baço foi feita de acordo com os parâmetros descritos: a densidade das células (linfócitos, macrófagos, plasmócitos, neutrófilos, megacariócitos) foi classificada em uma escala de 0 a 3: 0 – corresponde a ausência dessas células; 1 – corresponde a observações de uma ou pequenos agregados em poucos campos de observação; 2 corresponde a observação de células em muitos campos; 3 – corresponde a presença de várias células na maioria dos campos observados. As observações foram feitas em um aumento de 400x. Além disso, a celularidade da PV foi classificada em uma escala de -3 a +3, em que -3 corresponde a ausência de células na PV, com regiões despovoadas, e +3 ao aumento de células na PV, com muitos agregados e poucas regiões vazias. A classificação quanto à organização da PB foi feita de acordo com as observações de Santana e colaboradores (2008) e revisadas por (HERMIDA et al., 2018): Baço tipo 1, com folículos linfoides bem preservados, com os limites entre a ZM, CG e PALS bem definidos; Baço tipo 2, quando os folículos linfoides estão hipo ou hipertrofiados, e com limites pouco definidos entre as sub-regiões; Baço tipo 3, quando observada atrofia de folículos linfoides, e desaparecimento dos limites entre as sub-regiões da PB.

As lâminas coradas por HE foram scaneadas e as imagens foram visualizadas através do software Olyvia (Olympus). Foi então realizada a mensuração da área total do corte representado na lâmina, e a área ocupada pelas regiões de PB. Após, foi calculado a porcentagem de PB representada na lâmina.

4.6 Análise de IHQ

As lâminas coradas por IHQ foram scaneadas e as imagens foram visualizadas através do software OlyVIA (Olympus). As marcações foram avaliadas na PB e na PV dos casos, em análises quantitativas e semiquantitativas.

Para as análises na PB, foram escolhidos os 5 maiores folículos (quando possível) representados na lâmina, e então foram quantificadas as células marcadas. Nas lâminas em que a quantidade de células marcadas era muito grande (CD3, CD4, CD8, CD20), impedindo a contagem individual, foi realizada a análise semiquantitativa, calculando a porcentagem de área

marcada em relação a área da PB de cada folículo selecionado. Nas outras marcações, que permitiam a contagem individual de células, foram realizadas a análise quantitativa, calculando a média de células/mm² dos 5 folículos.

Para as análises na PV, foi feita uma avaliação por *hotspot*, em que a região com maior quantidade de marcação foi selecionada, assim como 4 regiões adjacentes e não sobrepostas, do mesmo tamanho (Figura). As células foram quantificadas em cada uma das regiões e calculada a densidade de células (células/mm²). Assim como na região de PB, as análises semiquantitativas utilizaram o mesmo critério, e foram realizadas nas marcações de CD3 e CD4.

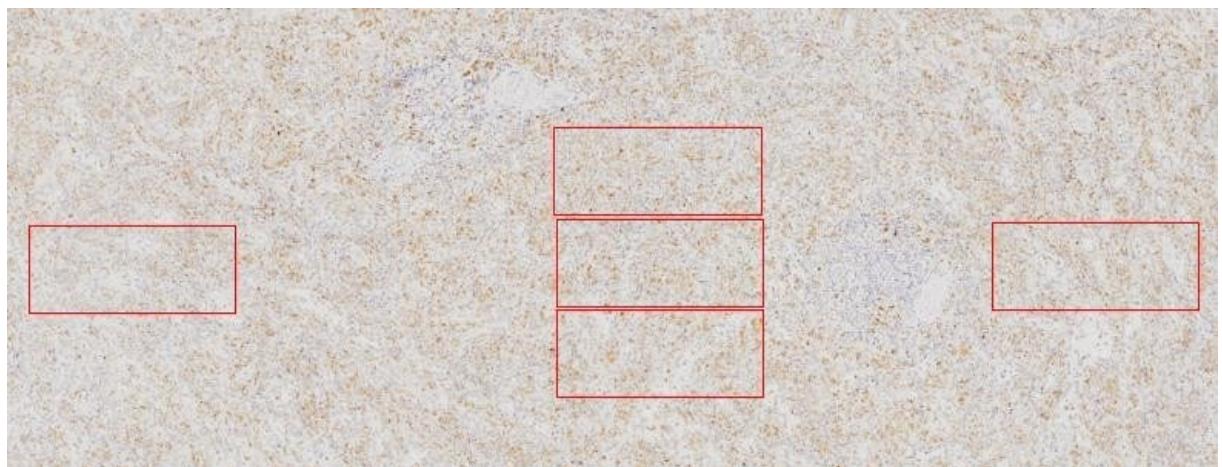


Figura 1 - Imagem representativa da quantificação de células na Polpa vermelha. Os retângulos vermelhos representam as áreas escolhidas para captura e quantificação.

Fonte: Autor

Nas análises quantitativas, foi realizada a normalização da quantidade de células encontradas por região, PB ou PV, com relação ao volume do baço.

Para calcular o volume do baço e o volume ocupado pelas regiões de PB e PV utilizamos o peso do baço (g), a densidade média do baço humano de 1,044g/mL (Stingl et al., 2002) e a porcentagem de PB encontrada. Como as secções apresentam espessura entre 4-5µm, o volume da secção analisada (Vs) foi calculado multiplicando a área da imagem analisada pela espessura média (4,5µm), encontrando o volume em µm³.

Então a quantidade absoluta de células (Qt) foi estimada utilizando a fórmula:

$$Qt = \left(\frac{Cq}{Vs(mL)} \right) Vr$$

Em que:

- *Qt* equivale a quantidade absoluta de células

- Cq equivale a quantidade de células contadas na área
- Vs equivale ao volume da secção analisada
- Vr volume da região do baço (PB ou PV)

4.7 Processamento para expressão gênica

Fragments de baço de três pacientes (LV1, LV2 e LV3), com aproximadamente 10x10x3 mm, foram acondicionados em tubos com *RNALater* por 24-48 a 4°C. Após esse período, foi retirado todo o líquido e o fragmento congelado em nitrogênio líquido até a extração do RNA.

4.8 Extração de RNA

As amostras criopreservadas foram maceradas em TRIZol e processadas para extração de RNA, utilizando kit de extração *RNAeasy* (QIAGEN, Alemanha), com adição de etapa para digestão enzimática de moléculas de DNA. A quantidade de RNA foi mensurada por *NanoDrop* e a qualidade avaliada por eletroforese automatizada *Agilent Bioanalyzer* (Agilent) (qualidade do RNA com número RIN (*RNA integrity number*)>7).

4.9 Análise da expressão gênica

A análise da expressão gênica foi realizada através da plataforma *nCounter* da NanoString Technologies, que utiliza código de barras moleculares acoplados aos transcritos do RNA alvo para detecção digital, realizada no Genomics Core Leuven (VIB/KULeuven - Bélgica).

Para essa análise foram utilizadas duas *Probes*: Uma para capturar o RNA mensageiro através de ligação complementar, e outra ligada ao código de barra fluorescente, objetivando identificar os RNAs mensageiros através da fluorescência após a hibridização.

A combinação dessas sondas com material genético permite a detecção de transcritos desejados via códigos de barras fluorescentes. Os dados brutos foram submetidos ao préprocessamento utilizando o software nSolver 2.0 (NanoString Technologies).

4.10 Amostra de pacientes saudáveis para expressão gênica

Como controle da análise da expressão gênica, amostras de tecido do baço de pacientes saudáveis foram reanalisadas a partir do projeto GTEx (Lonsdale et al., 2013), que conduziu o perfil do transcriptoma completo de vários tecidos humanos, incluindo o baço. Três amostras foram escolhidas com base na semelhança de idade e gênero com o perfil dos pacientes infectados. A biblioteca biomaRt para R (Smedley et al., 2009) foi utilizada para anotações genéticas. Os dados brutos foram mapeados em relação à referência do genoma humano (GRCh38) usando STAR (Dobin et al., 2013) com parâmetros padrão. A contagem de HT-seq (Anders; Pyl; Huber, 2015) atribuiu e contou leituras mapeadas para características genômicas anotadas com base nas anotações GENCODE v.

4.11 Enriquecimento de vias de interações

O software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) foi utilizado para avaliar as interações e gerar redes entre os transcritos diferencialmente expressos, a partir de bases de dados online e resultados que foram testados experimentalmente. Como critérios de qualidade, foram utilizados um *cut-off* de log de *fold change* e False Discovery Ratio <0.05 e z-score. Também foi feita uma análise não supervisionada para avaliação funcional de vias canônicas, doenças e funções e redes regulatórias mais expressas no conjunto de dados.

4.12 Expressão dos resultados

Todas as amostras foram testadas para avaliar a normalidade. A significância estatística das diferenças observadas entre os grupos foi determinada através de testes paramétricos para variáveis com distribuição normal. Para as variáveis categóricas, semiquantitativas ou de distribuição não gaussiana, foram utilizados os testes não paramétricos. As diferenças entre proporções foram analisadas utilizando-se o teste do X² ou teste exato de Fisher. Para a análise de correlação foi utilizado o software R, calculando através do teste de Spearman. O valor crítico para significância dos resultados foi de p<0,05.

Os gráficos foram gerados utilizando o software GraphPad Prism 5.0 ou Orange Data Mining 3.35

5 RESULTADOS

5.1 Dados clínicos e laboratoriais

Os parâmetros clínicos e laboratoriais foram obtidos a partir dos prontuários hospitalares, tanto dos pacientes com LV como dos pacientes sem LV, e estão sumarizados na Tabela 1.

Observamos que todos os pacientes com LV apresentaram ao menos 4 reinternamentos entre o período do 1º diagnóstico da LV e a realização da esplenectomia. Dos 6 pacientes com LV, cinco possuíam diagnóstico de infecção por HIV, porém estavam em tratamento com antirretrovirais e apresentando carga viral indetectável no momento da esplenectomia.

A avaliação dos parâmetros laboratoriais evidenciou que pacientes com LV e do grupo controle apresentavam anemia, não havendo diferença estatística entre os valores de hematócrito e hemoglobina. Quanto à contagem global de leucócitos, houve diferença entre os grupos: pacientes com LV apresentaram leucopenia (1635 [1398-3535]), enquanto os pacientes do grupo controle apresentaram leucocitose (14800 [13300-16200]) ($p=0,0079$, MannWhitney).

Todos os pacientes com LV apresentaram baço palpável ao exame clínico, e, após a esplenectomia, o peso do baço foi maior nesses pacientes (903,5g [584-1270]) que nos pacientes controle (76,5g [60-164]) ($p=0,0043$, Mann-Whitney).

Apenas 2 dos 6 pacientes com LV e 2 dos 5 pacientes controle apresentaram valores de plaqueta abaixo dos limites de referência (150000), mas não foi observada diferença estatística entre os grupos.

Tabela 1 - Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes utilizados no estudo.

esplenectomia (anos)	9	-	7	10		8	-	-	-	-	-
Reinternamento	5	5	4	7		5	-	-	-	-	-
Fraqueza	+	+	+	+		+	-	-	-	-	-
Emagrecimento	+	-	+	+		+	-	-	-	-	-
Mucosa	+	+	++	+		+	-	-	-	-	-
hipocorada											
Hepatomegalia (cm RCD)	4	-	4	6			-	-	-	-	-
Esplenomegalia (cm RCE)	18	12	4	8			-	-	-	-	-
Hemorragia	+	-	+	-			-	-	-	-	-
Peso do baço (g)	1882	1066	742	680	1065	295	245	76,5	59,4	60	82,2
Óbito	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
Laboratoriais											
Hemoglobina (g/dl)	7,8	8,7	9,1	9,6	8,5	6,7	4,9	9	10,5	9,1	9
Hematocrito (%)	25	28	29	32	-	21	15,1	25,5	31,9	28,1	27,2
Leucócitos	4840	1090	1500	3100	1690	1580	14800	11900	14800	14700	17600
Plaquetas x 10 ³	203	155	84,9	247	150	88,1	120	202	275	150	116
Cópias HIV (inicial)	<50	-	441	<40	-	24942	-	-	-	-	-
Cópias HIV (final)	<50	-	Indetectável	Indetectável	Indetectável	Indetectável	-	-	-	-	-
CD4/mm ³	50	-	122	69	61	101	-	-	-	-	-
pré-cirúrgico											
CD8/mm ³											
pré-cirúrgico	344	-	524	-	-	177	-	-	-	-	-
CD4/CD8	0,14	-	0,23	-	-	0,57	-	-	-	-	-
pré-cirúrgico											
Bilirrubina direta	-	0,58	0,45	-	-	-	-	-	-	0,2	-
Bilirrubina indireta	-	0,54	0,22	-	-	-	-	-	-	0,1	-
TGO	-	18	24	-	-	20	-	-	171	170	-

TGP	-	19	20	-	-	9	-	-	111	100	-
Creatinina	-	1,1	1,8	-	-	0,5	0,8	0,4	2,2	1,2	1

Fonte: Autor

5.2 Aspectos histológicos do baço

Realizamos a análise histopatológica das lâminas de baços corados em HE e não observamos presença de periesplenite nos pacientes com LV. Já nos pacientes controle, dois dentre os cinco apresentaram a inflamação na cápsula do órgão.

Quanto à apresentação da polpa branca, observamos que havia desde folículos primários a folículos secundários e com CG bem evidentes nos pacientes do grupo controle. Nos pacientes com LV observamos de folículos atrofiados (2/6) a hiperplásicos (2/6). Enquanto nos pacientes sem LV observamos presença de folículos atrofiados (1/5) a levemente hiperplásicos (2/5). Assim, pudemos classificar os baços em tipo I (sem LV 3/5; com LV 2/6); tipo II (sem LV 2/5; com LV 3/6) e tipo III (com LV 1/6). Apesar de observarmos baço do tipo II tanto nos pacientes com LV como nos pacientes sem LV, nesses, os folículos eram essencialmente primários, enquanto nos pacientes com LV, os folículos eram reativos e com perda da delimitação de algumas sub-regiões. Esses dados estão representados na Figura 2.

Mensuramos a área relativa ocupada pela polpa branca e não observamos diferença entre os pacientes com LV e sem LV, entretanto, observamos que há redução do número de folículos linfoides nos pacientes com LV ($p=0,0009$, Teste T) (Figura 2G).

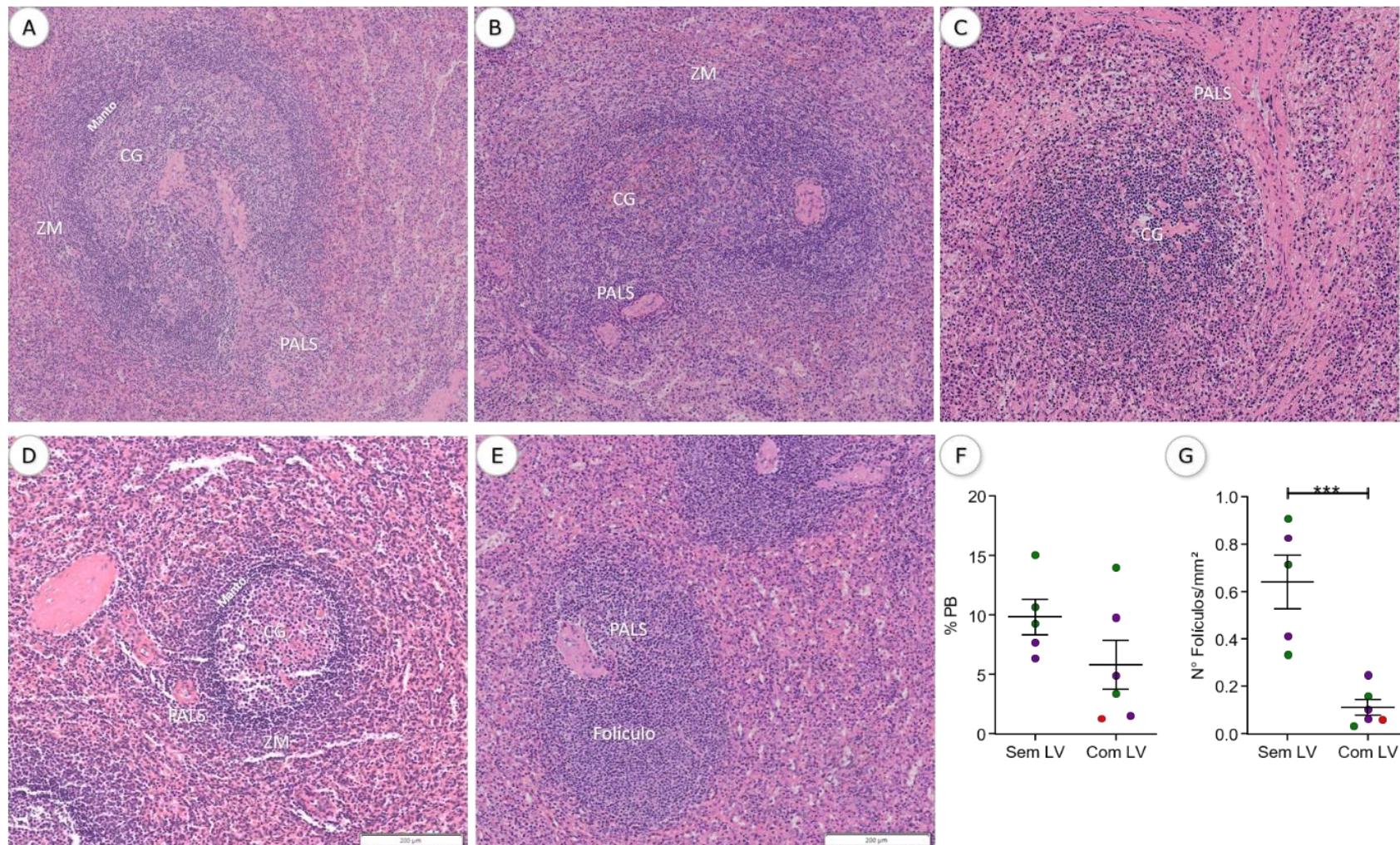


Figura 2 – Análise histológica dos baços corados em HE. Fotomicrografias do baço de pacientes com LV (A-C) e sem LV (D e E) representando diferentes apresentações de organização do baço: Baço tipo I com sub-regiões bem distinhas (A e D); baço tipo II com perda da delimitação de algumas sub-regiões (B e E); baço tipo III com atrofia de PB e ausência de delimitações entre as sub-regiões da PB. F-Gráfico da porcentagem de área ocupada pela PB; G – Gráfico da distribuição de folículos por área de tecido esplênico.

Nos gráficos, cada ponto representa a medida de cada paciente, pontos verdes (baço tipo I), pontos roxos (baço tipo II), ponto vermelho (baço tipo III). PB – Polpa branca; PALS – Bainha linfoide periaarteriolar; ZM – Zona marginal; CG – Centro germinativo. *** - $p=0,0009$, Teste T.

Fonte: Autor

Também foram analisados os parâmetros histopatológicos na PV, e o que observamos é que não há alteração na densidade de células, mas há alteração da população de leucócitos predominante entre os pacientes do grupo com e sem LV, demonstrando redução da frequência de linfócitos ($p=0,0184$, Mann-Whitney) e aumento da frequência de plasmócitos na PV ($p=0,0044$, Mann-Whitney) (Figura 3).

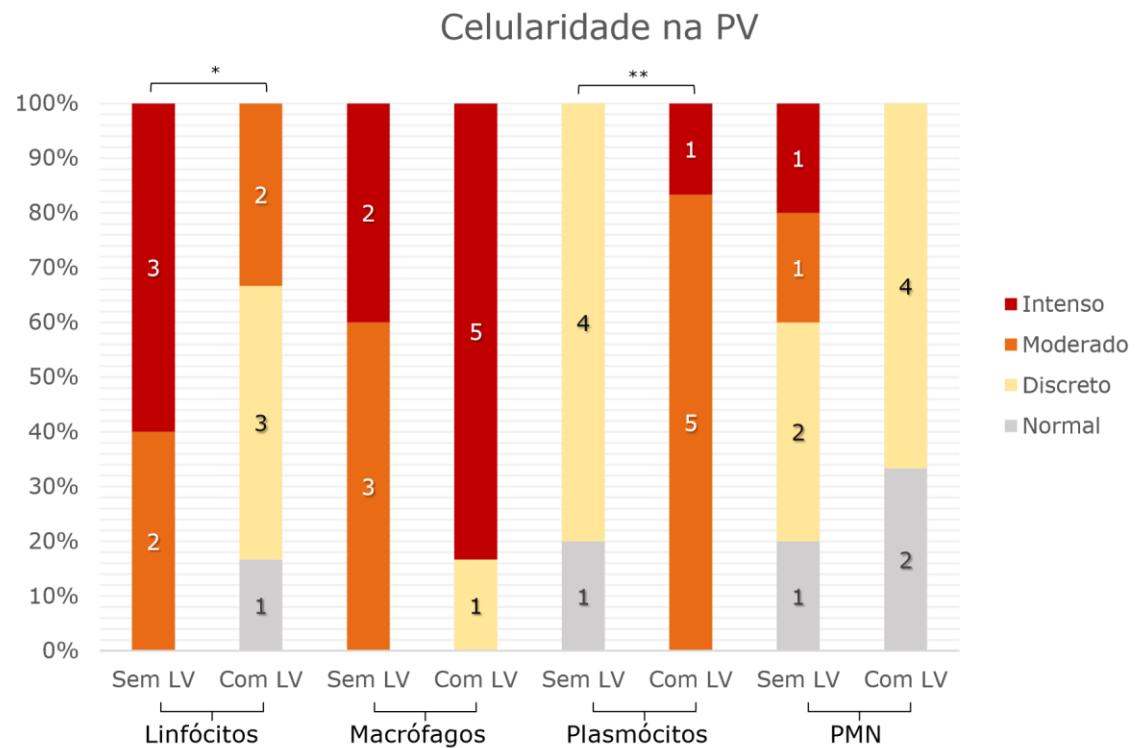


Figura 3 – Gráfico da frequência de leucócitos na PV. Análise histológica de lâminas em HE da frequência relativa de leucócitos em regiões da PV do baço dos pacientes com LV e Sem LV. * - $p<0,05$, Mann-Whitney; ** - $p<0,01$, Mann-Whitney; PV – Polpa vermelha; PMN – polimorfonuclear. **Fonte:** Autor

5.3 Distribuição e densidade de leucócitos no baço

A fim de estudar a distribuição dos leucócitos entre a PB e PV, e melhor caracterizá-los, realizamos a marcação e quantificação de CD3 – para linfócitos T e dos subtipos CD4 e CD8; CD20 – para linfócitos B; CD68 para macrófagos e MUM1 para plasmócitos, através da IHQ.

