

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS IMUNOMODULATÓRIOS DO P-MAPA EM CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS COM LEISHMANIOSE
VISCERAL**

Maria Emília Bodini Santiago
Médica Veterinária

JABOTICABAL-SÃO PAULO-BRASIL
2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITOS IMUNOMODULATÓRIOS DO P-MAPA EM CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS COM LEISHMANIOSE
VISCERAL**

Maria Emília Bodini Santiago

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Valéria Marçal Felix de Lima

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia (Microbiologia Agropecuária)

JABOTICABAL-SÃO PAULO-BRASIL
2011

S235e Santiago, Maria Emília Bodini
Efeitos imunomodulatórios do P-MAPA em cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral / Maria Emília Bodini Santiago. - - Jaboticabal, 2011.
ix, 70 f.; il. ; 28 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011.

Orientadora: Valéria Marçal Felix de Lima.

Banca examinadora: Cárís Maronis Nunes, Hélio José Montassier, Mirela Tinucci Costa, Vânia Luiza Deperon Bonato Martins.

Bibliografia

1. Leishmaniose Visceral 2. Linfócitos 3. P- MAPA – Fosfolinoleato-Palmitoleato de Magnésio e Amônio Proteico I. Título II. Jaboticabal – Faculdades de Ciências Agrárias e Veterinárias

CDU 619:616.993.161:636.7(043)

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Maria Emília Bodini Santiago – nascida na cidade de Bauru (SP) aos 28 dias de março de 1963. Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (ano de conclusão 1987), possui mestrado em Ciências Animal pela Universidade Estadual Paulista, campus de Araçatuba - SP (2007), aperfeiçoamento em Captura, Manejo e Reprodução de espécies selvagens ameaçadas de extinção por Jersey Wildlife Preservation Trust - UK (1992) e aperfeiçoamento em Biologia da Conservação e Manejo de Vida Selvagem pela Smithsonian Institute (1996), - Nepal, e especialização em Acupuntura Veterinária pelo Instituto Homeopático Jacqueline Peker, Campinas – SP (1999) e Terapia Floral de Minas pelos Florais de Minas – Itaúna – MG (2000). Apresenta vínculo empregatício com a Prefeitura Municipal de Bauru, sendo médica veterinária responsável pelo Parque Zoológico Municipal de Bauru desde 1987 e por 17 anos foi responsável técnica pelo Criadouro Conservacionista de Flamingos “Damásio de Jesus”.

*“Uma árvore de tronco enorme
começa de uma muda fina, como um cabelo;
Uma torre de nove andares
começa sobre um montículo de terra;
Uma caminhada de mil léguas
começa com o primeiro passo.”*

Lao-Tsé
(No livro Tao Te Ching)

*Aos meus Pais, Maria Eliza e Elsio.
Pelo amor, carinho e muita ajuda,
dada durante todo o processo.*

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos devem ser dados a muitos, alguns passaram pela minha vida por um curto espaço de tempo, mas de alguma forma deram sua contribuição, seja para o trabalho que estava sendo desenvolvido ou para o momento da vida que eu estava vivenciando; outros estão há tanto tempo na minha vida que tudo se confunde, às vezes não sei com quem vivi cada fato; por isso, se esqueci de alguém, do passado ou presente, peço desculpas, não foi intencional, foi pura falha de memória devido a “idade”.

Aos meus pais, que por todo o tempo cuidaram da pequena e velha Nicole, com carinho, às vezes aplicando medicamentos sem ter nenhum conhecimento de como manipular remédios, mudando o ritmo de vida para propiciar todo o conforto a ela. Ao apoio, incentivo, amor e carinho dados a mim durante todo o processo.

Aos meus irmãos e irmãs que sempre mostraram preocupação e sempre oferecendo ajuda.

A espiritualidade, em qualquer forma de entendimento, que auxilia meu caminho na vida e que muitas vezes recorri durante este trabalho para facilitar meu entendimento e abrir “minha cabeça”.

À Profa. Dra. Valéria Marçal Felix de Lima pela orientação e idealização do projeto e, principalmente, pela paciência em explicar quantas vezes fossem necessárias.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, campus de Jaboticabal pela oportunidade de realização do curso de doutorado em Microbiologia Agropecuária.

A Fundação de apoio a pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro (2009/50426-9).

Ao Prof. Dr. Danísio Prado Munari pela atenção e realização das análises estatísticas.

Ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Araçatuba e aos funcionários que sempre dispuseram-se a auxiliar.

Aos grandes amigos e amigas de Bauru, Ana Beatriz, pelo amor, carinho e grande ajuda, que muitas vezes viajou comigo apenas para fazer companhia e não deixar-me dormir no caminho, ficando esperando no laboratório pacientemente sem entender nada. A Cláudia que apesar de achar que minha escolha foi maluca, deu o incentivo necessário, grande carinho e auxiliou nos cuidados dos filhotes que passaram na minha vida nestes anos e também, com informações do CCZ de Bauru. Ao Ivan e Erica que todas às vezes, independente da hora, do dia, propuseram-se a vir buscar em casa as queridas e queridos Athena, Cléo, Patrick e Sol, meus amados companheiros. Aos amigos e colegas do Zoológico Municipal, seria impossível citar todos, que ajudaram durante todo o trabalho, mas todos são queridos. A Marcia, pelo carinho e pela grande prova de amizade, por ter normalizado com enorme, e coloca ENORME, paciência, e em nenhum momento ouviu-se uma única reclamação apesar das inúmeras horas passadas sentada e da aventura que precisava passar sempre que tinha vontade de tomar um simples copo de água. A Maria Hermínia e “Seu” Cido e todos de sua “casa” que receberam-me com carinho e amor e em todos os momentos estavam dispostos a auxiliar em qualquer coisa.

As amigas de Araçatuba, Mariana e Larissa que sempre estavam dispostas a ajudar no trabalho prático, em explicar as técnicas laboratoriais e os conceitos de Imunologia e pelas conversas descontraídas do cafezinho. A técnica Juliana que sempre prontificou-se a deixar os materiais do laboratório prontos para eu chegar de Bauru e não perder tempo. Aos outros técnicos que passaram e também sempre auxiliaram Regina, Magna e Almir.

A amiga de muito longe, Tamara que sempre alegremente me ajudou e auxiliou na tradução do artigo.

SUMÁRIO

	Página
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 Agente etiológico	6
2.2 Fosfolinoleato-palmitoleato de magnésio e amônio protéico (P-MAPA)	9
2.2.1 Primeira Parte:.....	10
2.2.2 Segunda parte:.....	11
2.2.3 Terceira parte:.....	11
2.2.4 Pesquisas realizadas com o P-MAPA.....	12
2.3 Patologia da LVC	13
III. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Animais.....	19
3.2 Tratamento com P- MAPA	20
3.3 Teste <i>in vitro</i> da ação citotóxica em células mononucleares após a ação do P-MAPA	20
3.4 Atividade leishmanicida do P-MAPA em parasitas livres.....	21
3.5 Toxicidade hepática do P-MAPA	21
3.6 Quantificação de parasitos em biopsia de pele	22
3.7 Avaliação da produção de citocinas no sobrenadante de cultura	22
3.8 Imunofenotipagem de linfócitos por citometria de fluxo.....	24
3.9 Análise estatística	26
IV. RESULTADOS	27
4.1 Ação citotóxica, leishmanicida e efeitos hepatotóxicos do P-MAPA	27
4.2 Acompanhamento dos sinais clínicos.....	28
4.3 Avaliação da carga parasitária na pele no grupo tratado e controle	29
4.4 Dosagem de IL2, IL-10 e INF- γ	31

4.5 Imunofenotipagem dos linfócitos.....	33
V. DISCUSSÃO	35
VI. CONCLUSÕES	40
VII. REFERÊNCIAS	41

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
ALT	Alanina transaminase
AST	Aspartato transaminase
BSA	Albumina sérica bovina
CCZ	Centro de controle de zoonoses
DL-50	Dose letal de 50%
ELISA	Ensaio imunoenzimático em fase sólida
IL	Interleucina (1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12)
INF- γ	Interferon-gama
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
mL	Mililitro
mg/mL	miligrama por mililitro
NK	Células exterminadoras naturais
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação de Polimerase em Cadeira
P-MAPA	Fosfolinoleato-palmitoleato de magnésio e amônio proteico
Rpm	Rotações por minuto (unidade de medida de velocidade angular)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TGF- β	Fator beta de transformação de crescimento
TMB	3,3', 5,5` - tetramethylbenzedina
TNF- α	Fator alfa de necrose tumoral