A distribuição dos leucócitos se apresenta de maneira distinta entre os tipos de baço, conforme representado na figura 4, mas mantém a localização esperada para os marcadores: CD3 ocupando principalmente a região de PALS, CD20 ocupando os folículos linfoides, CD68 principalmente nas regiões de polpa vermelha.

Porém, ao compararmos os baços do tipo II do grupo com LV ao baços do tipo II do grupo sem LV, observamos que há alteração na distribuição de linfócitos T CD4: enquanto nos pacientes do grupo sem LV essas células estão principalmente agrupadas nas áreas de PALS, no grupo dos pacientes com LV estão distribuídas por toda a área de PB, sem formar agregados na região da PALS (Figura 4).

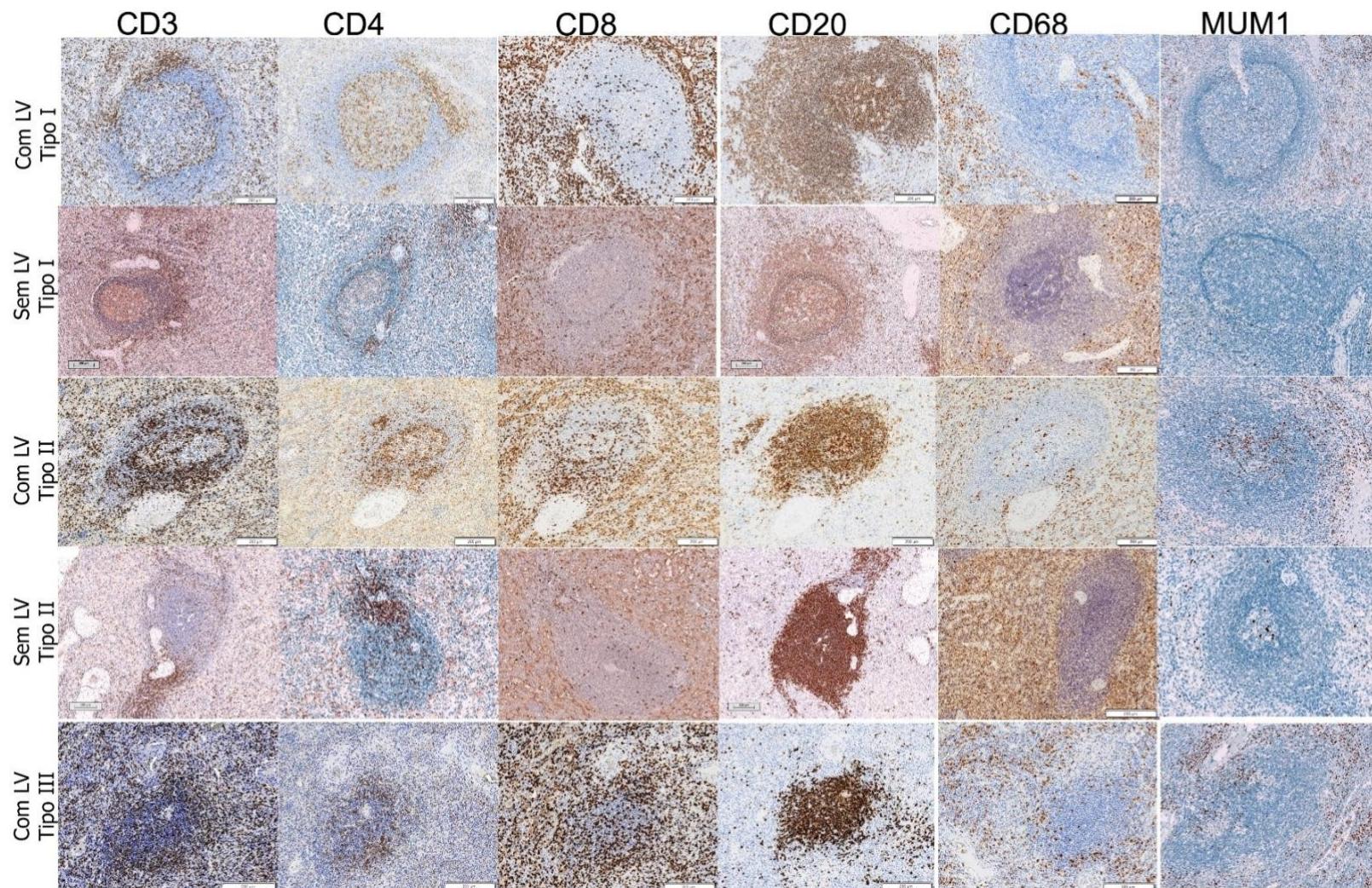


Figura 4 – Fotomicrografia leucócitos esplênicos marcados por IHQ. Imagens representativas das marcações por IHQ de linfócitos T CD3+, T CD4+ e TCD8+, linfócitos B CD20+ e macrófagos CD68+ nos diferentes tipos de baço dos pacientes com e sem LV. Tipo I – baço organizado; tipo II – baço levemente desorganizado; tipo III, baço desorganizado. Observar ausência das sub-regiões da polpa branca no baço do tipo III. **Fonte:** Autor

Ao realizarmos a quantificação da densidade de células marcadas por região, observamos que há aumento na densidade de linfócitos T CD8+ na PB ($p=0,0079$, MannWhitney) (Figura 5C), aumento na densidade de macrófagos CD68+ na PV ($p<0,0317$, MannWhitney) (Figura 5N) e aumento da densidade de plasmócitos MUM1+ na PB e PV ($p=0,0079$, Mann-Whitney) (Figuras 5I e 5M), nos pacientes com LV. Não observamos diferença na densidade de marcação de CD3, CD4 e CD20 entre os pacientes (Figura 5).

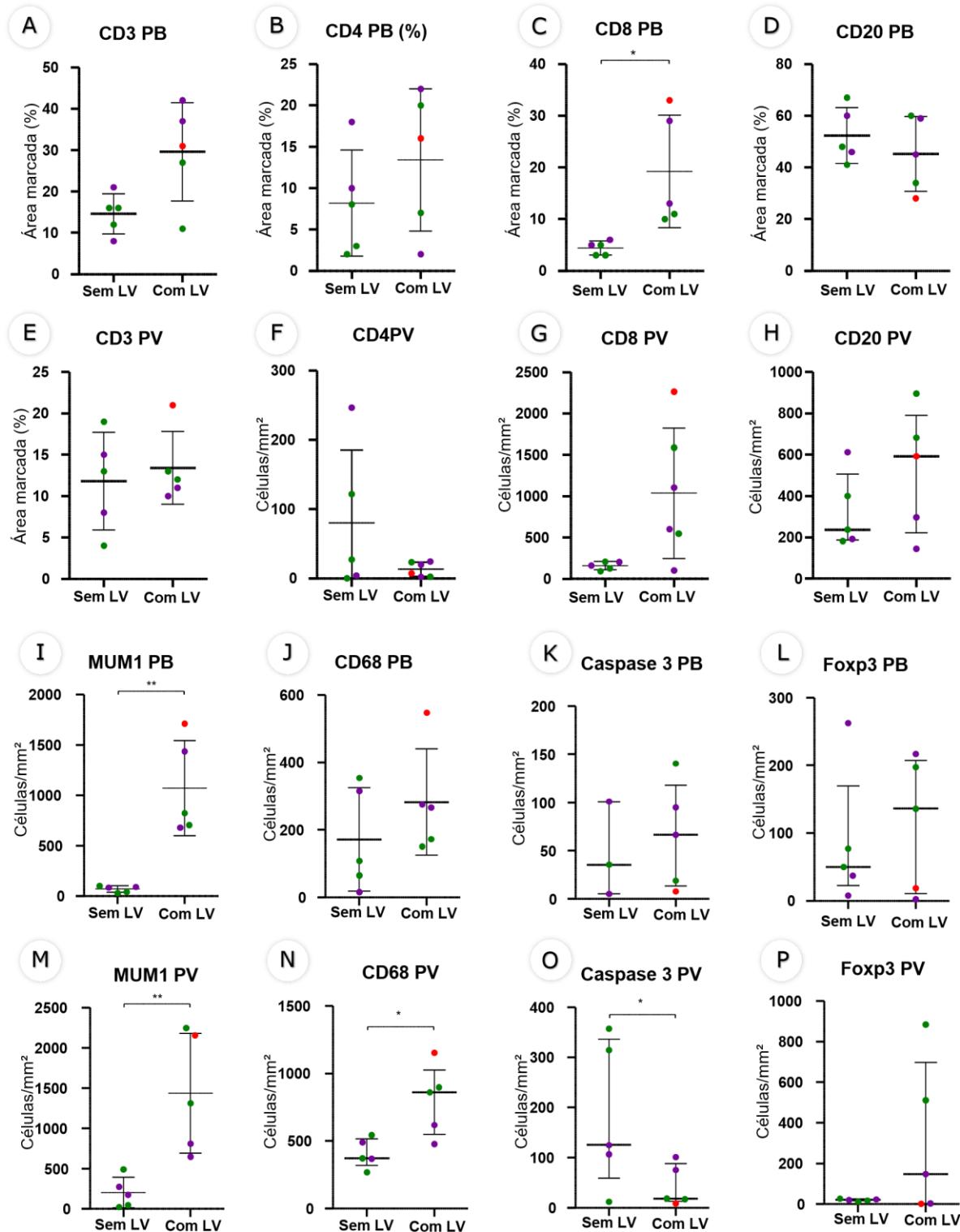


Figura 5 – Gráficos da densidade de leucócitos no baço. Gráficos representativos da proporção ocupada por área marcada após IHQ de: CD3 (A e E) na PB e PV, respectivamente; CD4 (B), CD8 (C) e CD20 (D) na PB. Gráficos representativos da quantidade de células marcadas por mm² para: CD4 (F), CD8 (G) e CD20 (H) na PV; MUM1 (I e M), CD68 (J e N), Caspase 3 (K e O) e Foxp3 (L e P) na PB e PV, respectivamente. Cada ponto representa a média de contagem de 5 áreas diferentes por paciente. Barras representam a média e o desvio padrão. Ponto verde – Baço do tipo I. Ponto roxo – baço do tipo II. Ponto vermelho – baço do tipo III. * - $p=0,0317$, MannWhitney. ** - $p = 0,0079$, Mann-Whitney.

Fonte: Autor

Mesmo não sendo observado aumento do número de células na PV do baço dos pacientes com LV, houve redução da expressão de caspase 3 ($p=0,0317$, Mann-Whitney) quando comparados ao grupo sem LV (Figura 5O), indicando possível redução de apoptose.

Apesar de não observarmos diferença na porcentagem da área de PB ocupada por CD3 e CD20 entre os pacientes sem LV e com LV, percebemos que há uma alteração na relação entre os linfócitos B e T nessa área. Enquanto nos pacientes sem LV essa relação se mantém em torno de 4 células CD20+ para uma célula CD3+, nos pacientes com LV essa relação está reduzida para aproximadamente duas células CD20+ para uma célula CD3+ ($p=0,0317$, MannWhitney) (Figura 6).

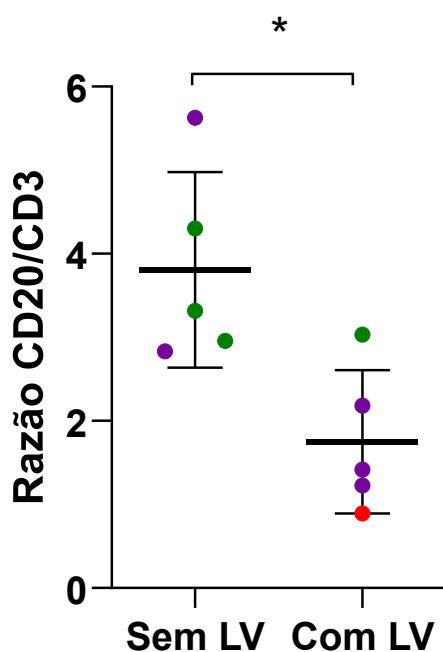


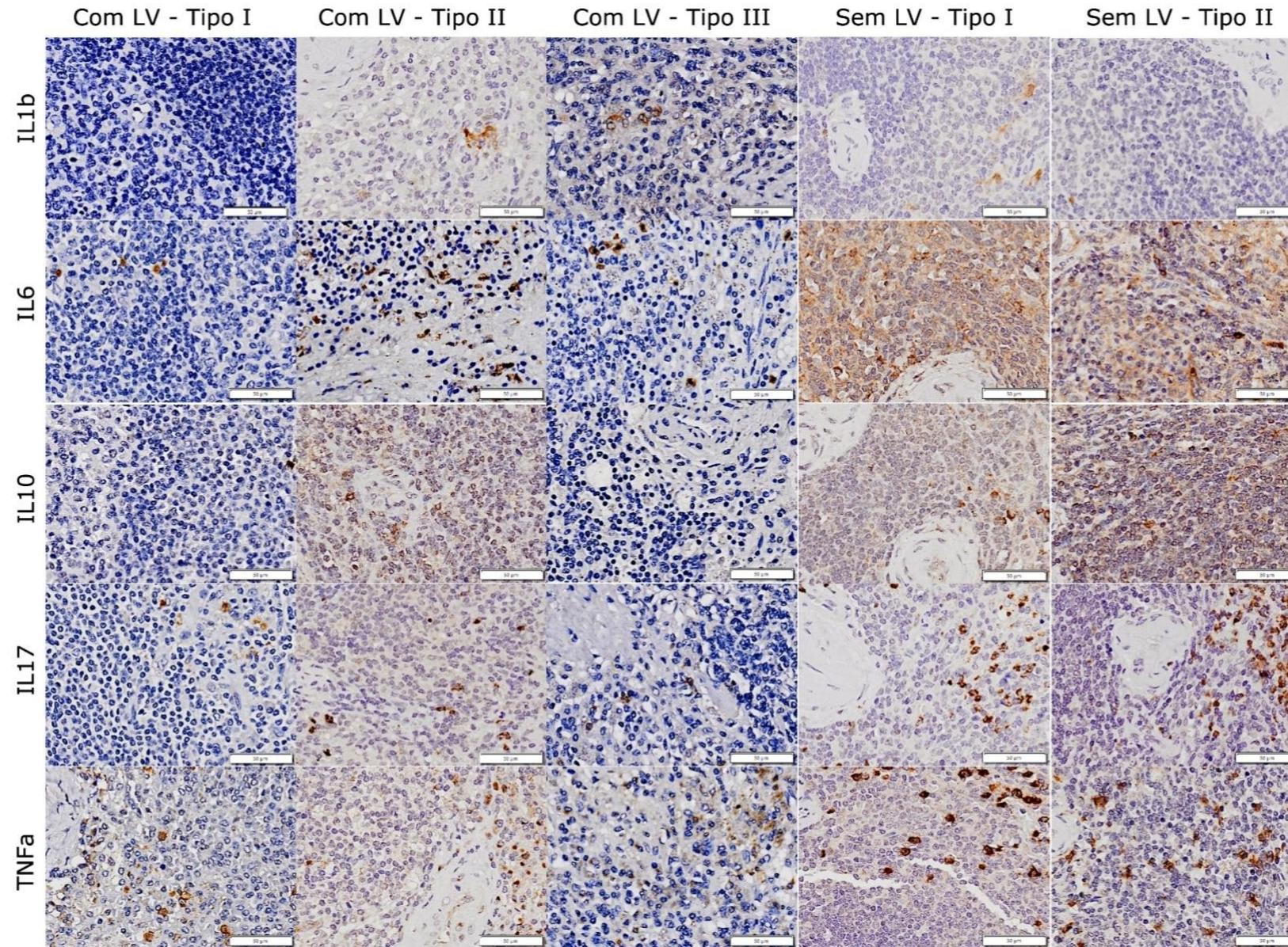
Figura 6 – Razão entre marcação de CD20 e CD3 na polpa branca. Os pontos representam a razão da área de CD20 em relação a área ocupada por CD3 na PB esplênica. Barras representam a média e o desvio padrão. Ponto verde – Baço do tipo I. Ponto roxo – baço do tipo II- Levemente organizado; Tipo III – Desorganizado. **Fonte:** Autor

5.4 Distribuição e densidade das citocinas no baço

Com o intuito de avaliar as citocinas e qual a distribuição delas no baço de pacientes com LV, realizamos a marcação por IHQ de IL1B, IL4, IL6, IL10, IL17, IFN \square , TNF \square e TGF \square .

A distribuição das células marcadas para as citocinas apresentou-se de maneira variada entre os pacientes.

Assim, na PB observamos o seguinte: Nos pacientes com LV e baço tipo I havia mais células positivas para IFN α e TGF β ; nos pacientes com LV e baço do tipo II havia mais células positivas para IL1B, IL6, IL10 e TNF α ; pacientes do grupo sem LV e baço do tipo I possuem mais células IL4 positivas e pacientes do grupo sem LV e baço do tipo II possuem mais células IL17 positivas (Figura 7 e 8).



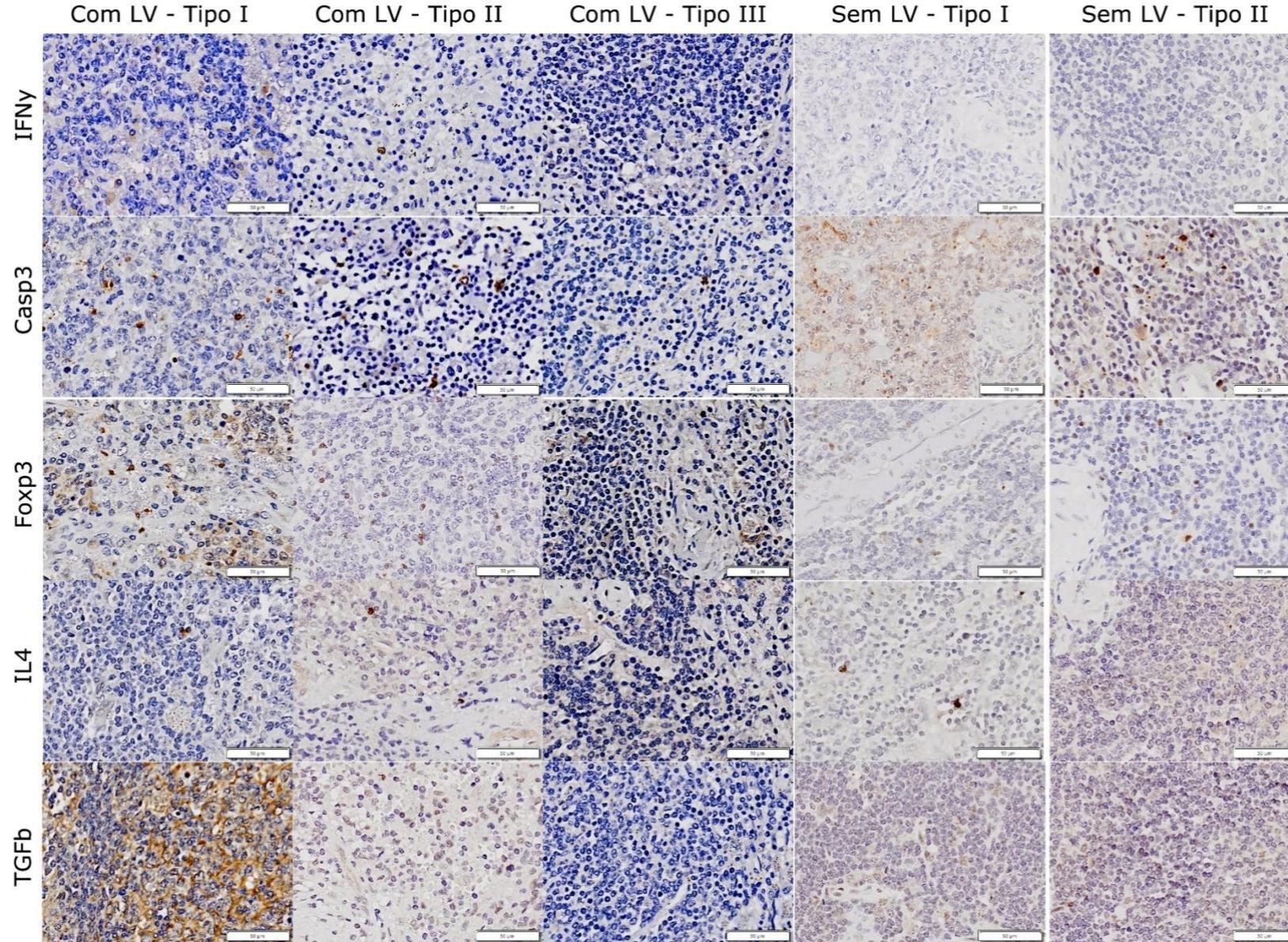
Fotomicrografias das marcações por IHQ para citocinas na PB. Imagens representativas das marcações de IL1b, IL6, IL10, IL17 e TNF α nos pacientes com LV e Sem LV, de acordo com o tipo de baço: Tipo I – Organizado; Tipo II- Levemente organizado;

Desorganizado. Observe que há mais células IL6+ nos pacientes com LV.