LISTA DE TABELA E FIGURAS

Figuras

- A Classificação taxonômica do gênero *Leishmania*, a partir da família Trypanosomatidae. A espécie *L. chagasi*, agente patogênico da leishmaniose visceral no Brasil, está sendo considerada como sendo a mesma espécie que a *L. infantum*, agente etiológico da leishmaniose visceral na Europa (WHO, 2010). 7
- B Ciclo da transmissão das leishmanioses cutânea e visceral. Durante o repasto sanguíneo das fêmeas de flebotomídeos, ocorre a infecção do hospedeiro vertebrado pelas formas promastigotas do parasito *Leishmania* spp. e a infecção do hospedeiro invertebrado pelas formas amastigotas (Fonte WHO, 2010). 8
- C A seleção elíptica representa a população de mononucleares da amostra de sangue periférico de cães sintomáticos para LV. 25
- D Observa-se no quadrante inferior esquerdo as células não marcadas, no quadrante superior esquerdo as células marcadas somente com CD3 (CD3+/CD8-) e no quadrante superior direito as células duplamente marcadas (CD3+/CD8+). 25
- E Observa-se no quadrante inferior esquerdo as células não marcadas, no quadrante superior esquerdo as células marcadas somente com CD3 (CD3+/CD4-) e no quadrante superior direito as células duplamente marcadas (CD3+/CD4+). 26
- 1 O imunomodulador P-MAPA não apresentou alteração na viabilidade das formas de promastigotas de *Leishmania chagasi* após a estimulação “in vitro” em diferentes 27

	concentrações ($\mu\text{g/mL}$). Como controle, foram utilizadas formas promastigotas mortas por congelamento.	
2	A viabilidade de células mononucleares, de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania chagasi</i> , após estimulação <i>in vitro</i> com o imunomodulador P-MAPA não apresentou alterações em diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$). Como controle, foram utilizadas células mononucleares mortas.	28
3	Sinais clínicos apresentados pelos 10 animais do grupo tratado, antes e depois do tratamento com o P- MAPA.	39
4	Carga parasitária mediana pele de cães, do grupo controle e do grupo tratado, após 45 dias de tratamento com o imunomodulador P-MAPA. * Diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.	31
5	Produção de IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares de cães sintomáticos para LV não tratados (controle - cont) ou tratados (trat) com P-MAPA. Houve uma redução significativa na produção de IL-10 no sobrenadante de cultura de células mononucleares não estimuladas ou estimuladas com antígeno de <i>Leishmania chagasi</i> no grupo tratado. M = meio basal, Fito= fitohemaglutinina, Ag = antígeno. * Diferença estatisticamente significativa.	32
6	Produção de INF- γ em sobrenadante de cultura de células mononucleares de cães sintomáticos para LV não tratados (controle - cont) ou tratados (trat) com P-MAPA. Houve um aumento significativo na produção de INF- γ no sobrenadante de cultura das células estimuladas com fitohemaglutinina ou estimuladas com antígeno de <i>Leishmania chagasi</i> no grupo tratado. M = meio basal, Fito= fitohemaglutinina, Ag = antígeno. * Diferença estatisticamente significativa.	32

- 7 Produção de IL- 2 em sobrenadante de cultura de células mononucleares de cães sintomáticos para LV não tratados (controle - cont) ou tratados (trat) com P-MAPA. Houve um aumento significativo de produção de IL-2 no sobrenadante de cultura das células estimuladas com fitohemaglutinina ou estimuladas com antígeno de *Leishmania chagasi* do grupo tratado. M = meio basal, Fito= fitohemaglutinina, Ag = antígeno. * Diferença estatisticamente significante. 33
- 8 Comparação das populações de células TCD4+ e TCD8+ entre os grupos controle (ct) e tratado (trat) após 45 dias de aplicação do imunomodulador P-MAPA. O aumento de linfócitos TCD8+ em sangue periférico de cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp. do grupo tratado (trat) apresentou diferença estatisticamente significante (*). 34

Tabela

Página

- 1 Carga parasitária obtida nas amostras de pele de cães do grupo tratado, naturalmente infectados por *Leishmania* spp., antes e após o tratamento P-MAPA. 30

EFEITOS IMUNOMODULATÓRIOS DO P-MAPA EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO - O presente estudo investiga *in vitro* a ação leishmanicida do imunomodulador fosfolinoleato-palmitoleato de magnésio e amônio proteico (P-MAPA) e sua ação citotóxica em células mononucleares, e *in vivo* seu efeito imunomodulador em cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp. Para avaliar a viabilidade celular após a ação do P-MAPA utilizou-se o ensaio colorimétrico com (3 - (4,5-dimetil-2-il) -2,5-difenil tetrazolium brometo (MTT), onde células mononucleares derivadas de sangue periférico foram cultivadas com diferentes concentrações de P- MAPA; 0, 50, 100 e 200 µg/mL em ambiente úmido a 37°C, com 5% de CO₂ por 72 horas. A ação leishmanicida do imunomodulador foi avaliada pelo mesmo método utilizando-se a forma promastigosta de *Leishmania (L.) chagasi*. Para avaliar a ação terapêutica do P-MAPA, vinte cães sem raça definida, com sintomas clínicos compatíveis com leishmaniose e positivos na detecção de anticorpos anti-leishmania pelo método ELISA, foram tratados. Dez cães receberam 15 doses do imunomodulador (2,0 mg/kg), por via intramuscular, e dez receberam solução fisiológica como placebo. Os grupos foram acompanhados para observação da remissão de sinais clínicos, no grupo tratado e controle foram colhidas amostras de pele antes e após a administração do imunomodulador para quantificação da carga parasitária, ao final do tratamento amostras de sangue periférico foram utilizadas para o isolamento de mononucleares e investigação do perfil linfocitário do tipo T e produção das citocinas IL-10, IFN-gama e IL-2 em sobrenadante de cultura celular. A quantificação da carga parasitária nas amostras de pele foi realizada pelo método da PCR em tempo real. O perfil linfocitário do tipo T foi realizado por citometria de fluxo, e a quantificação das citocinas em sobrenadante de cultura pelo método de ELISA de captura. Os resultados dos grupos foram comparados utilizando-se testes não paramétricos e paramétrico. Foi observado *in vitro* que o P-MAPA não altera a viabilidade celular e não possui ação leishmanicida. A comparação dos grupos mostrou que o tratamento com imunomodulador promoveu remissão de

sinais clínicos, redução significativa da carga parasitária da pele e aumento de células T CD8+ no sangue periférico, além disso foi observado um aumento da produção de IL-2 e IFN e redução de IL-10. Os dados observados sugerem que o P-MAPA tem potencial como droga terapêutica na leishmaniose visceral canina.

Palavras chave: *Leishmania*, Linfócito TCD4+, Linfócito TCD8++, P- MAPA

IMMUNOMODULATORY EFFECTS OF P-MAPA ON DOGS NATURALLY INFECTED WITH VISCERAL LEISHMANIASIS

SUMMARY- This study investigates the *in vitro* leishmanicidal action of the immunomodulator-phospholipid palmitoleate magnesium and ammonium protein (P-MAPA) together with its cytotoxic action in mononuclear cells. It also investigates, *in vivo*, its immunomodulatory effect in dogs naturally infected by *Leishmania* spp. To assess cell viability after the action of P-MAPA, the colorimetric assay with (3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) was used. These mononuclear cells derived from peripheral blood and were cultured with different concentrations of P-MAPA, 0, 50, 100 and 200 µg/mL in a humid environment at 37 ° C with 5% CO₂ for 72 hours. The leishmanicidal action of immunomodulators was evaluated using the same method to form promastigotes of *Leishmania (L.) chagasi*. To assess the therapeutic action of P-MAPA, twenty mongrel dogs, with clinical symptoms compatible with leishmaniasis and positive detection of anti-leishmania antibodies by ELISA assay were treated. Ten dogs received 15 doses of the immunomodulator (2.0 mg / kg) intramuscularly, and ten received saline solution as placebo. The groups were followed for observation of clinical signs of remission; in the both groups, skin samples were collected before and after administration of the immunomodulator to quantify the parasite load. At the end of treatment, peripheral blood samples were used for the isolation of mononuclears, the profile investigation of type T lymphocytes, together with the production of IL-10, IFN-gamma and IL-2 cytokines in cell culture supernatant. The quantification of parasite load in the samples was performed by PCR in real time. The profile of type T lymphocytes was performed by flow cytometry, and quantification of cytokines in culture supernatants by ELISA capture. The results of groups were compared using nonparametric and parametric tests. It has been observed *in vitro* that P-MAPA does not affect cell viability and has no leishmanicidal action. The comparison of groups showed that the treatment with immunomodulator promoted remission of clinical signs, the significant