Fonte: Autor

Tipos III –

45



Fotomicrografias das marcações por IHQ para citocinas na PB. Imagens representativas das marcações de IFN β , Caspase 3 (Casp3), Foxp3, IL4 e TGF β nos pacientes com LV e Sem LV, de acordo com o tipo de baço: Tipo I – Organizado; Tipo II- Levemente organizado; Tipo III – Desorganizado.

Fonte: Autor

Já na PV, observamos o seguinte padrão de marcação: Nos pacientes com LV e baço tipo I havia mais células TGF β e IFN γ positivas; nos pacientes com LV e baço do tipo II havia mais células IL6 e IL10 positivas; pacientes do grupo sem LV e com baço tipo I possuem mais células positivas para IL1B; Pacientes sem LV com baço tipo II, apresentaram mais células marcadas para IL17, IL4 e TNF α . Essas estão representadas nas figuras 9 e 10.

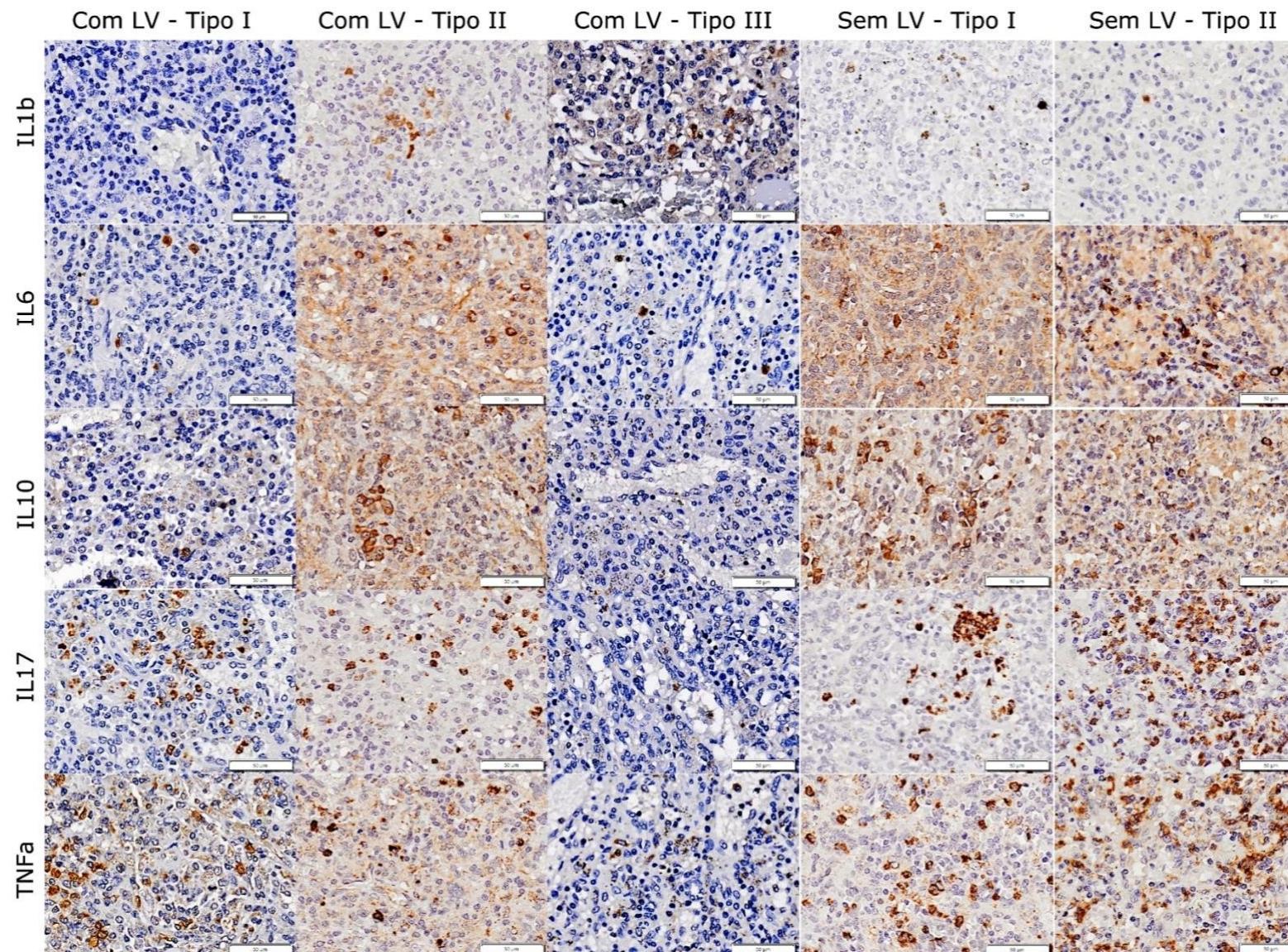


Figura – 9
 Fotomicrografias das marcações por IHQ para citocinas na PV. Imagens representativas das marcações IL1b, IL6, IL10, IL17 e TNF α nos pacientes com LV e Sem LV, de acordo com o tipo de baço: Tipo I – Organizado; Tipo II- Levemente organizado; Tipo III Desorganizado.
 Fonte: Autor

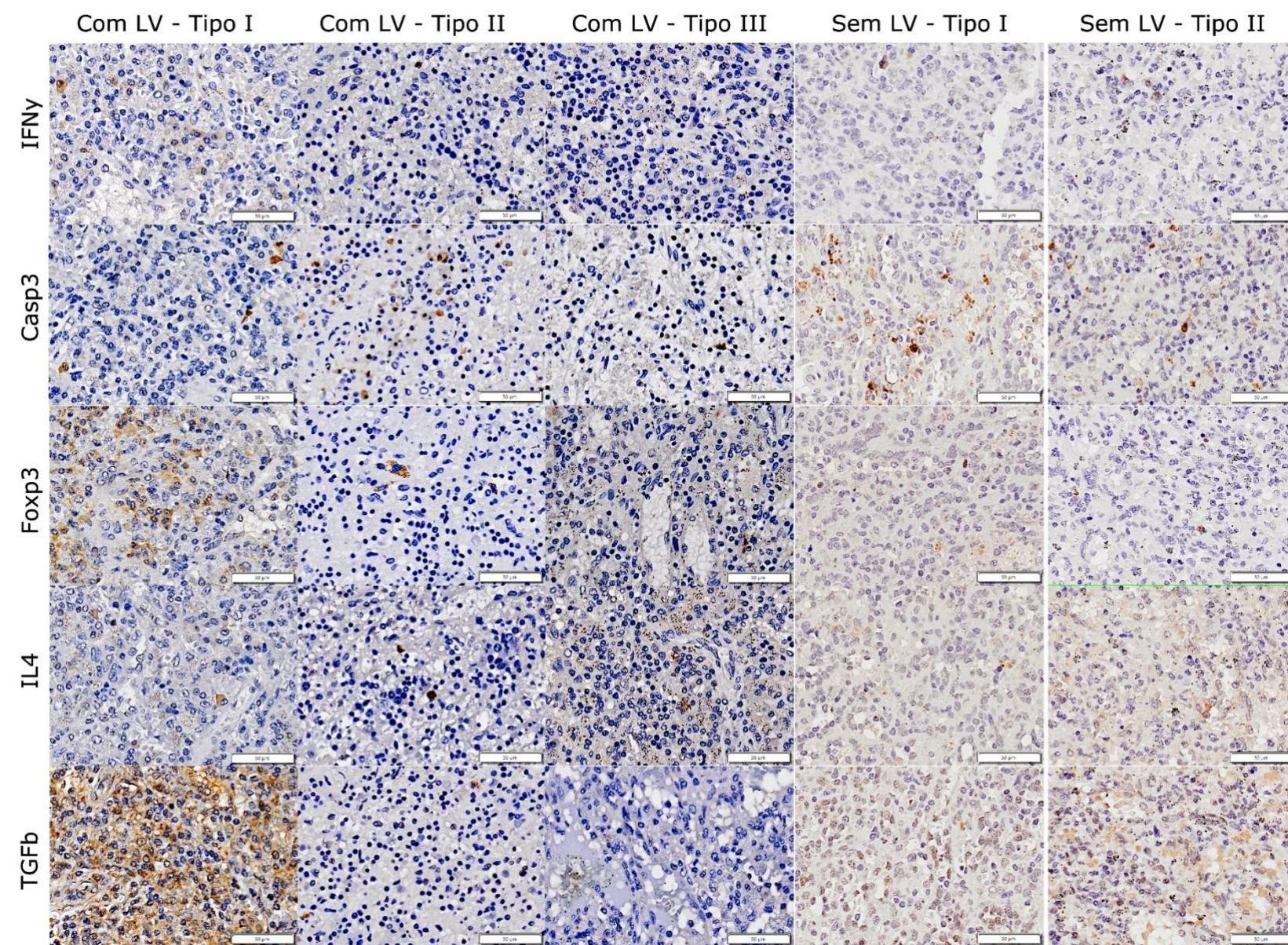


Figura – 10
Fotomicrografias das marcações por IHQ para citocinas na PV.
 Imagens representativas das marcações de IFN \square , Caspase 3 (Casp3), Foxp3, IL4 e TGF \square nos pacientes com LV e Sem LV, de acordo com o tipo de baço: Tipo I – Organizado; Tipo II- Levemente organizado; Tipo III – Desorganizado.

Fonte: Autor

No que diz respeito a densidade de células marcadas entre a PB e PV, não observamos diferença estatisticamente significante entre as citocinas (Figura 11), exceto pela redução da densidade de células positivas para IL4 na PV ($p=0,0212$, Mann-Whitney) (Figura 11F) e para IL17 na PB ($p=0,0317$, Mann-Whitney) (Figura 11I) dos pacientes com LV quando comparado aos pacientes sem LV.

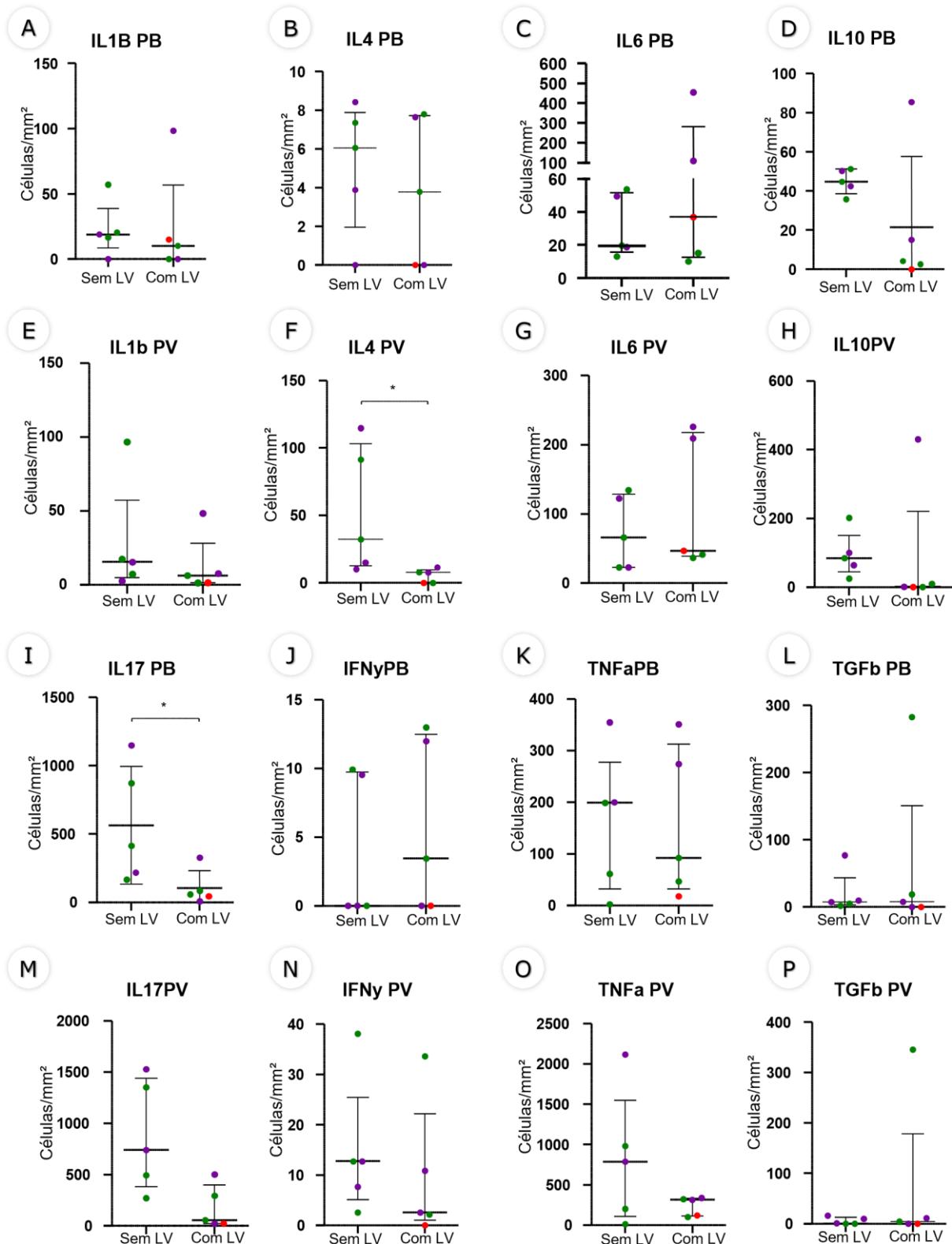


Figura 11 – Gráficos representativos da densidade de citocinas no baço. Gráficos representativos da densidade de células marcadas por mm^2 na PB para: IL1B (A), IL4(B), IL6 (C), IL10 (D), IL17 (I), IFNy (J), TNF α (K) e TGF β (L); densidade de células marcadas por mm^2 na PV de IL1B (E), IL4 (F), IL6 (G), IL10 (H), IL17 (M), IFNy (N), TNF α (O) e TGF β (P). Os pontos representam os valores de média por paciente. Barras representam a média e o desvio padrão. Ponto verde – Baço do tipo I. Ponto roxo – baço do tipo II. Ponto vermelho – baço do tipo III.

* - $p < 0,05$, Mann-Whitney.

Fonte: Autor

5.5 Avaliação da quantidade total de leucócitos e citocinas

Na tentativa de normalizar as contagens de leucócitos e de citocinas, para melhor compreender a real dimensão dessas células nos pacientes com e sem LV, realizamos a correção de acordo com o volume total do baço dos pacientes.

Observamos que os pacientes com LV apresentaram, na PB, aumento do volume ocupado por: linfócitos T CD3 ($p = 0,0079$, Mann-Whitney) (Figura 12A); células CD8+ ($p=0,0079$, Mann-Whitney) (Figura 11C); linfócitos B CD20 ($p=0,0317$, Mann-Whitney) (Figura 12D); plasmócitos MUM1+ ($p=0,0079$, Mann-Whitney) (Figura 12I) e macrófagos CD68+ ($p=0,0317$, Mann-Whitney) (Figura 12J). Já na PV desses pacientes, foi observado aumento da quantidade de células CD3 ($p=0,0238$, Mann-Whitney) (Figura 12E), CD8 ($p=0,0079$, Mann-Whitney) (Figura 12G), CD20 ($p=0,0079$, Mann-Whitney) (Figura 12H), MUM1 ($p=0,0079$, Mann-Whitney) (Figura 12M) e CD68 ($p=0,0079$, Mann-Whitney) (Figura 12N).

Com relação às citocinas, apenas houve maior número de IL6 na PB e PV ($p=0,0317$ e $p=0,0159$, respectivamente, Mann-Whitney) (Figura 13C e 13G) nos pacientes com LV quando comparados aos pacientes sem LV. Não observamos diferença estatística entre os grupos ao avaliarmos a quantidade absoluta de células positivas para CD4, IL1B, IL4, IL10, IL17, TGF β , TNF α , IFN γ , Foxp3 e Caspase 3 na PB e na PV dos pacientes (Figuras 12 e 13).

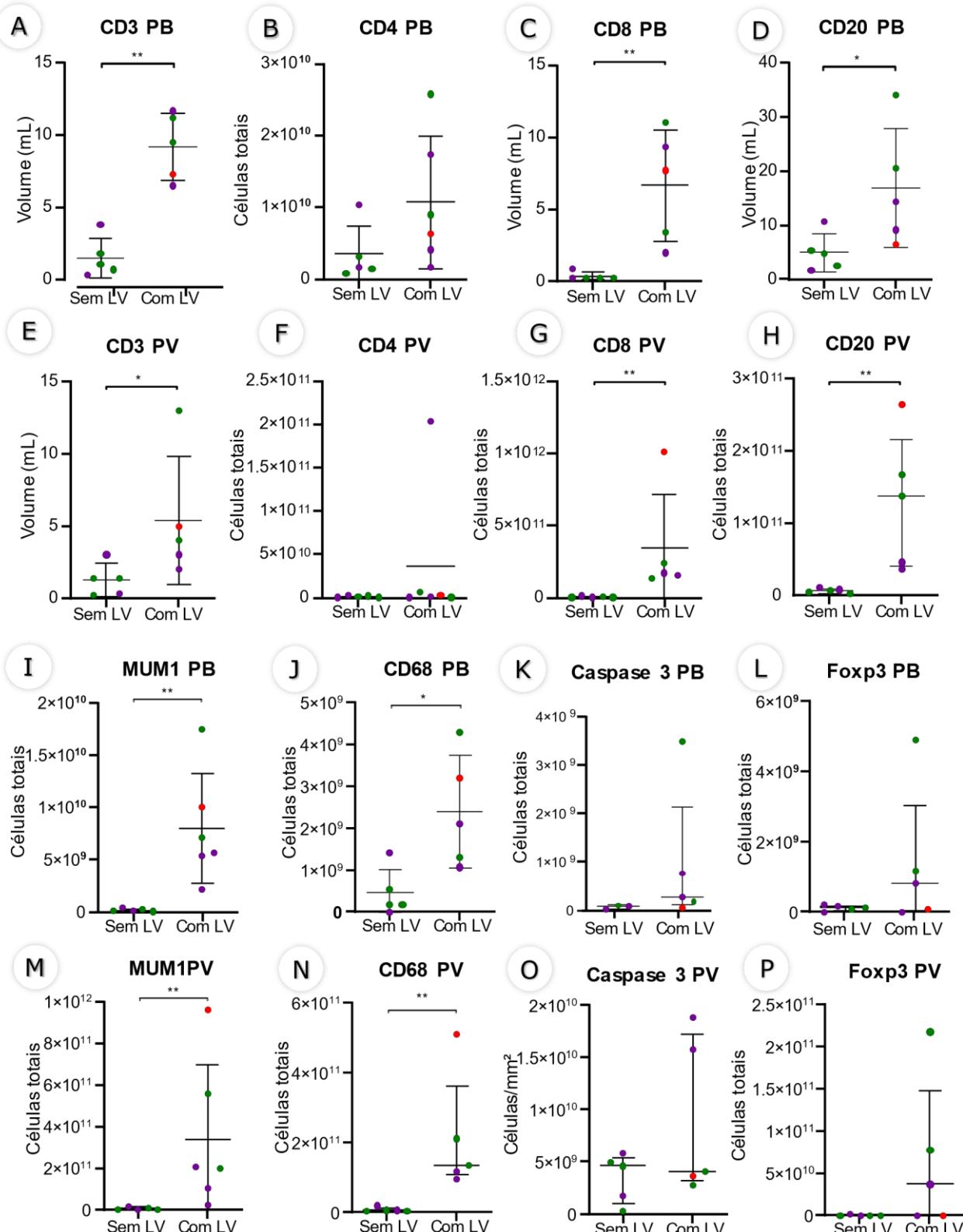


Figura 12 – Avaliação da quantidade absoluta de leucoócitos no baço. Gráficos representam o volume ou a quantidade de células totais de CD3 (A e E), CD4 (B e F), CD8 (C e G), CD20 (D e H), MUM1 (I e M), CD68 (J e N), Caspase 3 (K e O) e Foxp3 (L e P) na PB e PV respectivamente. Note o aumento da quantidade de células CD3, CD8, CD20, MUM1 e CD68 nos pacientes com LV. Os pontos representam os valores de média por paciente. Barras representam a média e o desvio padrão. Ponto verde – Baço do tipo I. Ponto roxo – baço do tipo II. Ponto vermelho – baço do tipo III. * $p < 0,05$, Mann-Whitney. ** - $p < 0,01$, Mann-Whitney.