reduction in parasite load of the skin and increase of CD8+ T cells in peripheral blood. The findings suggest that P-MAPA has potential as a therapeutic drug in canine visceral leishmaniasis.

Keywords: CD4+T, CD8+T, *Leishmania*, T lymphocytes, P-MAPA

I. INTRODUÇÃO

As leishmanioses ainda continuam a ser uma das doenças mais negligenciadas do mundo, afetando principalmente os países e os cidadãos mais pobres. Países em desenvolvimento e desenvolvidos, também apresentam a ocorrência da patologia. A estimativa é que 350 milhões de pessoas estão em risco de contrair um dos tipos de leishmaniose e a perspectiva de ocorrência de novos casos é de 2 milhões/ano (WHO, 2010).

A Organização Mundial para Saúde (OMS) classificou as leishmanioses na categoria 1, que são as doenças emergentes e sem controle, e as medidas de prevenção devem ser focadas no controle do vetor, dos animais reservatórios e na pesquisa de vacinas eficientes (ROBERTS, 2006).

No Brasil, apesar das tentativas de controle, os casos da doença na forma visceral humana, nos últimos 20 anos, aumentaram e atingiram centros urbanos (BRASIL, 2006). O programa de controle brasileiro, nos últimos 40 anos, é composto da distribuição gratuita do tratamento específico nas unidades públicas de saúde, o controle de reservatórios domésticos, através da identificação e eutanásia dos cães positivos, e o controle de vetores (COSTA; VIERA, 2001). Em torno de 200 a 300 brasileiros morrem anualmente decorrente da leishmaniose visceral (LV) (COSTA, 2008).

Um dos itens mais controversos e alvo de grandes discussões do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil é o sacrifício dos cães positivos para LV. Em relação a este item, no encontro de 2000 do comitê técnico para avaliação do programa de controle da leishmaniose visceral, foram identificados 10 pontos vulneráveis nesta prática. COSTA e VIEIRA (2001) enumeram os pontos:

“1) a falta de correlação espacial entra a incidência cumulativa de LV humana com a soroprevalência canina. 2) A ausência de risco significativo de coabitação com cães para aquisição de LV. 3) A demonstração teórica de que é um método pouco eficiente em comparação com as estratégias de controle vetorial e de suplementação alimentar. 4) A demonstração de que outros

reservatórios podem ser fontes de infecção de *Leishmania chagasi*, tais como pessoas (particularmente crianças desnutridas que podem transmitir para outras crianças), canídeos silvestres e marsupiais. 5) A grande velocidade com que a população canina é reposta, exigindo proporção e frequência de retiradas de cães soropositivos impraticáveis. 6) A baixa eficiência dos testes sorológicos em detectar infecção canina. 7) A utilização de um único método para efetuar as duas funções de teste de triagem e de teste confirmatório para infecção por *L. chagasi*; isto conduz a elevado custo por benefício devido à alta proporção de resultados falso-positivos, particularmente quando a prevalência real é baixa. 8) A falta de indicadores clínicos ou laboratoriais de infectividade de cães para o vetor. 9) A ausência de experiências anteriores que tenham demonstrado vantagens exclusivas da eliminação de cães, pois todos os relatos de sucesso de programas de controle de LV onde foram eliminados cães descrevem também o controle de vetores com inseticidas. 10) A publicação de observações e ensaios em que se verificou que quando esta medida foi aplicada sozinha, não houve demonstração inequívoca da vantagem de seu uso em reduzir a incidência de LV em seres humanos.”

Os consultores, presentes neste encontro, ainda enfatizaram a prioridade ao controle do vetor.

Estes argumentos enfatizam o ponto de vista defendido por DYE (1996) que argumenta que a eliminação de cães é um método de controle relativamente ineficaz e que a melhor estratégia seria a utilização de inseticidas residuais e o desenvolvimento de vacinas.

Reforçando esta tese, modelos matemáticos provam que a melhor medida em termos de relação eficácia/custo para o controle da leishmaniose visceral zoonótica é a utilização de inseticidas, nas suas distintas apresentações, sempre que se tratar de um foco com flebótomos de hábitos domésticos/peridomésticos. Em segundo lugar, as medidas mais adequadas para reduzir a incidência humana são as vacinas dirigidas a pessoas e a

cães e o combate à desnutrição infantil. A medida menos vantajosa, segundo esses mesmos modelos matemáticos, é o sacrifício de cães infectados. No entanto, o controle da leishmaniose canina com o objetivo final de reduzir o número de casos de leishmaniose humana, tem se baseado no sacrifício dos cães (FONSECA, 2009).

Os tratamentos para as leishmanioses humanas ainda estão baseados no uso de antimoniais que tiveram sua utilização iniciada em 1912 para a forma cutânea e 1915 para forma visceral, os primeiros registros de resistência a esta droga datam de 1970 (WHO, 2010).

O tratamento da leishmaniose visceral canina (LVC), no Brasil, é restrito pela portaria interministerial nº 1426 de 2008, que proíbe o tratamento de cães portadores de leishmaniose com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2008). O Comitê Técnico para avaliação do Programa Brasileiro de controle da LVC também recomenda que os cães doentes não sejam tratados com as drogas atualmente disponíveis para o tratamento humano (COSTA e VIEIRA, 2001). Em contraste, nos países Europeus, o tratamento da LVC é feito rotineiramente com os mesmos medicamentos utilizados no tratamento humano (POLI et al., 1997; BANETH; SHAW, 2002; GUARGA et al., 2002; NOLI; AUXILIA, 2005).

O desenvolvimento de drogas imunomodulatórias para o tratamento da leishmaniose canina esta baseada principalmente na patogênese e progressão da doença canina, uma vez que a supressão da imunidade celular constitui o aspecto mais importante. Em cães infectados com *Leishmania infantum* sinais da supressão imunológica são a redução do número de linfócitos T no sangue periférico (HERVÁS et al., 1996, BOURDOISEAU et al., 1997) e a negatividade do teste intradérmico a antígenos do parasita (DOS-SANTOS et al., 2008).

Devido à forte relação entre a supressão imunológica e o desenvolvimento da doença a atividade imunomodulatória de várias substâncias também vem sendo estudada no tratamento da leishmaniose (SMITH et al., 2000; HUMMADI et al., 2005; MURKHERJEE et al., 2007).

Várias pesquisas para o desenvolvimento de novas drogas imunomodulatórias, para o tratamento das leishmanioses, vêm sendo realizadas, existem estudos a partir

de microrganismos (KEYSER et al., 2001; MA et al., 2004), plantas (WENIGER et al., 2001; ROSA et al., 2003; ARRUDA et al., 2005; TIUMAN et al., 2005; DUTRA et al., 2009), produto homeopático (PEREIRA et al. 2005) e produto natural, como a própolis (CUNHA et al., 2011). A atividade imunomodulatória de várias substâncias também vem sendo estudada no tratamento da leishmaniose (SMITH et al., 2000; HUMMADI et al., 2005; MURKHERJEE et al., 2007).

O imunomodulador fosfolinoleato-palmitoleato de magnésio e amônio proteico (P-MAPA) é um composto obtido por fermentação fúngica a partir do *Aspergillus oryzae*. Sua ação em modelos experimentais murinos inclui a indução da proliferação de linfócitos T, o aumento da produção de citocinas e o aumento da atividade das células NK, o que acarreta uma maior estimulação da imunidade celular (DURÁN, NUNES, 1990; DURÁN et al., 1990,1993, 1999, 2009; MELO et al., 2001). Em estudos toxicológicos verificou-se que o P-MAPA é seguro em roedores, macacos e humanos, e também não apresenta efeitos teratogênicos em estudos realizados *in vitro* e *in vivo* (FARMABRASILIS, 2011). Em cães, estudos clínicos sobre os efeitos do P-MAPA no organismo ainda não foram realizados.