Fonte: Autor

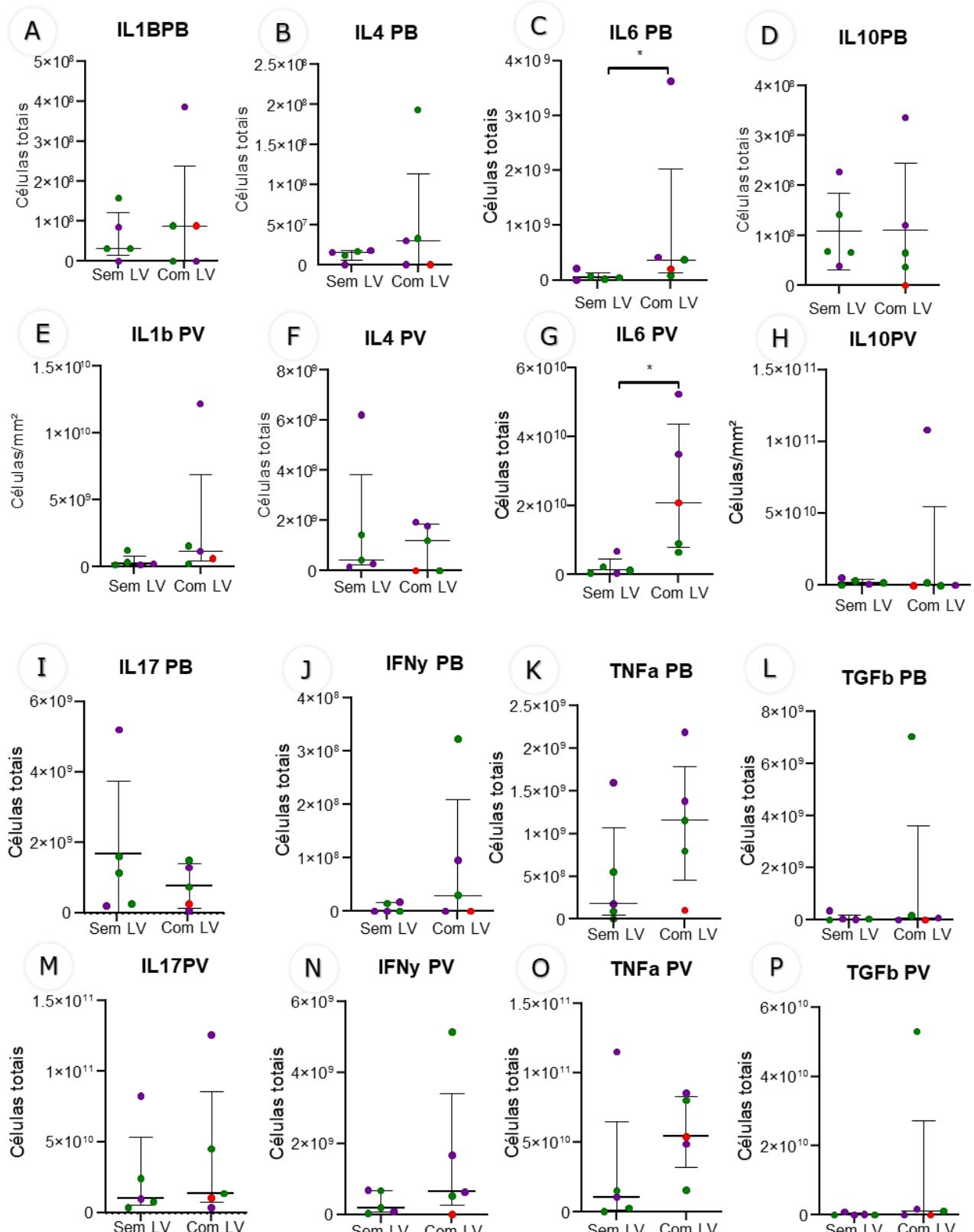


Figura 13 – Avaliação da quantidade absoluta de células produtoras de citocinas no baço. Gráficos representam a quantidade de células totais positivas para IL1B (A e E), IL4 (B e F), IL6 (C e G), IL10 (D e H), IL17 (I e M), IFNy (J e N), TNF α (K e O) e TGF β (L e P) na PB e PV respectivamente. Observar o aumento da quantidade de células IL6 nos pacientes com LV. Os pontos representam os valores de média por paciente. Barras representam a média e o desvio padrão. Ponto verde – Baço do tipo I. Ponto roxo – baço do tipo II. Ponto vermelho – baço do tipo III. * $p < 0,05$, Mann-Whitney. ** - $p < 0,01$, Mann-Whitney.

Fonte: Autor

5.6 Análise integrada

Buscando avaliar integralmente os dados laboratoriais, clínicos e da imunohistoquímica, realizamos uma análise de correlação de Spearman. Essa análise foi realizada tanto com a densidade das diferentes células nos compartimentos (Figura 14), como também com os números absolutos de células positivas na IHQ (Figura 15).

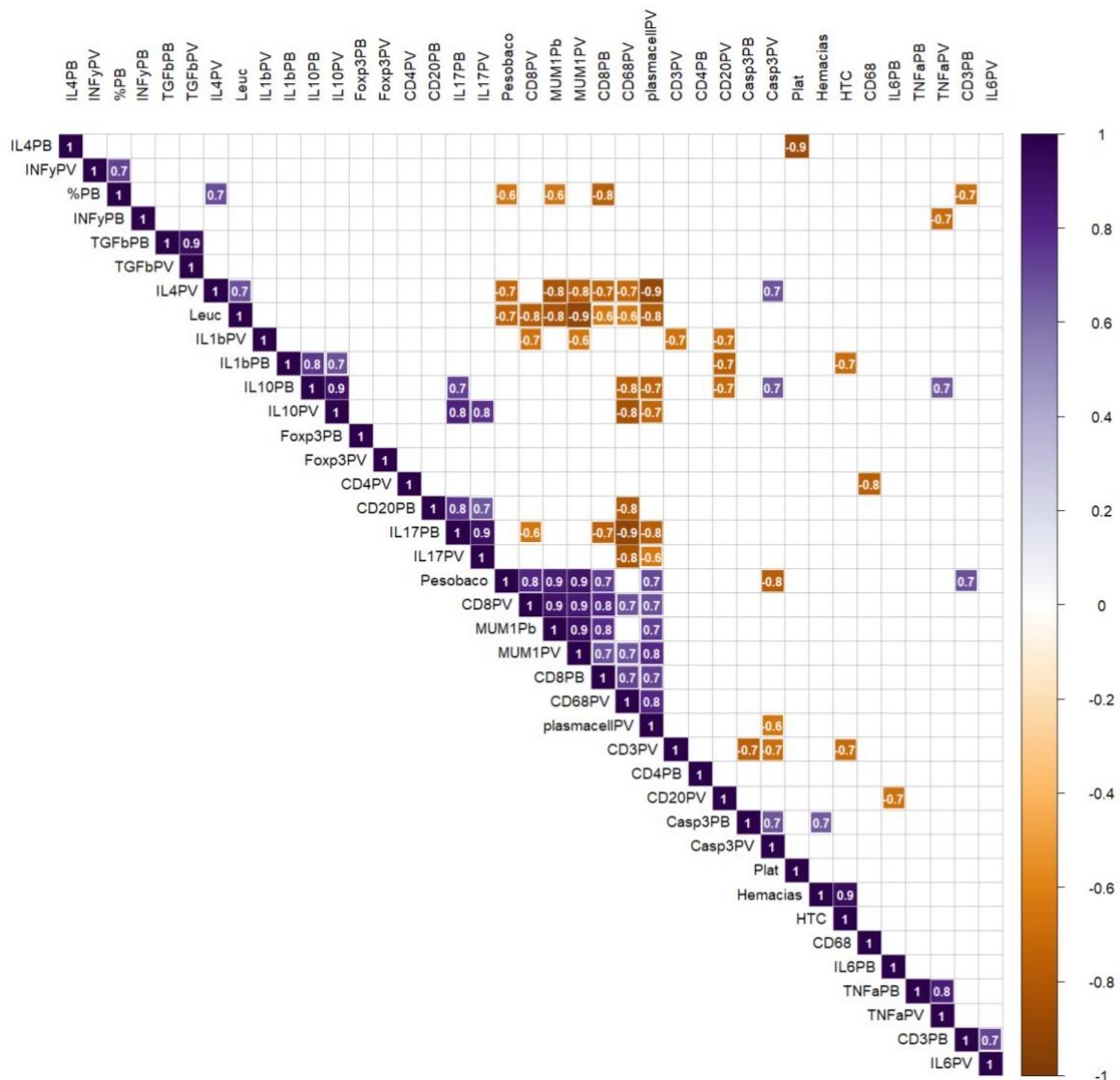


Figura 14 – Correlação da densidade de células, citocinas e parâmetros laboratoriais. No gráfico estão representados apenas os valores de correlação entre cada uma das variáveis que apresentaram valor de $p < 0,05$. Correlação de Spearman; PB- Polpa branca; PV- Polpa vermelha; HTC – hematócrito; Plat – Plaquetas. **Fonte:** Autor

Uma das principais observações é que há correlação negativa entre a contagem de leucócitos circulantes e a densidade de células CD8 e MUM1 na PB e PV, CD68 na PV e com o peso do baço (Figura 14).

Já ao avaliarmos as correlações entre o número absoluto de células positivas na IHQ e os parâmetros clínico-laboratoriais, além da manutenção da correlação negativa entre leucócitos circulantes no sangue e células CD3, CD8, CD20, CD68 e MUM1 positivas no baço, também observamos que há correlação negativa entre a porcentagem de PB esplênica e o número de células positivas para as citocinas IL6 e IL1B na PV (Figura 15)

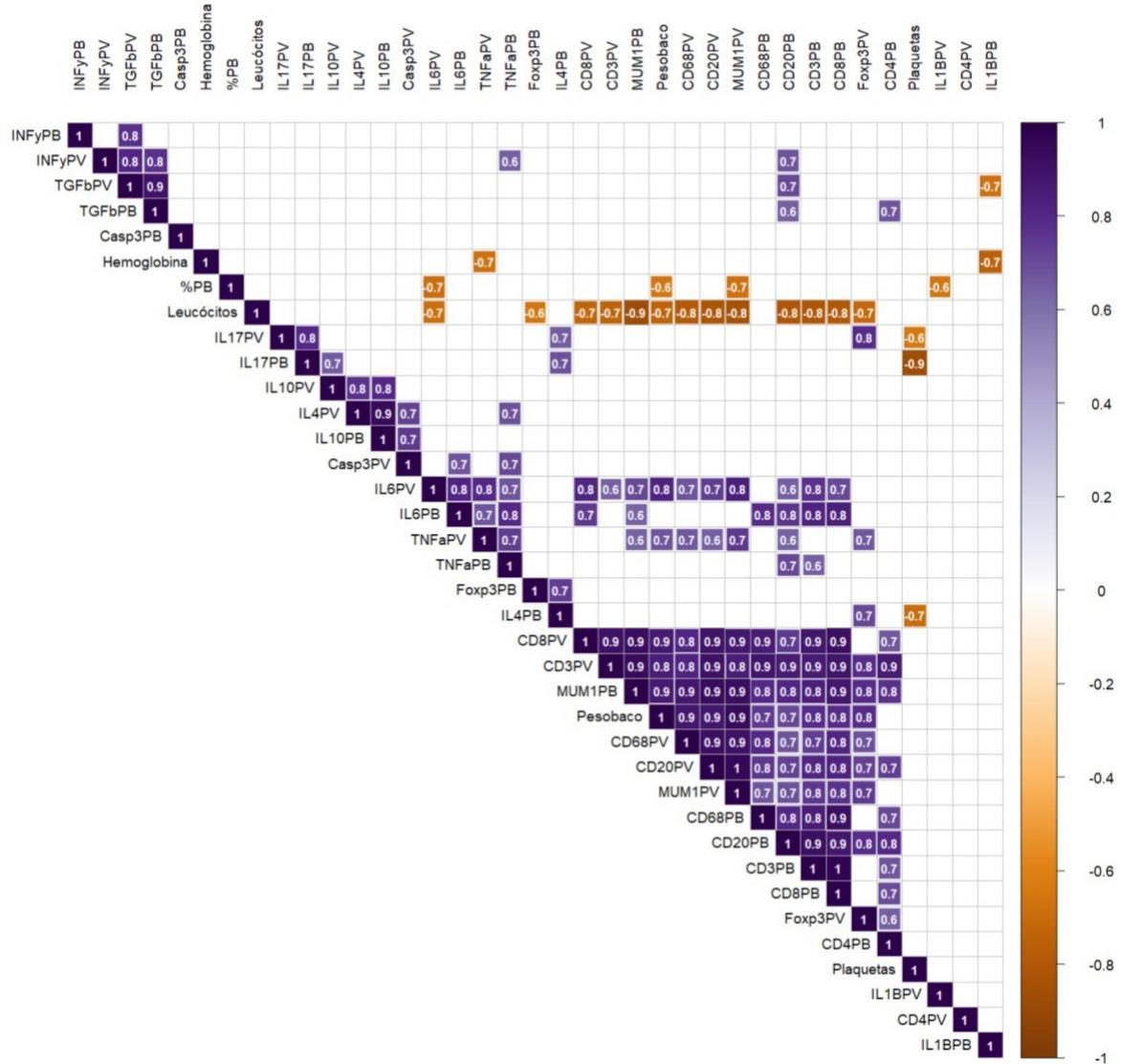


Figura 15 – Correlação da quantidade absoluta de células, citocinas e dos parâmetros laboratoriais. No gráfico estão representados apenas os valores de correlação entre cada uma das variáveis que apresentaram valor $p < 0,05$. Correlação de Spearman. PB- Polpa branca; PV- Polpa vermelha. **Fonte:** Autor

5.7 Avaliação da expressão gênica em pacientes com LV

Para avaliar a expressão gênica dos pacientes com LV e tentar encontrar genes potencialmente envolvidos com a progressão da LV e desorganização do baço, foram utilizados os baços de 3 pacientes (LV1, LV2 e LV3) em um ensaio do sistema de expressão gênica

nCounter (Nanostring Technologies). Os dados foram comparados com dados de expressão gênica de controles históricos obtidos de um banco de dados publicamente disponível.

Dos 590 genes avaliados, foram encontrados 168 genes diferencialmente expressos. Dentre eles estão genes que desempenham papéis essenciais na proliferação de células B e na formação do centro germinativo, por exemplo. Genes regulados positivamente como *BCL10* e *ICOSLG* estavam mais proeminentes nos pacientes LV2 e LV3, enquanto genes como *CCR7* e *RIPK1*, associados respectivamente à migração de células T e à indução de apoptose, exibiram regulação negativa, particularmente nos pacientes LV1 e LV3.

A análise da expressão gênica nos pacientes revelou que havia uma assinatura de expressão diferente entre os pacientes do grupo com LV (LV1, LV2 e LV3) quando comparados com os controles históricos utilizados, demonstrado no heatmap (Figura 16A). Além desse padrão de expressão, ao realizar uma análise não supervisionada de clusterização através da *Principal Component Analysis* (PCA), observamos que o padrão de expressão também diferenciava dentre os pacientes com LV aqueles com baço organizado (LV2 e LV3) daquele com baço desorganizado (LV1) (Figura 16B).

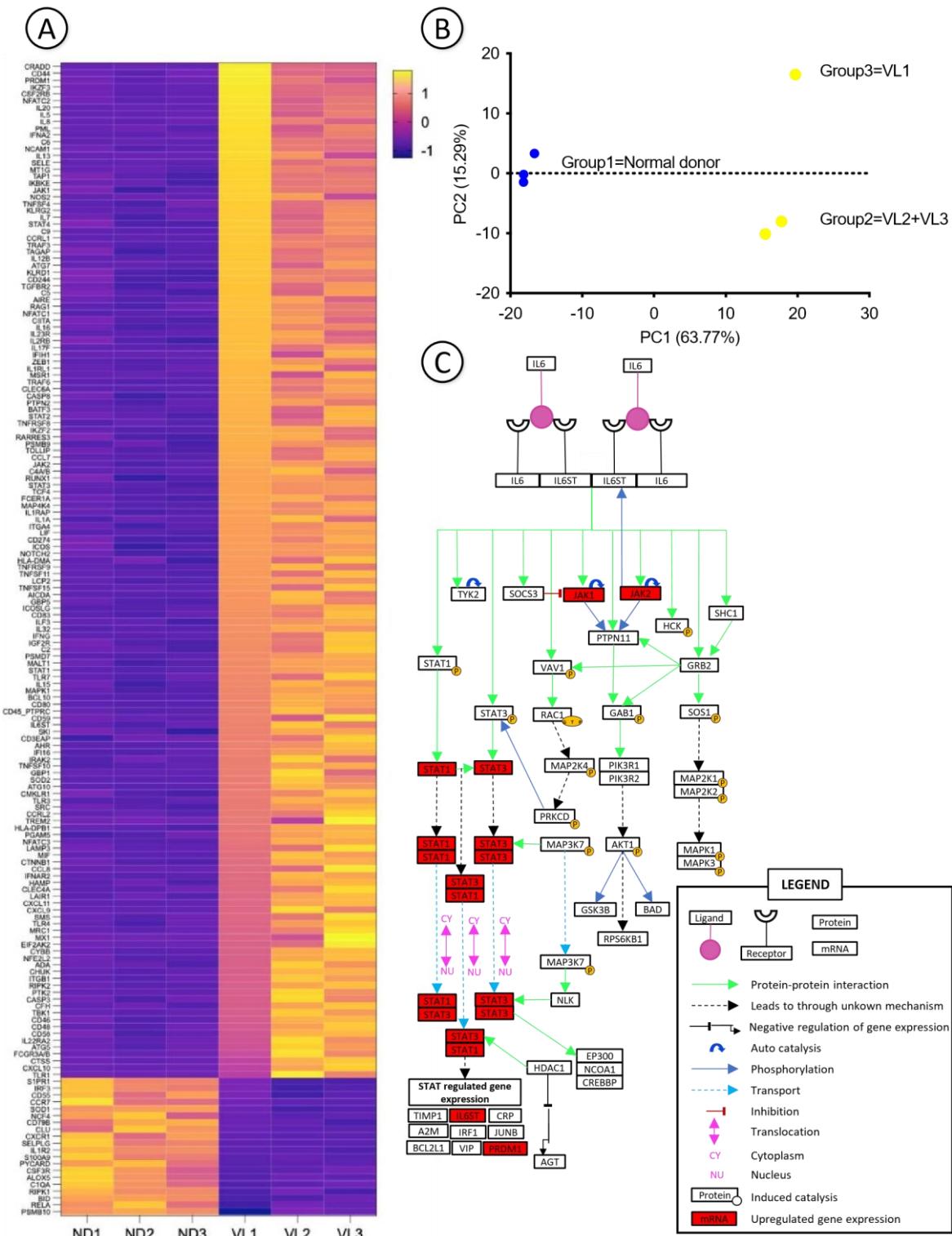


Figura 16 Análise da expressão gênica do baço de pacientes com LV. A) O heatmap demonstra que a assinatura genética difere de pacientes com LV para doadores normais. A barra de escala representa o valor de Log2FC para cada gene. Os dados foram organizados decrescentemente com base na expressão gênica de LV1 B) Gráfico de PCA demonstrando que o perfil genético difere entre os pacientes com LV, agrupando o baço organizado (pacientes LV2 e LV3) separado do baço desorganizado (paciente LV1). Cada ponto representa o valor PCA de cada paciente. Ponto azul – Doador normal; Ponto amarelo – paciente com LV. C) Via de sinalização de IL6 adaptada de Kandasamy e colaboradores (2010). Esta via representa o mecanismo de sinalização da IL6 em humanos, os genes regulados positivamente em pacientes com LV encontrados em nossa análise estão destacados em vermelho, outros genes apresentados neste gráfico não apresentaram alteração de expressão estatisticamente significativa ou não foram analisados em nosso conjunto de dados.

Fonte: (Fontes et al., 2024) (Apêndice A)

Com base nesses genes, foi realizada a análise das vias canônicas que revelou participação das vias de sinalização de: TREM1, HMGB1, iNOS, receptores do tipo Toll, Fator ativador de célula B (BAFF), IL6, APRIL, resposta de fase aguda, resposta de células T helper via CD28 e sinalização através de receptores de padrões de patógenos (PPR), como as 10 principais vias envolvidas, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 – Vias canônicas de sinalização encontradas através da análise dos genes diferencialmente expressos no estudo. Os dados estão organizados por ordem decrescente de Z-score.

Vias canônicas de sinalização	z-score
TREM1 Signaling	4,707
HMGB1 Signaling	3,674
iNOS Signaling	3,500
Toll-like Receptor Signaling	3,500
B Cell Activating Factor Signaling	3,051
IL-6 Signaling	3,000
April Mediated Signaling	2,887
Acute Phase Response Signaling	2,837
CD28 Signaling in T Helper Cells	2,668
Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses	2,558
Colorectal Cancer Metastasis Signaling	2,556
Activation of IRF by Cytosolic Pattern Recognition Receptors	2,500
STAT3 Pathway	2,496
PI3K/AKT Signaling	2,496
IL-17A Signaling in Airway Cells	2,496
Fc \square Receptor-mediated phagocytosis in Macrophages and Monocytes	2,449
VDR/RXR Activation	2,449
PKC \square Signaling in Lymphocytes	2,400
Type I Diabetes Mellitus Signaling	2,400
TGF- \square Signaling	2,333
Ephrin Receptor Signaling	2,333
MIF Regulation of Innate Immunity	2,333
Mouse Embryonic Stem Cell Pluripotency	2,309
RANK Signaling in Osteoclasts	2,309
Interferon Signaling	2,309
Inhibition of Angiogenesis by TSP1	2,236

IL-8 Signaling	2,132
Cholecystokinin/Gastrin-mediated Signaling	2,121
Role of NFAT in Cardiac Hypertrophy	2,111
Calcium Signaling	2,000
Endothelin-1 Signaling	1,941
Agrin Interactions at Neuromuscular Junction	1,890
MIF-mediated Glucocorticoid Regulation	1,890
Inflammasome pathway	1,890
Oncostatin M Signaling	1,890
Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages	1,789
Death Receptor Signaling	1,698
Th2 Pathway	1,671
Cardiac Hypertrophy Signaling	1,667
Role of NANOG in Mammalian Embryonic Stem Cell Pluripotency	1,667
PDGF Signaling	1,667
Pancreatic Adenocarcinoma Signaling	1,667
Regulation of Cellular Mechanics by Calpain Protease	1,633
ERK/MAPK Signaling	1,604
GM-CSF Signaling	1,508
PTEN Signaling	-1,698
PPAR α RXR α Activation	-1,964
RhoGDI Signaling	-2,000
Fc β RIIB Signaling in B Lymphocytes	-2,236
Antioxidant Action of Vitamin C	-2,887

Fonte: Autor

Dentre as vias identificadas, observamos que a via de sinalização de IL6 possuía muitos dos genes envolvidos, como JAK1, JAK2, STAT1, STAT3, IL6ST e PRDM1, superexpressos nos pacientes com LV, indicando a potencial participação dessa via na progressão da LV (Figura 16C). Outros achados relacionados às análises gênicas, como estratificação por pacientes com e sem HIV, foram avaliados no artigo do Anexo A.

6 DISCUSSÃO

Nesse trabalho nos propomos a avaliar as alterações histológicas e gênicas do baço, assim como relacionar essas alterações aos achados clínicos e laboratoriais de 6 pacientes com LV recidivante. Com isso, observamos que os pacientes com LV apresentam diferentes tipos de baço, com alterações na organização leucocitária e distribuição de citocinas na PB e PV, e que essas alterações esplênicas se correlacionam com os aspectos laboratoriais dos pacientes.

Dentre os pacientes analisados, observamos que há diferentes tipos de organização esplênica, entretanto, apenas no grupo com LV identificamos presença de baço do tipo III. Apesar de não haver informações a respeito da frequência de baços desorganizados entre seres humanos que não foram à óbito por LV, em estudos com cães naturalmente infectados estimase que 24% dos casos apresentem desorganização (Santana et al., 2008), enquanto todos os seres humanos que foram à óbito em decorrência da LV apresentaram algum grau de desorganização da PB (Almeida, 2019).

A fenotipagem dos leucócitos no baço nos permitiu avaliar a distribuição dos linfócitos T (CD3, CD4 e CD8) e Treg, linfócitos B, plasmócitos, macrófagos e células apoptóticas nas diferentes regiões esplênicas. Nos pacientes com LV verificamos intensa plasmocitose na PV e PB do baço, além de maior densidade de macrófagos na PV, conforme observado por outros estudos em animais e seres humanos com LV (Carrión et al., 2006; Melo et al., 2020; SilvaO'Hare et al., 2016; Veress et al., 1977).

Ainda que não tenhamos observado alterações na densidade de células CD3 e CD20 ocupando a PB e PV, houve redução na razão entre CD20/CD3 na PB, que se dá primariamente em função da redução da área ocupada por CD20 nos folículos linfoides e predomínio de CD3 nas áreas remanescentes de PALS. Esta pode ser uma das principais características da desorganização observada durante a LV, em que há perda do folículo linfoide e manutenção da área de PALS (Hermida et al., 2018), entretanto, devido ao número reduzido de pacientes com desorganização esplênica presente em nosso estudo, esta hipótese não pôde ser validada.

Como um dos mecanismos de ativação das células B é através da interação com Linfócitos T helper na borda entre a PALS e folículo linfoide (Lewis; Williams; Eisenbarth, 2019), é possível que a alteração na relação entre Linfócitos T e B observada em nosso estudo possa comprometer a ativação dos linfócitos B nos folículos. Em trabalhos anteriores já foram relatadas alterações na população de células B no baço, com redução dessas no folículo e acúmulo de células B e plasmócitos na PV (Silva et al., 2012; Silva-Barrios; Charpentier;

Stäger, 2018; Silva-O'Hare et al., 2016). Esses achados se relacionam com o aumento da densidade de plasmócitos observada na PV e PB dos pacientes com LV.

Os mecanismos pelos quais os plasmócitos se acumulam no baço de pacientes com LV ainda não foram esclarecidos, entretanto postula-se que: 1- há ativação policlonal de linfócitos B induzida por抗ígenos do parasito (Deak et al., 2010; Silva-Barrios; Charpentier; Stäger, 2018); 2- há aumento da expressão de fatores de sobrevivência para os plasmócitos na PV como BAFF e APRIL (Goto et al., 2014; Omachi et al., 2017; Silva-O'Hare et al., 2016). Em nosso estudo, não observamos aumento da expressão de BAFF ou APRIL, entretanto as vias canônicas envolvidas com a sinalização dessas moléculas aparecem superreguladas.

Na análise da expressão gênica, o gene *IFNG* apresentou-se super expresso nos pacientes com LV, sobretudo no paciente com baço organizado. Apesar disso, na análise de IHQ não houve diferença na densidade de células IFN \square + quando comparados os grupos com e sem LV. Nem sempre é possível observar a correlação entre os níveis de mRNA na expressão gênica e quantidade da proteína no tecido, e isso pode ser tanto por mudanças pós-translacionais como limitações metodológicas do estudo (Buccitelli; Selbach, 2020).

Sabe-se que a citocina IFN \square induz a ativação de macrófagos e ativa a capacidade de destruição do parasito (Blackwell; Fakiola; Singh, 2020; Romano et al., 2021), porém, mesmo com elevação sérica de IFN \square , a atividade dessa citocina em pacientes com LV ativa está reduzida, o que colabora para a sobrevivência do parasito e progressão da enfermidade (Caldas et al., 2005; Hailu et al., 2004; Kumar et al., 2019).

Além disso, o maior número de células TGF \square + e Treg foi observado nos pacientes com LV e baço organizado. Segundo a literatura, a expressão de Foxp3 por linfócitos Treg é induzida pela ação da TGF \square (Marie et al., 2005) e a ação de citocinas regulatórias favorece a sobrevivência dos parasitos (Chowdhury et al., 2015; Ghosh et al., 2021), desta forma, é possível que a atividade regulatória nesses pacientes com LV recidivante suprima a ação de IFN \square , tornando o baço um ambiente propício para a replicação e sobrevivência do parasito.

Embora alguns trabalhos relacionem a elevação de IL10 com a progressão da doença e aumento da carga parasitária (Costa et al., 2012; Moulik et al., 2021; Samant et al., 2021b), não observamos alterações na distribuição de IL10 entre os pacientes. Medrano et al. (2001), através da avaliação sérica de citocinas em pacientes coinfetados LV-HIV, demonstraram que havia redução na quantidade de IL10 circulante quando comparados à pacientes só com LV. Cinco dos seis pacientes com LV em nosso estudo apresentam coinfecção com o vírus HIV, e apesar

de estarem com a carga viral indetectável no momento da esplenectomia, não podemos descartar a hipótese de que as alterações em virtude da coinfeção persistam mesmo após o tratamento.

Além das alterações nas relações e densidade celulares, os pacientes com LV também apresentam baços maiores, que pode ter impactos sistêmicos importantes. Pensando nisso, propomos aqui um método analítico que também leva em consideração o tamanho e peso do órgão nesses pacientes. Com isso, pudemos observar que nesses pacientes há um aumento global importante no número de leucócitos (Linfócitos T, B, plasmócitos e macrófagos) e de IL6 presentes no baço dos pacientes.

Essa observação confirma o que foi identificado nas análises de expressão gênica, em que uma das vias canônicas com alta expressão foi a via de sinalização por IL6 (elevação da expressão de genes como *JAK1*, *JAK2*, *STAT1*, *STAT3*, *IL6ST* e *PRDM1*). A produção e secreção de IL6 é induzida a partir da interação de patógenos com receptores do tipo TLR presentes na membrana de macrófagos, e essa citocina age na ativação e proliferação de células como linfócitos B, por exemplo (Verboogen et al., 2019). Neste trabalho, a via de sinalização por TLR estava superativada em pacientes com LV, também observamos correlação positiva entre a quantidade de células IL6+ na PB e PV do baço com a quantidade de macrófagos e linfócitos B, confirmando os achados da expressão gênica.

Em contrapartida, há correlação negativa entre a quantidade de IL6+ na PV e a quantidade de PB dos pacientes, sugerindo que essa citocina possa estar envolvida com a redução da área de PB observada nos pacientes com LV. Para mais, os estudos acerca das citocinas e LV têm demonstrado que a IL6 é um importante marcador de gravidade, e elevados níveis séricos dessa citocina se correlacionam com maior risco de morte dos pacientes (Dos Santos et al., 2016). Além disso, a redução dos níveis séricos dessa citocina é utilizada como parâmetro avaliativo da eficácia do tratamento. Todos os nossos pacientes com LV apresentaram falha terapêutica e recidivas, o que pode sugerir a participação da IL6 nesse processo.

Um dos resultados da sinalização por IL6 é o aumento da expressão do gene *PRDM1*, que além de induzir a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, também é altamente expresso em linfócitos T com fenótipo de exaustão (Cretney et al., 2011; Fu et al., 2017). A exaustão do sistema imune tem sido recorrentemente associada aos pacientes com LV, contribuindo para a progressão da enfermidade, sobretudo nos pacientes LV-HIV infectados (Costa-Madeira et al., 2022; De Souza et al., 2019; Takele et al., 2022a; Vallejo et al., 2015). A hipótese da exaustão de células T pode ser verificada em nosso estudo através da elevação da expressão dos genes de *PRDM1*, *CD274 (PD-L1)* e *CD44* em pacientes com LV. Além disso,

no baço desorganizado não foram observadas citocinas como IL4, IL10, TGF β e IFN γ , sugerindo um estágio de anergia de resposta imune nesse paciente.

Ao corrigirmos a quantidade de células pelo volume total do baço, pudemos observar que nos pacientes com LV havia aumento da quantidade de linfócitos T, B e macrófagos no baço. Ao correlacionarmos esses achados com os achados laboratoriais, observamos que há correlação negativa entre a quantidade de leucócitos circulantes no sangue e a quantidade de leucócitos esplênicos. É possível que essa alteração se dê em função do hiperesplenismo, condição frequente em pacientes com LV grave. Nessa condição, há retenção de leucócitos do sangue periférico no baço, culminando com o aparecimento de leucopenia, assim como anemia e trombocitopenia (Dutra et al., 2012; Varma; Naseem, 2010).

Uma das principais limitações do estudo é a dificuldade de obtenção de espécimes de baço de pacientes sem doenças infecciosas. Aqui, utilizamos baços oriundos de pacientes que sofreram algum tipo de trauma, como perfuração por armas de fogo ou ruptura por trauma mecânico (quedas e acidentes automobilísticos). Nesses casos, é possível observar o aumento no número de células e citocinas de fase aguda da inflamação (Goodman et al., 2008; Volpin et al., 2014), muitas vezes relacionado ao risco de sepse.

De fato, observamos que nesses pacientes sem LV havia aumento da densidade de IL17 na PB e tendência a maior frequência de neutrófilos na PV, além disso, também apresentaram leucocitose periférica. Como a citocina IL17 está envolvida na ativação neutrofílica à resposta contra bactérias extracelulares, induzindo células do endotélio vascular na secreção de outros mediadores pró-inflamatórios como IL1b e TNF (LIU et al., 2016), é possível que esse mecanismo esteja presente nos pacientes sem LV, mascarando os valores de IL17 nos pacientes com LV.

Apesar no número amostral reduzido, pudemos observar que os pacientes com LV apresentam diferentes tipos de resposta imune durante a enfermidade, que pode ser entendido como: 1- Pacientes com o baço organizado apresentam padrão de misto de resposta Th1/Th2, com expressão de citocinas como IFN γ e TGF β ; 2- A medida em que ocorre algum grau de desorganização esplênica, há elevação da citocina IL6, culminando com proliferação de linfócitos B e acúmulo de plasmócitos no órgão; 3- Estabelecimento da desorganização do baço e estado de exaustão da resposta imune com ausência da produção de citocinas.

Para mais, esse é um dos poucos trabalhos que utilizam amostras de baço de seres humanos com LV e sem LV, que se propõe a estudar *in situ* as alterações leucocitárias e de citocinas, possibilitando o melhor entendimento da patogênese da doença nesse órgão para além dos modelos experimentais.

7 CONCLUSÕES

- 1- Pacientes com LV recidivante apresentam desorganização do baço, entretanto, não há redução do número de leucócitos esplênicos, mas reorganização dessas células no órgão.
- 2- Pacientes com LV recidivante apresentam acúmulo de macrófagos e plasmócitos no baço e redução de apoptose.
- 3- Na LV recidivante há maior expressão de genes relacionados à proliferação de linfócitos (BCL10 e ICOSLG) e há redução da expressão de genes relacionados à migração e apoptose de linfócitos (RIPK1 e CCR7) no baço;
- 4- A via de sinalização de IL6 está envolvida na desorganização do baço;

Diante do que foi descrito, pudemos observar que há alteração da relação entre os leucócitos na PB e PV do baço de pacientes com LV, principalmente entre linfócitos T CD3+ e T CD20+, e que essa alteração da relação pode comprometer a formação de resposta imune efetiva anti-*Leishmania*, contribuindo para a progressão da LV.

Observamos também a participação da via de sinalização por IL6, que ao se correlacionar negativamente com a porcentagem de polpa branca, pode ser uma citocina que nos permita avaliar a PB remanescente no órgão e possivelmente servir para avaliar o nível de organização esplênica. Entretanto, o N reduzido é um fator limitante para eventuais conclusões.

Além disso, é possível que a exaustão do sistema imune comprometa a resposta no paciente com o baço desorganizado, pois há aumento da expressão de *PRDM1*, *PD-L1* e *CD44* nesse paciente.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRINO-DE-OLIVEIRA, P. et al. HIV/AIDS-associated visceral leishmaniasis in patients from an endemic area in Central-west Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 5, p. 692–697, ago. 2010.

ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W. HTSeq—a Python framework to work with highthroughput sequencing data. **Bioinformatics**, v. 31, n. 2, p. 166–169, 15 jan. 2015.

BLACKWELL, J. M.; FAKIOLA, M.; SINGH, O. P. Genetics, Transcriptomics and MetaTaxonomics in Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 25 nov. 2020.

BRASIL. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1^a ed. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2014. v. I

BRASIL. **Situação Epidemiológica da Leishmaniose Visceral**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/situacaoepidemiologica-da-leishmaniose-visceral>>. Acesso em: 30 ago. 2022.

BUCCITELLI, C.; SELBACH, M. mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. **Nature Reviews Genetics**, v. 21, n. 10, p. 630–644, 24 out. 2020.

BURZA, S. et al. Risk Factors for Visceral Leishmaniasis Relapse in Immunocompetent Patients following Treatment with 20 mg/kg Liposomal Amphotericin B (Ambisome) in Bihar, India. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. e2536, 2 jan. 2014.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. **Leishmaniasis**. The LancetLancet Publishing Group, , 15 set. 2018.

CALDAS, A. et al. Balance of IL-10 and interferon- γ plasma levels in human visceral leishmaniasis: Implications in the pathogenesis. **BMC Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 19 dez. 2005.

CAMPOS, M. A. G. et al. Is splenectomy an option for multiple relapses in a child with visceral leishmaniasis? A case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, 2021.

CARRIÓN, J. et al. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 5, p. 173–183, 10 maio 2006.

CESTA, M. F. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. **Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 5, p. 455–465, 25 ago. 2006.

CHADBURN, A. The spleen: Anatomy and anatomical function. **Seminars in Hematology**, v. 37, p. 13–21, jan. 2000.

CHOWDHURY, B. P. et al. Immunomodulation of host-protective immune response by regulating Foxp3 expression and Treg function in *Leishmania*-infected BALB/c mice: critical role of IRF1. **Pathogens and Disease**, v. 73, n. 8, p. ftv063, nov. 2015.

COSTA, A. S. A. et al. Cytokines and visceral leishmaniasis: a comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 735–739, set. 2012.

COSTA, C. H. N. et al. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 386–392, 2010.

COSTA-MADEIRA, J. C. et al. T Lymphocyte Exhaustion During Human and Experimental Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 2 maio 2022.

CRETNEY, E. et al. The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. **Nature Immunology**, v. 12, n. 4, p. 304–311, 6 abr. 2011.

DA SILVA SANTANA CRUZ, C. et al. **Factors associated with human visceral leishmaniasis cases during urban epidemics in Brazil: A systematic review.** *Parasitology* Cambridge University Press, , 1 maio 2021.

DA SILVA, T. A. M. et al. Prognostic factors associated with death from visceral leishmaniasis: a case-control study in Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 114, n. 5, p. 346–354, 7 maio 2020.

DAVID SIBLEY, L. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. **Immunological Reviews**, v. 240, n. 1, p. 72–91, mar. 2011.

DAYAKAR, A. et al. **Cytokines: Key determinants of resistance or disease progression in visceral leishmaniasis: Opportunities for novel diagnostics and immunotherapy.** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 2019.

DE ARAÚJO, V. E. M. et al. Early Clinical Manifestations Associated with Death from Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, p. e1511, 7 fev. 2012.

DE MELO, C. V. B. et al. Splenic Transcriptional Responses in Severe Visceral Leishmaniasis: Impaired Leukocyte Chemotaxis and Cell Cycle Arrest. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 5 nov. 2021.

DE SOUZA, T. L. et al. Pro-Cellular Exhaustion Markers are Associated with Splenic Microarchitecture Disorganization and Parasite Load in Dogs with Visceral Leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

DEAK, E. et al. Murine visceral leishmaniasis: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 5, p. 1355–1368, 29 maio 2010.

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

DOS SANTOS, P. L. et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004375, 27 jan. 2016.

DOS-SANTOS, W. L. et al. A case of conventional treatment failure in visceral leishmaniasis: leukocyte distribution and cytokine expression in splenic compartments. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 491, 9 dez. 2014.

DUTRA, R. A. et al. Splenectomy in a patient with treatment-resistant visceral leishmaniasis: a case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 130–131, fev. 2012.

ENDRIS, M. et al. Characteristics of bacterial sepsis among patients with visceral leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 11, p. 871–875, nov. 2014.

FERNÁNDEZ-GUERRERO, M. L. et al. Visceral leishmaniasis in immunocompromised patients with and without AIDS: a comparison of clinical features and prognosis. **Acta Tropica**, v. 90, n. 1, p. 11–16, mar. 2004.

FU, S.-H. et al. New insights into Blimp-1 in T lymphocytes: a divergent regulator of cell destiny and effector function. **Journal of Biomedical Science**, v. 24, n. 1, p. 49, 21 dez. 2017.

GARG, R. et al. Leishmania infantum amastigotes enhance HIV-1 production in cocultures of human dendritic cells and CD4 T cells by inducing secretion of IL-6 and TNF-alpha. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 5, 2009.

GHOSH, S. et al. Cytokines in the generation and function of regulatory T cell subsets in leishmaniasis. **Cytokine**, v. 147, p. 155266, nov. 2021.

GOODMAN, J. C. et al. Pro-inflammatory and pro-apoptotic elements of the neuroinflammatory response are activated in traumatic brain injury. Em: [s.l: s.n.]. p. 437–439.

GORSKI, S. et al. Visceral Leishmaniasis Relapse in Southern Sudan (1999–2007): A Retrospective Study of Risk Factors and Trends. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, p. e705, 8 jun. 2010.

GOTO, Y. et al. Short report: Elevation of serum B-cell activating factor levels during visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 5, p. 912–914, 2014.

GUEDESID, D. L. et al. Comparison of serum cytokine levels in symptomatic and asymptomatic HIV-Leishmania coinfected individuals from a Brazilian visceral leishmaniasis endemic area. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 6, p. e0010542, 1 jun. 2022.

HAILU, A. et al. **ELEVATED PLASMA LEVELS OF INTERFERON (IFN)-, IFNINDUCING CYTOKINES, AND IFN-INDUCIBLE CXC CHEMOKINES IN VISCERAL LEISHMANIASIS.** [s.l: s.n.].

HENN, G. A. DE L. et al. Is Visceral Leishmaniasis the same in HIV-coinfected adults? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 2, p. 92–98, 1 mar. 2018.

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

KRAUS, M. D. Splenic histology and histopathology: An update. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 20, n. 2, p. 84–93, 2003.

KUMAR, P. et al. Prophylactic interferon- γ and interleukin-17 facilitate parasite clearance in experimental visceral leishmaniasis. **Tropical Parasitology**, v. 9, n. 1, p. 30, 1 jan. 2019.

KUROTAKI, D.; UEDE, T.; TAMURA, T. Functions and development of red pulp macrophages. **Microbiology and Immunology**, v. 59, n. 2, p. 55–62, fev. 2015.

LAURENTI, M. D. et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit Leishmania (Leishmania) infantum chagasi to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3–4, p. 296–300, set. 2013.

LEKIC, N. et al. Splenectomy for Visceral Leishmaniasis Out of an Endemic Region: A Case Report and Literature Review. **Medicina**, v. 58, n. 2, p. 184, 26 jan. 2022.

LEWIS, S. M.; WILLIAMS, A.; EISENBARTH, S. C. Structure and function of the immune system in the spleen. **Science Immunology**, v. 4, n. 33, 22 mar. 2019.

LIMA, I. S. et al. Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

LINDOSO, J. A. L. et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. **HIV/AIDS (Auckland, N.Z.)**, v. 10, p. 193, 2018.

LIU, R. et al. IL-17 Promotes Neutrophil-Mediated Immunity by Activating Microvascular Pericytes and Not Endothelium. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 6, p. 2400–2408, 15 set. 2016.

LONSDALE, J. et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. **Nature Genetics**, v. 45, n. 6, p. 580–585, 29 jun. 2013.

MACLENNAN, I. C. M. Germinal Centers. **Annual Review of Immunology**, v. 12, n. 1, p. 117–139, abr. 1994.

MAIA, C. et al. Experimental Transmission of Leishmania infantum by Two Major Vectors: A Comparison between a Viscerotropic and a Dermotropic Strain. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 6, p. e1181, 14 jun. 2011.

MAKSoud, S. et al. Leishmania donovani and HIV co-infection in vitro: Identification and characterization of main molecular players. **Acta Tropica**, v. 228, p. 106248, 1 abr. 2022.

MANNAN, S. BIN et al. Prevalence and associated factors of asymptomatic leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis. **Parasitology International**, v. 81, p. 102229, abr. 2021.

MARCO ANTÔNIO CARDOSO DE ALMEIDA. **Caracterização histopatológica de casos fatais de Leishmaniose Visceral Humana: Estudo caso-controle de Necropsias.** Tese (Doutorado)—Salvador: Universidade Federal da Bahia, 2019.

MARIE, J. C. et al. TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 7, p. 1061–1067, 4 abr. 2005.

MAURYA, R. et al. Brief Definitive Report: Human visceral leishmaniasis is not associated with expansion or accumulation of Foxp3+ CD4 cells in blood or spleen. **Parasite Immunology**, v. 32, n. 7, p. 479–483, 19 mar. 2010.

MCKENZIE, C. V. et al. Splenomegaly: Pathophysiological bases and therapeutic options. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 94, p. 40–43, jan. 2018.

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. **Structure and function of the spleen.** **Nature Reviews Immunology**, ago. 2005.

MEDRANO, F. J. et al. Dynamics of serum cytokines in patients with visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 114, n. 3, p. 403–407, 25 dez. 2001.

MELO, C. V. B. DE et al. Phenotypical Characterization of Spleen Remodeling in Murine Experimental Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. April, p. 1–13, 2020.

MICHALICK, M. S. M.; RIBEIRO, R. R.; DA SILVA, S. M. Leishmaniose Visceral Americana. Em: NEVES, D. P. (Ed.). **Parasitologia Humana**. 13. ed. São Paulo: Atheneu, 2016. v. I. p. 69–90.

MONTES DE OCA, M.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Cytokines and splenic remodelling during Leishmania donovani infection. **Cytokine: X**, v. 2, n. 4, p. 100036, dez. 2020.

MOULIK, S. et al. Status of IL-4 and IL-10 driven markers in experimental models of Visceral Leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 43, n. 1, p. e12783, 1 jan. 2021.

NAGELKERKE, S. Q. et al. Red pulp macrophages in the human spleen are a distinct cell population with a unique expression of Fc- γ receptors. **Blood Advances**, v. 2, n. 8, p. 941–953, 24 abr. 2018.

NASCIMENTO, E. T. et al. The emergence of concurrent HIV-1/AIDS and visceral leishmaniasis in Northeast Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 5, p. 298–300, maio 2011.

NYLÉN, S. et al. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 4, p. 805–817, 16 abr. 2007.

OHL, L. et al. Chemokines as organizers of primary and secondary lymphoid organs. **Seminars in Immunology**, v. 15, n. 5, p. 249–255, out. 2003.

OMACHI, S. et al. B-cell activating factor deficiency suppresses splenomegaly during *Leishmania donovani* infection. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 489, n. 4, p. 528–533, 2017.

PELISSARI, D. M. et al. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 107–110, mar. 2011.

PEREZ, O. A. et al. CD169⁺ macrophages orchestrate innate immune responses by regulating bacterial localization in the spleen. **Science Immunology**, v. 2, n. 16, 13 out. 2017.

PINTADO, V. et al. Visceral Leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected and Non-HIV-Infected Patients: A Comparative Study. **Medicine**, v. 80, n. 1, 2001.

PRATA, A.; SILVA, L. A. Calazar. Em: COURA, J. R. (Ed.). **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. v. I. p. 713–732.

QUEIROZ, M. J. A.; ALVES, J. G. B.; CORREIA, J. B. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 2, p. 141–146, abr. 2004.

RAI, A. K. et al. Regulatory T cells suppress T cell activation at the pathologic site of human visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 8 fev. 2012.

REBOUÇAS, A. et al. Leishmania-Induced Dendritic Cell Migration and Its Potential Contribution to Parasite Dissemination. **Microorganisms**, v. 9, n. 6, p. 1268, 11 jun. 2021.

REDMOND, H. P. et al. Surgical anatomy of the human spleen. **British Journal of Surgery**, v. 76, n. 2, p. 198–201, 7 dez. 2005.

REINALDO, L. G. C. et al. Splenectomy in Patients with Visceral Leishmaniasis Resistant to Conventional Therapy and Secondary Prophylaxis: A Retrospective Cohort. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 2, p. 342–348, 17 ago. 2022.

REIS, L. L. DOS et al. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, set. 2017.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. **The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection**. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, 2012.

ROCHA, M. I. et al. *Leishmania infantum* Enhances Migration of Macrophages via a Phosphoinositide 3-Kinase Í-Dependent Pathway. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 7, p. 1643–1649, 10 jul. 2020.

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**, v. 124, n. 5, p. 495–507, 5 maio 2002.

ROMANO, A. et al. Interferon- γ -Producing CD4+ T Cells Drive Monocyte Activation in the Bone Marrow During Experimental *Leishmania donovani* Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 7 set. 2021.

SAMANT, M. et al. Role of Cytokines in Experimental and Human Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 18 fev. 2021a.

SAMANT, M. et al. Role of Cytokines in Experimental and Human Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 18 fev. 2021b.

SANTANA, C. C. et al. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. **Parasite Immunology**, v. 30, n. 10, p. 515–524, 2008.

SAPORITO, L. et al. Visceral leishmaniasis: host–parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. e572–e576, ago. 2013.

SHARMA, U.; SINGH, S. **Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control** [Vector Borne Dis. [s.l: s.n.].

SILVA, J. S. et al. Low CXCL13 expression, splenic lymphoid tissue atrophy and germinal center disruption in severe canine visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, 2012.

SILVA-BARRIOS, S.; CHARPENTIER, T.; STÄGER, S. The Deadly Dance of B Cells with Trypanosomatids. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 155–171, 2018.

SILVA-O'HARE, J. et al. Disruption of splenic lymphoid tissue and plasmacytosis in canine visceral leishmaniasis: Changes in homing and survival of plasma cells. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–17, 2016.

SINGH, N. et al. Peripheral Blood Monocytes With an Antiinflammatory Phenotype Display Limited Phagocytosis and Oxidative Burst in Patients With Visceral Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 218, n. 7, 24 ago. 2018.

SMEDLEY, D. et al. BioMart – biological queries made easy. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 22, 14 dez. 2009.

SMELT, S. C. et al. Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 158, n. 8, p. 3813–21, 15 abr. 1997.

STEINIGER, B.; RÜTTINGER, L.; BARTH, P. J. The Three-dimensional Structure of Human Splenic White Pulp Compartments. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 51, n. 5, p. 655–663, 26 maio 2003.

STEINIGER, B. S. Human spleen microanatomy: Why mice do not suffice. **Immunology**, v. 145, n. 3, p. 334–346, 2015.

STINGL, J. et al. Morphology and some biomechanical properties of human liver and spleen. **Surgical and Radiologic Anatomy**, v. 24, n. 5, p. 285–289, dez. 2002.

TAKELE, Y. et al. Immunological factors, but not clinical features, predict visceral leishmaniasis relapse in patients co-infected with HIV. **Cell Reports Medicine**, v. 3, n. 1, p. 100487, jan. 2022a.

TAKELE, Y. et al. Immunological factors, but not clinical features, predict visceral leishmaniasis relapse in patients co-infected with HIV. **Cell Reports Medicine**, v. 3, n. 1, p. 100487, 18 jan. 2022b.

VALLEJO, A. et al. High levels of CD4⁺ CTLA-4⁺ Treg cells and CCR5 density in HIV-1 infected patients with visceral leishmaniasis. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 267–275, 1 fev. 2015.

VARMA, N.; NASEEM, S. Hematologic Changes in Visceral Leishmaniasis/Kala Azar. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion** 2010 26:3, v. 26, n. 3, p. 78–82, 30 set. 2010.

VERBOOGEN, D. R. J. et al. Interleukin-6 secretion is limited by self-signaling in endosomes. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 2, p. 144–157, 1 fev. 2019.

VERESS, B. et al. Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. **Immunology**, v. 33, n. 5, p. 605–10, nov. 1977.

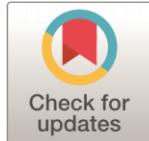
VIANA, A. G. et al. Infection of Human Monocytes with Leishmania infantum Strains Induces a Downmodulated Response when Compared with Infection with Leishmania braziliensis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 8 jan. 2018.

VOLPEDO, G. et al. **Determinants of Innate Immunity in Visceral Leishmaniasis and Their Implication in Vaccine Development**. **Frontiers in Immunology**Frontiers Media S.A., 12 out. 2021.

VOLPIN, G. et al. Cytokine levels (IL-4, IL-6, IL-8 and TGF β) as potential biomarkers of systemic inflammatory response in trauma patients. **International Orthopaedics**, v. 38, n. 6, p. 1303–1309, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**.

Apêndice A - Artigo publicado na revista Plos Neglected Tropical Disease com parte dos dados produzidos nesta tese.



An integrated analysis of the structural changes and gene expression of spleen in human visceral leishmaniasis with and without HIV coinfection

OPEN ACCESS

Citation: Fontes JLM, Khouri R, Reinaldo LGC, Hassegawa EMA, Meneses Filho AJ, de Melo CVB, et al. (2024) An integrated analysis of the structural changes and gene expression of spleen in human visceral leishmaniasis with and without HIV coinfection. PLoS Negl Trop Dis 18(6): e0011877. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011877>

Editor: Abhay R. Satoskar, Ohio State University, UNITED STATES

Received: December 20, 2023

Accepted: April 30, 2024

Published: June 6, 2024

PeerReviewHistory: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011877>

Copyright: © 2024 Fontes et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

DataAvailabilityStatement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

RESEARCH ARTICLE

Jonathan L. M. Fontes^{1,2}, Ricardo Khouri¹, Luis Gustavo C. Reinaldo³, Erina M. A. Hassegawa¹, Antônio José Meneses Filho⁴, Caroline V. B. de Melo^{1,2}, Pablo Ivan

P. Ramos¹, Rafael de Deus Moura⁵, Carla Pagliari⁶, Marta Santos¹, Raimundo José C. Araújo, Jr.⁵, Johan Van Weyenbergh⁷, Luiz A. R. de Freitas¹, Carlos Henrique N. Costa⁴, Washington L. C. dos-Santos^{1,2*}

1 Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia, Brazil, **2** Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil, **3** Hospital Universitário, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brazil, **4** Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brazil, **5** Departamento de Medicina Especializada, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brazil, **6** Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, **7** Laboratory for Clinical and Evolutionary Virology, Ku Leuven, Leuven, Belgium

* washington.santos@fiocruz.br

Abstract

The spleen plays a pivotal role in the pathogenesis of visceral leishmaniasis. In severe forms of the disease, the spleen undergoes changes that can compromise its function in surveilling blood-circulating pathogens. In this study, we present an integrated analysis of the structural and gene expression alterations in the spleens of three patients with relapsing visceral leishmaniasis, two of whom were coinfecte with HIV. Our findings reveal that the IL6 signaling pathway plays a significant role in the disorganization of the white pulp, while *BCL10* and *ICOSLG* are associated with spleen organization. Patients coinfecte with HIV and visceral leishmaniasis exhibited lower splenic CD4+ cell density and reduced expression of genes such as *IL15*. These effects may contribute to a compromised immune response against *L. infantum* in coinfecte individuals, further impacting the structural organization of the spleen.

Author summary

While most individuals recover after contracting visceral leishmaniasis, there are cases where patients experience a relapsing form of the disease. This response pattern to *Leishmania* infection is linked to alterations in spleen structure. Until now, these spleen changes had only been examined in dogs and laboratory animals. In our study, we

provide data on the disorganization of spleen structure in three patients diagnosed with VL, two of whom were also co-infected with HIV. The observed patterns of spleen disorganization

Funding: This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Financial support grant no. 424776/2016-2 to WLCS; Research productivity scholarship to WLCS; Scholarship "Bolsa Jovem Talentos" to RK) and the Coordenacão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Financial support to WLCS; PhD scholarship to JLFM; PhD scholarship to CVBM). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

closely resembled those seen in dogs. Our study emphasizes the involvement of IL6, BCL10, and ICOSLG in this process.

Introduction

Zoonotic visceral leishmaniasis (VL), caused by *Leishmania infantum*, is endemic in Brazil, various parts of the American Continent, and the Mediterranean Basin. The disease manifests through clinical symptoms such as fever, emaciation, hepatosplenomegaly, paleness,

pancytopenia, bleeding diathesis, and a weakened immune response to bacterial infections [1,2]. While most patients respond to treatment with pentavalent antimony (Sb^V) or amphotericin B, there exists a subset with a poor response to conventional therapy, leading to a relapsing form of the disease [3,4]. Understanding the factors contributing to the progression of VL remains limited, yet HIV co-infection and other immunosuppressive conditions have been linked to a poorer prognosis [5].

The spleen, a significant secondary lymphoid organ, plays a vital role in immune surveillance against blood-circulating pathogens [6,7]. In severe VL cases, the spleen is consistently affected and is thought to underlie key clinical manifestations and disease progression [8,9]. Hypersplenism observed in VL contributes to anemia and may be associated with bleeding tendencies [10–13]. Furthermore, disruption of spleen white pulp (WP) and replacement of cell populations may transform the spleen into a permissive environment for parasite survival and proliferation [9,14–16].

This study investigates the association between clinical presentation, spleen histology, and gene expression in three patients exhibiting relapsing forms of VL unresponsive to conventional therapy with Sb^V or amphotericin B. These patients underwent splenectomy as an adjunctive therapeutic measure. The descriptive approach was expanded by comparing the gene expression profiles with those of healthy patients from publicly available data. The information presented herein aim to contribute to our understanding of the pathways involved in susceptibility to an inadequate response to *L. infantum* infection.

Results

Clinical and laboratory data

Clinical parameters are summarized in Table 1. Infection was confirmed in all patients by the identification of amastigotes in bone marrow aspirates. Each of the three patients had experienced at least one year of visceral leishmaniasis (VL) with a minimum of four relapses, despite undergoing conventional treatment. Patients VL1 and VL3 had been living with HIV infection for nine and seven years, respectively. All patients presented with a palpable spleen below the left costal edge: VL1 (18cm), VL2 (12cm), and VL3 (4cm). Additional clinical information can be found elsewhere [17].

Before splenectomy, all patients experienced anemia and leukopenia. Patients VL1 and VL3 also presented with thrombocytopenia (platelet count less than 150,000/μL). Post-splenectomy, a mild improvement in hemoglobin levels was observed in all patients; however, VL1 and VL3 continued to exhibit signs of anemia. There was an improvement in the blood leukocyte counts for all patients. Additionally, the TCD4+ count increased in patients VL1 and VL3 after splenectomy. Unfortunately, two patients died, as previously described [17]: VL1 due to respiratory distress 244 days post-splenectomy, and VL3 due to severe digestive bleeding 742 days after the splenectomy procedure.

Table 1. Clinical parameters of VL patients splenectomized due to relapses after conventional treatment failure.

PARAMETERS	PATIENT		
	VL1	VL2	VL3

Age	33	55	45
Sex	M	M	F
Disease duration Years living with HIV	9	-	7
Years with VL	5	1	3
Relapses	5	5	4
Splenectomy (year)	2015	2015	2015
Pre-splenectomy parameters:			
Bone marrow amastigotes	+	+	+
HIV copies	<50	-	Undetectable
Hemoglobin (g/dL)	6.6	8.7	9.0
White blood cell count /mm ³	1170	1090	1420
CD4 count/mm ³	33	-	104
Platelets/ml (10 ³)	115	155	90
Post-splenectomy parameters:			
Bone marrow amastigotes	ND	ND	+
Hemoglobin (g/dL)	7.8	14.5	10.1
White blood cell counts	4840	5800	5200
CD4 count/mm ³	135	-	436
Platelets/ml (10 ³)	194	383	101
Additional VL control treatment	-	-	Intranasal Sb ^V
Outcome	Death at the 244 th day post-splenectomy	Clinical cure	Death at 742 nd day post-splenectomy

ND=Not done

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011877.t001>

Histological analysis

The findings from spleen histological analysis are summarized in [Table 2](#). Patient VL3 exhibited a well-organized spleen (type 1) with a hyperplastic WP. Patient VL2 displayed a type 1 spleen with slightly organized WP and mildly atrophic lymphoid follicles. Patient VL1, however, presented with a type 3 spleen—disorganized and with atrophic lymphoid WP, featuring small follicles and a marginal zone ([Fig 1](#)). Remarkably, in this patient, the WP comprised only 5% of the total splenic tissue area. Plasmacytosis was either moderate or intense in the red pulp (RP) of all patients, slight in the periarteriolar lymphoid sheath (PALS) of patient VL3, and moderate in patients VL1 and VL2. Notably, infected macrophages were observed in all spleen compartments, consistently displaying high amastigote density.

Leukocyte phenotype and cytokine-producing cells

All cell quantification data following immunohistochemistry labeling are presented in [Table 3](#). Notably, a noteworthy observation is the decreased density observed across some

leukocytes population, including cytokines, FoxP3, and caspase 3-expressing cells, both in the WP and the RP of patient VL1, whose spleen was disorganized. Surprisingly, only the percentage of CD3, CD4, CD8, CD68, and counts of IL6-positive cells were either similar or higher compared to those observed in patients with organized spleens.

Furthermore, it's worth noting that the density of B cells, IL-17, and TNF-producing cells was higher, while CD68+ macrophages appear to be lower in the patient without HIV infection compared to those in patients with HIV infection.

Table 2. Histological analysis of spleen from VL patients.

PARAMETER	PATIENTS		
	VL1	VL2	VL3
Spleen size below left costal edge (cm)	18	12	4
Spleen weight (g)	1882	1066	742
White pulp:			
Size (%)	5.0	10.0	21.7
Organization (type)	3	1	1
Lymphoid follicle ¹ :			
Size	-2.5	-0.7	2.0
Germinal center size	-2.0	-0.7	3.0
Infected macrophage	1.3	0.3	3.0
Hyaline deposits	1.0	1.0	0.0
Marginal and peri-follicular zone ¹ :			
Size	-2.3	-0.3	0.0
Infected macrophages	1.5	0.0	2.0
Granuloma	1.0	0.0	2.0
Plasma cells	1.0	0.0	0.0
PALS ¹ :			
Size	-0.5	0.3	0.0
Infected macrophages	1.8	2.0	1.3
Plasma cells	2.3	2.3	1.0
Red pulp ¹ :			
Cell density	-0.8	0.0	0.0
Lymphocytes	1.3	1.0	1.0
Macrophages	3.0	3.0	3.0
Infected macrophages	3.0	2.7	3.0
Infection density	3.0	3.0	3.0
Granuloma	0.5	0.0	1.3
Plasma cells	2.0	2.0	3.0
Russel bodies/Mott cells	1.3	1.7	1.0
Neutrophils	0.5	1.0	0.0
Mast cells	0.0	0.0	0.3

Extramedullary hematopoiesis: Erythroblasts	0.8	0.0	0.3
Megakaryocytes	0.8	0.7	0.0
Sinus size	2.3	2.0	1.0
Iron deposits	0.3	0.3	0.0

¹semiquantitative scores

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011877.t002>

Gene expression in VL patients

In this study, spleens from three patients with severe visceral leishmaniasis underwent evaluation for the expression of 590 genes using the nCounter platform. We incorporated the spleen transcriptome data from three normal donors obtained from publicly available sources (GTEx project) to serve as a control group. Our findings reveal distinct expression patterns of these genes between VL patients ($n = 3$) and the control group ($n = 3$), as depicted in the heatmap shown in [Fig 2A](#). Additionally, through an unsupervised analysis using principal component analysis (PCA), we observed a notable disparity in gene signatures between patients with VL and spleen type 1 (VL3 and VL2) compared to the patient with spleen type 3 (VL1), as illustrated in [Fig 2B](#).

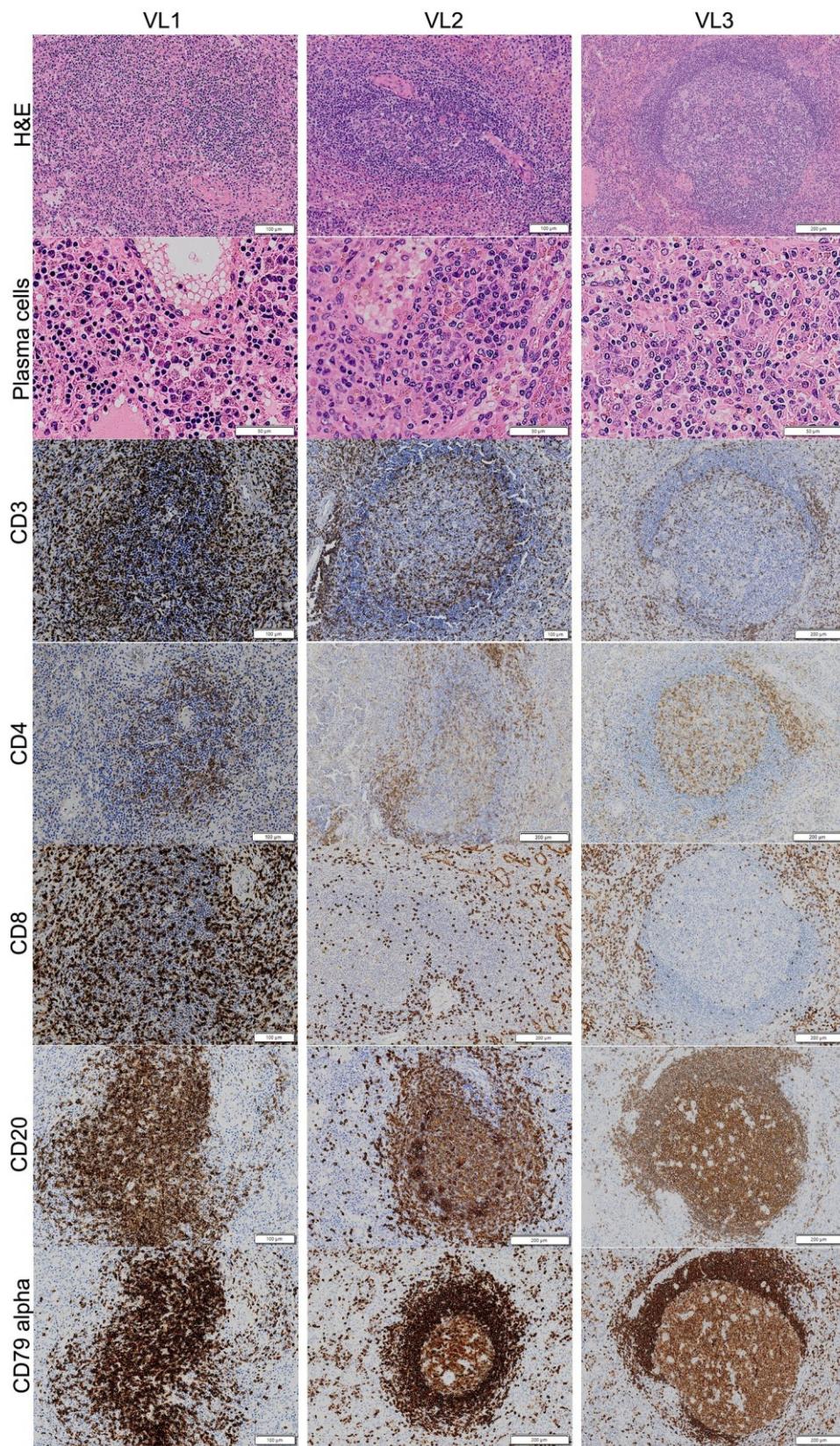


Fig 1. Histological and leukocyte distribution in spleen from patients with VL. Patient VL1 presents a spleen type 3, with atrophy of lymphoid follicles. Patient VL2 presents a spleen type 1, with slight organized lymphoid follicle. Patient VL3 presents a well-structured WP and well-defined sub compartments, classified as spleen type 1.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011877.g001>

We identified 168 differentially expressed genes (DEGs) and most of these genes play pivotal roles in B cell proliferation and germinal center formation. Upregulated genes like *BCL10* and *ICOSLG* were notably prominent in VL2 and VL3 patients, while genes such as *CCR7* and *RIPK1*, associated respectively with T cell migration and apoptosis induction, exhibited downregulation, particularly in VL1 and VL3 patients ([S3 Table](#)).

Table 3. Cell distribution in spleen compartments.

Parameters	VL1	VL2	VL3
White Pulp			
CD3 (%)	31	27	11
CD4 (%)	16	20	7
CD8 (%)	33	10	11
CD20 (%)	28	60	34
CD79α (%)	30	57	43
CD68 (cell/mm ²)	547	151	173
IL1β (cell/mm ²)	15	10	0
IL4 (cell/mm ²)	0	4	8
IL6 (cell/mm ²)	37	10	15
IL10 (cell/mm ²)	0	4	3
IL17 (cell/mm ²)	44	85	60
TNFα (cell/mm ²)	18	92	47
TGFβ (cell/mm ²)	0	19	0
IFNγ (cell/mm ²)	0	3	13
Caspase 3 (cell/mm ²)	8	19	140

Foxp3 (cell/mm ²)	19	136	198
Red Pulp			
CD3 (%)	21	12	13
CD4 (%)	4	2	4
CD8 (cell/mm ²)	2264	547	1586
CD20 (cell/mm ²)	593	683	896
CD68 (cell/mm ²)	1154	861	898
CD79α (cell/mm ²)	767	1896	1682
IL1β (cell/mm ²)	1	6	1
IL4 (cell/mm ²)	0	0	8
IL6 (cell/mm ²)	47	37	42
IL10 (cell/mm ²)	0	0	10
IL17 (cell/mm ²)	23	55	294
TGFβ (cell/mm ²)	0	5	0
IFNγ (cell/mm ²)	0	2	34
TNFα (cell/mm ²)	121	324	101
Caspase 3 (cell/mm ²)	8	17	18
Foxp3 (cell/mm ²)	1	885	511

Values of leukocytes and cytokines stained by immunohistochemistry. For some leukocytes were used percentual of area stained per white pulp or red pulp. These values represent the mean of 5 different areas per case.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011877.t003>

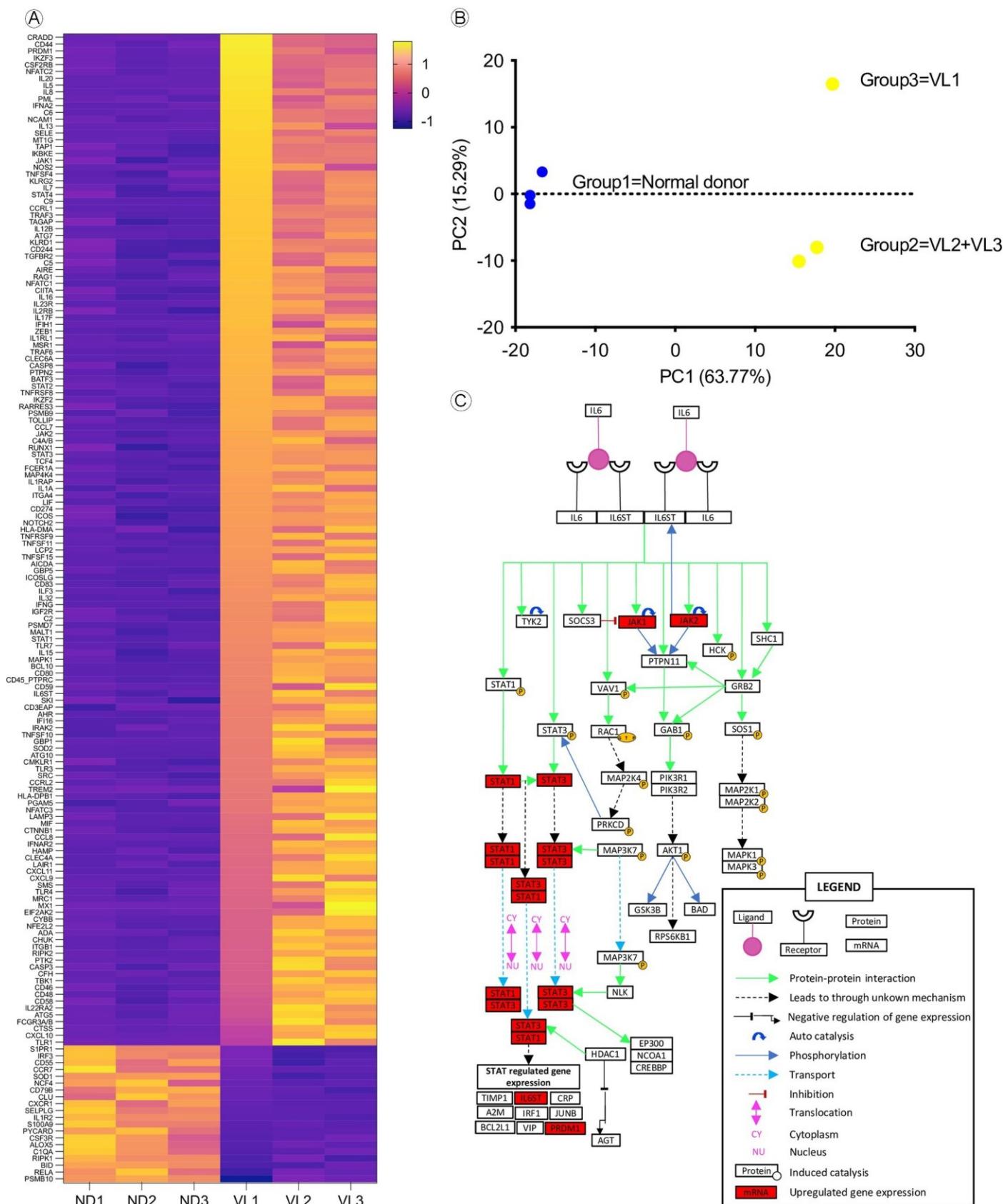


Fig 2. Gene expression analysis of spleen from patients with VL. A) Heatmap demonstrate that gene signature differs from patients with VL to normal donors and each band correspond to a different gene. Scale bar represents Log2 of Fold Change. Data were organized based on the gene expression of VL1 from the most expressed to the last expressed. B) Using an unsupervised analysis, we demonstrate that gene profile differs among VL patients, clustering organized spleen (patients VL2 and VL3) separated from disorganized spleen (patient VL1). Each dot represents the PCA value of each patient based on PCA analysis. Blue dot—Normal donor; Yellow dot—VL patient. C) IL6 signaling pathway adapted from Kandasamy and colleagues (2010) [18]. This pathway represents the signaling mechanism of IL6 in humans, genes upregulated in the spleen of patients with VL found on our analysis are highlighted in red, other genes presented at this graphic did not present expression change statistically significant or were not analyzed in our data set.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011877.g002>

Our analysis of Canonical Pathways revealed an upregulation of genes involved in signaling through IL6 in VL patients, particularly evident in VL1 patient, including genes such as *JAK1*, *JAK2*, and *PRDM1* (Fig 2C).

Integrative analysis

Aiming to identify differences between parameters in patient with VL only (patient VL2) or VL with HIV coinfect (patients VL1 and VL3), we performed a supervised analysis. Data were normalized and clusterized by Pearson correlation. The of number of *counts* per genes, laboratory parameters, and cell counting in IHC presented in [S2 Fig](#).

This analysis revealed group of parameters more associated to each patient: To the patient VL2 without HIV coinfection and organized spleen the cluster with genes as *CXCL9*, *IL15*, *SOD2*, *IL32*, *GBP1*, *IRAK2*, *RIPK1*, *S100A9*, *IL6ST*, *CD45_PTPRC*, the cells CD20+ and TGF β + in WP, cytokines IFN γ , TNF α , and IL1 β in RP.

Among patients coinfect with both VL and HIV, we identified two distinct spleen types. Notably, the organized spleen type and VL-HIV coinfect was associated to genes as *AHR*, *BID*, *C1QA*, *CCL8*, *CCRL2*, *CLEC4A*, *CMKLR1*, *CSF3R*, *EIF2AK2*, *ICOSLG*, *ILF3*, *LAMP3*, *MRC1*, *PSMD7*, *SMS* and *SRC*; cells *CASP3*+, IL4+ and IFN γ + in the WP, and the cells IL4+, IL10+, IL17+, TGF β +, CD20+ in the RP. Distinctly, VL1 patient, that has disorganized spleen and VL-HIV coinfection was related to *SOD1*, *STAT3*, *STAT4*, *ICOS*, *TRAF6* and *IRF3* genes, and CD8+ cells in the RP and expression of IL6 in both regions of spleen.

Discussion

In this study we took the advantage of accessing an unusual specimen of spleens removed from patients with a severe form of VL, unresponsive to conventional therapeutics. The availability of these specimens allowed to confirm that human VL evolves with stages of splenic lymphoid hyperplasia and atrophy and may evolve to WP disruption and changes in leukocyte populations in the spleen compartments. These changes have already been observed in dogs naturally infected with *L. infantum* and in hamsters with experimental VL [15,19]. Although this small case series is not suitable for definitive conclusions, it highlights aspects that are supported by previous experimental observations, deserving to be explored in future studies using a larger series. For instance, as shown in the study by Silva and colleagues (2012) [20], in dogs with severe VL atrophic changes and WP disruption were intense in the lymphoid follicles and marginal zones and was almost unperceived in PALS.

Similar predominance of changes in the lymphoid follicle was observed in the patient VL1 (with type 3 spleen).

Also, in agreement with the studies performed in dogs, herein we show a decrease in the number of B lymphocytes in the WP compartments and an increase of plasma cells in the RP. The reason of why plasma cell persists even after WP disruption is still not completely elucidated. In dogs with VL and disorganized spleen there is up-regulation of BAFF, APRIL and CXCL12, factors associated with extended survival and homing of plasma cells [21,22]. However, in this study we were not able to find differences in BAFF and APRIL expression, between the normal reference spleens and the spleens of infected patients. Furthermore, some of these plasma cells may accumulate in the RP following an extrafollicular differentiation pathway [23].

The gene expression pattern seen in the spleen of patients with VL was different from that observed in the normal spleens used as reference. Despite of analysis of bulk RNA spleen samples did not allow to understand how genes are being expressed at cellular level, in this work we observed that the pattern of DEGs in VL are related to inflammatory response, cellular and blood cell homeostasis and signaling by the B cell activator factor and IL6 cytokine. These pathways inflammation process and cell cycle process are highly expressed in blood and spleen of hamsters with experimental visceral leishmaniasis [24,25].

Among the investigated genes and cellular characterization by IHC, we found that *IFNG* gene appeared highly expressed in VL patients, as observed in other transcriptional studies in human and experimental VL [24–26], and the gene expression pattern in VL3 patient parallels to the number of *IFNy* + cells present in the spleen. However, only a few cells stained for *IFNy* + were observed in the IHC staining of the spleen of the patients in this and in a previous study [27]. It is still not clear the difference between gene expression and IHC finding. The fact that all these patients presented treatment failure and relapses of disease, they also presented infected macrophage intensely distributed through the spleen compartments. The failure in parasite growth control may result of a local failure in the pathways of *IFNy* expression, especially in disorganized spleen. In fact, cells producing the regulatory cytokines IL4, *IFNy*, IL10 and IL17 were detected or more frequently found in the patient with VL and hyperplastic spleen.

In this series, the spleen of the patient VL1 (spleen type 3, disorganized), showed an increased density of CD8+ lymphocyte in the WP not observed in the other patients. This change was not also observed in the studies with dogs [20,28]. Further studies are, therefore, necessary to confirm the relevance of this finding in spleen disorganization in VL.

There was an overall increase of CD68+ macrophage in VL1 patient compared with the patients with VL and organized spleen. Most of the cytokine-producing cell distribution and caspase 3 or Foxp3-expressing cells revealed a trend towards a decrease in density in the WP or RP in the patient with VL and histologic disorganization of the spleen. This finding together with the absence of cells that stained for IL10, IL4, *IFNy*, or TGF β may reflect a state of T cell exhaustion as it has been reported in the spleen of dogs with VL [28].

The spleen of patient VL1 had a unique pattern of gene expression different from that observed in the spleen type 1 of the other two patients. It showed high expression of genes from IL6 signaling pathway (*JAK1*, *JAK2* and *PRDM1*), and a high density of IL6-producing

cells in the RP and the WP, differing from organized spleen, suggesting that this pathway can also be involved in spleen disorganization. IL6 is involved in the induction of inflammatory processes and is found at high levels in plasma of humans and dogs infected with *Leishmania infantum* [29–31]. The IL6 levels have been proposed as a biomarker of prognosis and death in VL [13,32]. One of the outcomes of IL6 signaling is the induction of *PRDM1* expression. This gene was found to induce B cell differentiation into plasma cell, to be highly expressed in T cell exhaustion and to induce regulatory FOXP3+ T cell to secrete IL10 [33,34]. T cell exhaustion is a condition that has been associated with the progression of VL and spleen disorganization [28,35,36], particularly in patients with HIV co-infection [4]. The patients with VL of this study showed high expression levels of *PRDM1*, *CD274* (*PD-L1*), and *CD44*, which also supports the hypothesis of T cell exhaustion. Conversely, some DEG's, such as *BCL10* and *ICOSLG*, were highly expressed in type 1 spleen. These genes are associated with co-stimulatory T-cell and B cells proliferation and are involved in B cell differentiation to plasma cells. It is interesting to notice that plasmacytosis establishes since the hyperplastic stage of spleen in VL and remains until the late stage even when the WP is already disrupted [23]. Therefore, these gene expression patterns may correspond to the lymphoid follicle hyperplasia and spleen plasmacytosis observed in some stages of VL. This process of differentiation could be due to TNF α , a cytokine that induce *ICOSLG* activation and is increased in the type 1—hyperplastic spleen as seen in our patients and in experimental studies [37,38].

Despite patients coinfected VL-HIV having indetectable viral copies in the spleen, changes due to infection may persist and have impact on the outcome of the disease. In fact, there is a percentage of people living with HIV that become immunological non-responders, presenting low CD4 counts even after reduction of viral load [39]. The patients with VL-HIV presented low density splenic CD4 $^{+}$ cells in the WP, low expression of genes such as *IL15* and of cytokines related to Th1 response in comparison to the patient with VL monoinfection, also, literature has associated upregulation of genes related to Th2 response and downregulation of *IFNG* gene before VL treatment in patients VL-HIV coinfected [40]. This observation concurs with previous findings, in which patients with VL-HIV presented more frequent disease relapse, associated to low CD4 counts and low IFN γ in circulating blood [41]. Conversely, IL15 a cytokine associated with induction of Th1 response through IFN γ signaling, contribute to cure in canine VL [42], is upregulated in the patient with VL only. These differences in gene expression patterns and cellular distribution may be distinctive of coinfection status.

The patients with HIV infection (VL1 and VL2) presented extreme changes of the spleen (atrophy and disorganization in patient VL1 and hyperplastic changes in patient VL3). This may be indicative of dysregulated activation of immune system in LV-HIV infection that may eventually lead to lymphoid tissue disruption and immune system exhaustion. Both conditions VL and HIV infection are both conditions known to be related with WP disruption. On the clinical point of view, these patients also had little improvement of hematological parameters after splenectomy and evolved to death.

The main limitation on this study is the number of subjects. However, to our knowledge, this is the first study combining morphology (conventional and IHC) and transcriptomic

analysis and IHC to characterize human spleen changes present in visceral leishmaniasis. The data presented here support the following hypotheses: 1) VL also cause disorganization of spleen compartments in humans. 2) WP disruption is associated to the phenomenon of immune system exhaustion; 3) IL6 may play a role in disorganization and plasma cell accumulation in the spleen. 4) low CD4 T cell density and low IL15 expression may contribute to ineffective response to the parasite favoring recurrence of the disease and eventually WP disruption; 5) impaired IFN γ signaling may lead to persistence of *Leishmania* and chronic inflammation, thereby altering the spleen's microenvironments and disrupting immune response to infections.

Material and methods

Ethical statement

Written informed consent was obtained from the patients, for publication of this case series as stated in a previously published paper [17].

Clinical and laboratory data

Information was gathered from three adult patients experiencing relapsing VL, showing resistance to standard Sb^V or amphotericin B treatments, and subsequently undergoing therapeutic splenectomy. Their clinical records were meticulously examined, focusing on key variables: age, gender, disease duration, HIV co-infection, spleen dimensions, fever occurrence, red and white blood cell counts, platelet levels, serum protein levels, as well as any co-infections preand post-splenectomy.

Spleen samples

Upon splenectomy, tissue fragments were promptly retrieved from the midsection of the spleen by making a transverse incision across the capsule and the larger axis of the spleen. These fragments were then prepared for histological analysis and gene expression studies in the following manner:

Spleen conventional histology

The collected spleen fragments underwent fixation in formalin-acetic acid-alcohol solution, followed by embedding in paraffin. Tissue sections, 4 micrometers thick, were stained using hematoxylin and eosin, as well as periodic acid-Schiff. Subsequently, two pathologists (WLCS and LARF) conducted examinations, classifying the samples into three categories (spleen type 1, type 2, and type 3) based on the structural organization of the splenic WP. These categories were determined according to established criteria [9,19]: spleen type 1 exhibiting well-organized, reactive WP with distinct peri-arteriolar lymphocyte sheaths and multiple reactive lymphoid follicles characterized by well-defined germinal centers, mantle zones, and marginal zones.; spleen type 2 containing primarily inactive lymphoid follicles, displaying slightly disorganized WP with hyperplastic or hypoplastic changes, resulting in less discernible boundaries between WP compartments.; spleen type 3 Featuring extensively disorganized WP, often presenting poorly discernible compartments, frequent lymphoid atrophy, and a lack of reactive lymphoid follicles.

Cells were morphologically characterized according to previously described criteria: Lymphocytes—cells with round nuclei containing condensed chromatin, inconspicuous nucleoli, and scant cytoplasm. Plasma cells—cells with eccentric nuclei, heterochromatin dispersed around the edge in a pattern like that of the numerals on an analog clock face, and basophilic cytoplasm with clear perinuclear vacuoles. Macrophages—large cells with oval or reniform nuclei containing loosely packed chromatin surrounded by a rim of eosinophilic cytoplasm with indistinct edges. Granulocytes—cells with highly lobulated nuclei containing densely packed chromatin. Megakaryocytes—very large cells with wide and clearly defined cytoplasm and large, lobulated nuclei containing condensed chromatin.

Furthermore, immunohistochemistry was employed for further characterization. Initially, the density of different cell populations within the RP was scored as follows: 0 = no cells, 1 = isolated cells or small aggregates in a small proportion of the examined $\times 400$ -magnified microscopic fields, 2 = single cells or aggregates observed in most examined $\times 400$ -magnified microscopic fields, and 3 = single cells or aggregates observed in nearly all examined $\times 400$ -magnified microscopic fields. These observations were validated through morphometric analysis.

Leukocyte populations and cytokine producing cells. Immunophenotyping and identification of cytokine-producing cells was performed by immunohistochemistry using the following antibodies and procedures: Anti-human molecules antibodies: CD3 (polyclonal produced in rabbit), CD4 (4B12), CD8 (C8/144B), CD20 (L26), CD68 (KP1), CD79 α (JCB117), all from Dako (Glostrup, Denmark). Procedures: Deparaffinization and rehydration were performed in xylene, followed by a decreasing series of ethanol solutions and the blockage of endogenous tissue peroxidase in 3% hydrogen peroxide and antigen retrieval was performed using a Dako PT Link (PT100/PT101) high pH module at 97°C for 20 minutes. The DAKO EnVision + HRP kit (Dako Co, Denmark) was used as an amplification system. Diaminobenzidine was used as the chromogen. Sections were counterstained with hematoxylin. Mouse IgG1 isotypes unrelated to the antigens were used as a negative control to replace the primary antibody, except for CD3, that negative control was only incubated with secondary antibody only.

Cytokine detection was performed using these primary antibodies: TGF β (ab66043), IL1 β (AF-201-NA), IFN γ (MAB 285), TNF α (AF-210-NA), IL10 (AF-217-NA), IL6 (AF-206-NA), IL17 (AF-317-NA) and IL4 (AF-204-NA) (RD Systems), as well as 14-4776-82 (Foxp3 from E-Bioscience) and Caspase 3, in accordance with the following protocol: Antigen unmasking was performed using a heat-induced antigen retrieval method in a water bath with Retrieval Buffer (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) for 25 minutes at 95°C, pH 9.0. Next, the sections were incubated in a saponin solution (0.1% in PBS 0.01 M, pH 7.4) for 10 minutes at room temperature, followed by incubation in skim milk 10% for 30 minutes and a final incubation with the primary antibodies diluted in 1% bovine albumin–PBS solution, overnight at 4°C. Specific antibody binding was detected using a second antibody and the LSAB system (Dako Corporation, Carpinteria CA, USA, K690) for 30 minutes at 37°C. All reactions were developed using a 3⁰3 diaminobenzidine chromogen solution and counterstained with Harris hematoxylin. The density of leukocyte cell populations was estimated by morphometry. Since cytokine-producing cells were distributed in small clusters the density of cytokine producing cells was estimated by identifying the two most dense

sites of cell clustering and count the cells in this site and in other four non-overlapping areas around this site.

Human spleen transcriptomics

Sample from VL spleen tissue. Total mRNA was initially extracted from tissue fragments using a modified two-step protocol that involved extraction with TRIzol Reagent, followed by further purification using Spin Column-Based technology. Specifically, we macerated tissue fragment samples with 800 μ L of TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, Cat. no. 15596026) followed by the addition of 160 μ L of chloroform (Sigma-Aldrich, Cat. no. 516726), then centrifuged the mixture for 15 minutes at 12,000 $\times g$ at 4°C. The obtained aqueous phase was then subjected to additional purification using Spin Column-Based technology (RNeasy Mini Kit 50, Cat. No. / ID: 74104), to ensure the extraction of high-quality total mRNA. The quantity of RNA was measured using NanoDrop (ThermoFischer). The quality of RNA was assessed using Agilent Bioanalyzer automated electrophoresis (Agilent) and considered viable if the RNA integrity number (RIN) was greater than 7. Gene expression analysis was conducted using the nCounter platform by NanoString Technologies, which employs molecular barcodes directly linked to target RNA transcripts, allowing for digital detection. This analysis was performed at the Genomics Core Leuven (VIB/KULeuven—Belgium).

For this assay, two probes were utilized: one to capture specific mRNA through complementary binding and another linked to a fluorescent barcode, aiding in the identification of the target mRNA through hybridization. The combination of these probes with genetic material enables the detection of desired transcripts via fluorescent barcodes.

Sample from healthy spleen tissue. As a control, healthy spleen tissue samples were reanalyzed from the GTEx project [43], which conducted whole-transcriptome profiling of various human tissues, including spleen. Three samples were chosen (S1 Table) based on age and gender similarity to the profile of infected patients. The biomaRt library for R [44] was utilized for gene annotations. Raw reads were mapped against the human genome reference (GRCh38) using STAR [45] with default parameters. HT-seq count [46] assigned and counted mapped reads to annotated genomic features based on GENCODE v. 25 annotations.

Differentially Expressed Genes (DEGs). Normalization across samples (S1 Fig) was performed multi-step: First, the expression values of all housekeeping genes (S2 Table), s , were averaged across samples by using the geometric mean. Then, P_n lane scaling factors c^s were

$c^s = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n c_i$ obtained by estimating a combined term as follows: $c_i = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n c_{ij}$, where i represents each sample. A normalized expression value g^s was estimated for every gene in each sample g by calculating $g^s = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n g_{ij} * c_i$. The DEGs data analysis employed an unpaired t-test, assuming individual row variance, and adjusted for False Discovery Rate (FDR) at 1.00% using the two-stage step-up method by Benjamini, Krieger, and Yekutieli.

A heat map (GraphPad Prism Software) was used to display the significant Differentially Expressed Genes (DEGs), illustrating their distribution by converting gene counts into

Zscores. Principal Component Analysis (PCA) was used to reduce the dimensionality of the measured genes in the dataset, effectively capturing the disease conditions of the experiment (Weka 3.9.3, University of Waikato).

Supporting information

S1 Table. GTEx samples used as healthy liver tissue control.
(PDF)

S2 Table. Housekeeping genes used during normalization.
(PDF)

S3 Table. Differentially Expressed Genes in Normal and VL infected patients. Each value represents a Log2FC for each gene. ND—Normal Donor; VL—visceral leishmaniasis infected patient.
(XLSX)

S1 Fig. Genes expression level distribution after normalization.
(PDF)

S2 Fig. Heatmap of data from VL patients. Each row represents each patient (VL1, VL2, VL3), while the number of counts per gene (G), number of cells stained by IHC (C) in WP or RP and laboratorial data (L) are present in columns. The columns were clustered based on Pearson correlation data to each patient. WP- White pulp; RP- Red pulp.
(PDF)

Author Contributions

Conceptualization: Ricardo Khouri, Carlos Henrique N. Costa, Washington L. C. dos-Santos.

Data curation: Luis Gustavo C. Reinaldo, Pablo Ivan P. Ramos, Washington L. C. dos-Santos.

Formal analysis: Jonathan L. M. Fontes, Ricardo Khouri, Caroline V. B. de Melo, Pablo Ivan P. Ramos, Johan Van Weyenbergh, Luiz A. R. de Freitas, Washington L. C. dos-Santos.

Funding acquisition: Washington L. C. dos-Santos.

Investigation: Jonathan L. M. Fontes, Ricardo Khouri, Carla Pagliari, Marta Santos, Raimundo Jose' C. Arau'jo, Jr., Johan Van Weyenbergh, Luiz A. R. de Freitas.

Methodology: Jonathan L. M. Fontes, Luis Gustavo C. Reinaldo, Erina M. A. Hassegawa, Anto^nio Jose' Meneses Filho, Caroline V. B. de Melo, Rafael de Deus Moura, Carla Pagliari, Johan Van Weyenbergh, Luiz A. R. de Freitas, Carlos Henrique N. Costa.

Project administration: Washington L. C. dos-Santos.

Resources: Jonathan L. M. Fontes, Anto^nio Jose' Meneses Filho, Rafael de Deus Moura, Carla Pagliari, Raimundo Jose' C. Arau'jo, Jr., Washington L. C. dos-Santos.

Supervision: Washington L. C. dos-Santos.

Visualization: Jonathan L. M. Fontes.

Writing – original draft: Jonathan L. M. Fontes, Ricardo Khouri, Washington L. C. dosSantos.

Writing – review & editing: Jonathan L. M. Fontes, Carlos Henrique N. Costa, Washington L. C. dos-Santos.

References

1. Saporito L, Giannanco GM, De Grazia S, Colombo C. Visceral leishmaniasis: host–parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. *International Journal of Infectious Diseases.* 2013 Aug; 17(8):e572–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2012.12.024> PMID: 23380419
2. Costa CHN, Werneck GL, Costa DL, Holanda TA, Aguiar GB, Carvalho AS, et al. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010 Aug; 43(4):386–92. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822010000400010> PMID: 20802936
3. Cota GF, de Sousa MR, Rabello A. Predictors of Visceral Leishmaniasis Relapse in HIV-Infected Patients: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Jun 7; 5(6):e1153. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001153> PMID: 21666786
4. Takele Y, Mulaw T, Adem E, Shaw CJ, Franssen SU, Womersley R, et al. Immunological factors, but not clinical features, predict visceral leishmaniasis relapse in patients co-infected with HIV. *Cell Rep Med.* 2022 Jan; 3(1):100487. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100487> PMID: 35106507
5. Cota GF, de Sousa MR, de Mendonça ALP, Patrocínio A, Assunção LS, de Faria SR, et al. LeishmaniaHIV Co-infection: Clinical Presentation and Outcomes in an Urban Area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Apr 17; 8(4):e2816. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002816> PMID: 24743472
6. Lewis SM, Williams A, Eisenbarth SC. Structure and function of the immune system in the spleen. *Sci Immunol.* 2019 Mar 22;4(33). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aau6085> PMID: 30824527
7. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol.* 2005 Aug; 5(8):606–16. <https://doi.org/10.1038/nri1669> PMID: 16056254
8. Veress B, Omer A, Satir AA, El Hassan AM. Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. *Immunology.* 1977 Nov; 33(5):605–10. PMID: 590992
9. Hermida M d. ER, de Melo CVB, Lima IDS, Oliveira GG de S, Dos-Santos WLC. Histological Disorganization of Spleen Compartments and Severe Visceral Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018; 8 (November):394. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00394> PMID: 30483481
10. Dutra RA, Dutra LF, Reis M de O, Lambert RC. Splenectomy in a patient with treatment-resistant visceral leishmaniasis: a case report. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012 Feb; 45(1):130–1. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822012000100027> PMID: 22370845
11. Varma N, Naseem S. Hematologic Changes in Visceral Leishmaniasis/Kala Azar. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion.* 2010 Sep 30; 26(3):78–82. <https://doi.org/10.1007/s12288-0100027-1> PMID: 21886387
12. Costa CHN, Chang KP, Costa DL, Cunha FVM. From Infection to Death: An Overview of the Pathogenesis of Visceral Leishmaniasis. *Pathogens.* 2023 Jul 24; 12(7):969. <https://doi.org/10.3390/pathogens12070969> PMID: 37513817
13. Costa DL, Rocha RL, Carvalho RMA, Lima-Neto AS, Harhay MO, Costa CHN, et al. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. *Pathog Glob Health.* 2013 Mar 12; 107(2):78–87. <https://doi.org/10.1179/2047773213Y.0000000078> PMID: 23683334
14. Montes de Oca M, Engwerda CR, Kaye PM. Cytokines and splenic remodelling during Leishmania donovani infection. *Cytokine X.* 2020 Dec; 2(4):100036. <https://doi.org/10.1016/j.cytox.2020.100036> PMID: 33604560
15. de Melo CVB, Guimarães Torres F, Hermida MDR, Fontes JLM, Mesquita BR, Brito R, et al. Splenic Transcriptional Responses in Severe Visceral Leishmaniasis: Impaired Leukocyte Chemotaxis and Cell Cycle Arrest. *Front Immunol.* 2021 Nov 5;12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.716314> PMID: 34804009

16. Bagues NCT, Pinheiro CGM de, Bastos LA, Fraga DBM, Veras PST, Pontes-de-Carvalho LC, et al. Parasitic load and histological aspects in different regions of the spleen of dogs with visceral leishmaniasis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2018;56(July 2017):14–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.11.003> PMID: 29406277
17. Reinaldo LGC, Araujo-Juñior RJC, Diniz TM, Moura RD, Meneses-Filho AJ, Furtado CVVM, et al. Splenectomy in Patients with Visceral Leishmaniasis Resistant to Conventional Therapy and Secondary Prophylaxis: A Retrospective Cohort. *Am J Trop Med Hyg*. 2022 Aug 17; 107(2):342–8. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.21-0376> PMID: 35895427
18. Kandasamy K, Mohan S, Raju R, Keerthikumar S, Kumar GSS, Venugopal AK, et al. NetPath: a public resource of curated signal transduction pathways. *Genome Biol*. 2010; 11(1):R3. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-1-r3> PMID: 20067622
19. Santana CC, Vassallo J, De Freitas LAR, Oliveira GGS, Pontes-De-Carvalho LC, Dos-Santos WLC. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. *Parasite Immunol*. 2008; 30(10):515–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2008.01051.x> PMID: 18665902
20. Silva JS, Andrade AC, Santana CC, Santos LQ, de Oliveira CI, Veras PST, et al. Low CXCL13 expression, splenic lymphoid tissue atrophy and germinal center disruption in severe canine visceral leishmaniasis. *PLoS One*. 2012; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029103> PMID: 22242159
21. Goto Y, Omachi S, Sanjoba C, Matsumoto Y. Short report: Elevation of serum B-cell activating factor levels during visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2014; 91(5):912–4.
22. Omachi S, Fujii W, Azuma N, Morimoto A, Sanjoba C, Matsumoto Y, et al. B-cell activating factor deficiency suppresses splenomegaly during Leishmania donovani infection. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2017; 489(4):528–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.005> PMID: 28583852
23. Silva-O'Hare J, De Oliveira IS, Klevorn T, Almeida VA, Oliveira GGS, Atta AM, et al. Disruption of splenic lymphoid tissue and plasmacytosis in canine visceral leishmaniasis: Changes in homing and survival of plasma cells. *PLoS One*. 2016; 11(5):1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156733> PMID: 27243459
24. Espitia CM, Saldarriaga OA, Travi BL, Osorio EY, Hernandez A, Band M, et al. Transcriptional profiling of the spleen in progressive visceral leishmaniasis reveals mixed expression of type 1 and type 2 cytokine-responsive genes. *BMC Immunol*. 2014 Dec 26; 15(1):38. <https://doi.org/10.1186/s12865-014-0038-z> PMID: 25424735
25. Kong F, Saldarriaga OA, Spratt H, Osorio EY, Travi BL, Luxon BA, et al. Transcriptional Profiling in Experimental Visceral Leishmaniasis Reveals a Broad Splenic Inflammatory Environment that Conditions Macrophages toward a Disease-Promoting Phenotype. *PLoS Pathog*. 2017 Jan 31; 13(1): e1006165. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006165> PMID: 28141856
26. Fakiola M, Singh OP, Syn G, Singh T, Singh B, Chakravarty J, et al. Transcriptional blood signatures for active and amphotericin B treated visceral leishmaniasis in India. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 Aug 16; 13(8):e0007673. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007673> PMID: 31419223
27. dos-Santos WL, Pagliari C, Santos LG, Almeida VA, e Silva TL, Coutinho J de J, et al. A case of conventional treatment failure in visceral leishmaniasis: leukocyte distribution and cytokine expression in splenic compartments. *BMC Infect Dis*. 2014 Dec 9; 14(1):491. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-491> PMID: 25200768
28. de Souza TL, da Silva AVA, Pereira L de OR, Figueiredo FB, Mendes Junior AAV, Menezes RC, et al. 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. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49344-1> PMID: 31506501
29. Abbehusen MMC, Almeida V dos A, Solcà M da S, Pereira L da S, Costa DJ, Gil-Santana L, et al. Clinical and immunopathological findings during long term follow-up in Leishmania infantum experimentally infected dogs. *Sci Rep*. 2017 Nov 21; 7(1):15914. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15651-8> PMID: 29162847

30. Guedes DL, Silva ED da, Castro MCAB, Juñior WLB, Ibarra-Meneses AV, Tsoumanis A, et al. Comparison of serum cytokine levels in symptomatic and asymptomatic HIV-Leishmania coinfected individuals from a Brazilian visceral leishmaniasis endemic area. *PLoS Negl Trop Dis.* 2022 Jun 17; 16(6): e0010542. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010542> PMID: 35714136
31. A'lvarez L, Mariñ-García PJ, Rentero-Garrido P, Martínez-Jiménez CP, Llobat L. Interleukin 6 and interferon gamma haplotypes are related to cytokine serum levels in dogs in an endemic Leishmania infantum region. *Infect Dis Poverty.* 2023 Feb 10; 12(1):9. <https://doi.org/10.1186/s40249-023-01058-3> PMID: 36759910
32. dos Santos PL, de Oliveira FA, Santos MLB, Cunha LCS, Lino MTB, de Oliveira MFS, et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Jan 27; 10(1):e0004375. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004375> PMID: 26814478
33. Fu SH, Yeh LT, Chu CC, Yen BLJ, Sytwu HK. New insights into Blimp-1 in T lymphocytes: a divergent regulator of cell destiny and effector function. *J Biomed Sci.* 2017 Dec 21; 24(1):49. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0354-8> PMID: 28732506
34. Cretney E, Xin A, Shi W, Minnich M, Masson F, Miasari M, et al. The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2011 Apr 6; 12(4):304–11. <https://doi.org/10.1038/ni.2006> PMID: 21378976
35. Costa-Madeira JC, Trindade GB, Almeida PHP, Silva JS, Carregaro V. T Lymphocyte Exhaustion During Human and Experimental Visceral Leishmaniasis. *Front Immunol.* 2022 May 2; 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.835711> PMID: 35585983
36. Jafarzadeh A, Kumar S, Bodhale N, Jafarzadeh S, Nemat M, Sharifi I, et al. The expression of PD-1 and its ligands increases in Leishmania infection and its blockade reduces the parasite burden. *Cytokine.* 2022 May; 153:155839. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.155839> PMID: 35276636
37. DE F MICHELIN A, PERRI SH V, DE LIMA VMF. Evaluation of TNF- α , IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. *Ann Trop Med Parasitol.* 2011 Jul 22; 105(5):373–83.
38. Montes de Oca M, Kumar R, de Labastida Rivera F, Amante FH, Sheel M, Faleiro RJ, et al. Blimp-1Dependent IL-10 Production by Tr1 Cells Regulates TNF-Mediated Tissue Pathology. *PLoS Pathog.* 2016 Jan 14; 12(1):e1005398. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005398> PMID: 26765224
39. Bono V, Augello M, Tincati C, Marchetti G. Failure of CD4+ T-cell Recovery upon Virally-Effective cART: an Enduring Gap in the Understanding of HIV+ Immunological non-Responders. *New Microbiol.* 2022 Jul; 45(3):155–72. PMID: 35920870
40. Adriaensen W, Cuypers B, Cordero CF, Mengasha B, Blessen S, Cnops L, et al. Host transcriptomic signature as alternative test-of-cure in visceral leishmaniasis patients co-infected with HIV. *EBioMedicine* [Internet]. 2020 May; 55:102748. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352396420301237>. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102748> PMID: 32361248
41. Takele Y, Mulaw T, Adem E, Womersley R, Kaforou M, Franssen SU, et al. Recurrent visceral leishmaniasis relapses in HIV co-infected patients are characterized by less efficient immune responses and higher parasite load. *iScience* [Internet]. 2023 Feb; 26(2):105867. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S258900422202140X>. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105867> PMID: 36685039
42. Costa SF, Gomes VO, dos Santos Maciel MO, Melo LM, Venturin GL, Bragato JP, et al. Combined in vitro IL-12 and IL-15 stimulation promotes cellular immune response in dogs with visceral leishmaniasis. Petersen CA, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2020 Jan 21; 14(1):e0008021. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0008021>.
43. Lonsdale J, Thomas J, Salvatore M, Phillips R, Lo E, Shad S, et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet.* 2013 Jun 29; 45(6):580–5. <https://doi.org/10.1038/ng.2653> PMID: 23715323
44. Smedley D, Haider S, Ballester B, Holland R, London D, Thorisson G, et al. BioMart—biological queries made easy. *BMC Genomics.* 2009 Dec 14; 10(1):22. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-22> PMID: 19144180

45. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNAseq aligner. *Bioinformatics*. 2013 Jan 1; 29(1):15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635> PMID: [23104886](#)
46. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015 Jan 15; 31(2):166–9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638> PMID: [25260700](#)