Considerando que o sacrifício dos cães domésticos positivos não apresenta os resultados esperados no controle da LVH, que o sacrifício dos cães domésticos atualmente apresenta um grande problema social e ainda, considerando as dúvidas que existem em relação à transmissão cão para o humano, novos medicamentos, mais seguros e com menos efeitos colaterais, devem ser pesquisados com o intuito de realizar o tratamento da LVC.

O presente estudo tem como objetivo analisar os seguintes parâmetros:

- A toxicidade do imunomodulador sobre culturas de mononucleares *in vitro*;
- O efeito do imunomodulador sobre promastigotas vivas de *Leishmania chagasi in vitro*;
- O efeito na melhora dos sinais clínicos, comparando cães sintomáticos infectados tratados e cães infectados não tratados;
- A carga parasitária na pele de cães tratados e não tratados;
- A densidade das células TCD4+ e TCD8+ em células mononucleares de sangue periférico;

- Os níveis das citocinas, Interleucinas (IL) 2 e 10 e Interferon-gama (INF- γ) em sobrenadante de cultura de células mononucleares.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Agente etiológico

Os agentes causadores das leishmanioses são protozoários flagelados da ordem Kinetoplastida que são reconhecidos pela presença de 1 ou 2 flagelos e pelo Cinetoplasto. Nesta ordem está incluída a família Trypanosomatidae que são todos parasitas obrigatórios (FRANCO, 1990).

A família Trypanosomatidae compreende dois grupos, o grupo dos monogenéticos (ou monóxenos), que parasitam apenas um hospedeiro invertebrado, principalmente os insetos e são representados pelos gêneros *Leptomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia* e *Herpetomonas*; e o grupo dos digenéticos (ou heteróxenos) que durante o ciclo passam alternadamente por dois hospedeiros, um invertebrado e um animal vertebrado ou uma planta, sendo este grupo representado pelos gêneros *Leishmania*, *Endotrypanum*, *Trypanosoma* e *Phytomonas* (FRANCO, 1990) (Figura A).

As leishmanioses são doenças que podem apresentar-se na forma cutânea, mucocutânea ou visceral, dependendo da espécie e da resposta imune do hospedeiro (GRIMALDI et al. 1991).

Das 30 espécies de *Leishmania* conhecidas (SHAW, 1994 *apud* BRANDÃO FILHO, 2001), 22 espécies são capazes de infectar a espécie humana (LAURENTI, 2010). Dessas 30 espécies, dez ocorrem apenas no Velho Mundo e vinte ocorrem no Novo Mundo (SHAW, 1994 *apud* BRANDÃO FILHO, 2001). As espécies que mais comuns no velho mundo são: *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* e o complexo donovani, que inclui a *L. donovani* e a *L. infantum*. E as espécies mais comuns do novo mundo são: *L. mexicana*, *L. amazonensis* e o complexo Viannia que inclui a *L. braziliensis* e a *L. guyanensis*, entre outras (ROBERTS, 2006).

Na forma dermatrófica, atualmente nas Américas, são reconhecidas onze espécies causadoras da doença em humanos e oito espécies que acometem somente animais. No Brasil, foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania* (HORIMOTO; COSTA, 2009).

Nesta forma de apresentação, a doença aparece sob a forma de úlceras de pele que pode regredir espontaneamente ou evoluir, necessitando neste caso de tratamento (GRIMALDI et al., 1991).

A forma visceral, também conhecida por Calazar, é causada pelos parasitas pertencentes ao complexo *donovani*, tendo três espécies, de acordo com a região geográfica de ocorrência; a espécie *Leishmania donovani* é registrada na Ásia e África, a *L. infantum* na Ásia, Europa e África e *L. chagasi* nas Américas (LAVERAN; MESNIL, 1903; ROSS, 1903; NICOLE, 1908; CUNHA; CHAGAS, 1937; LAINSON; SHAW, 1987) (Figura A).

Alguns pesquisadores utilizam a classificação *L. infantum/chagasi* para o parasita nas Américas devido as semelhanças entre estes dois agentes etiológicos, verificadas em estudos moleculares (MAURÍCIO et al., 1999; JERONIMO et al. 2005).

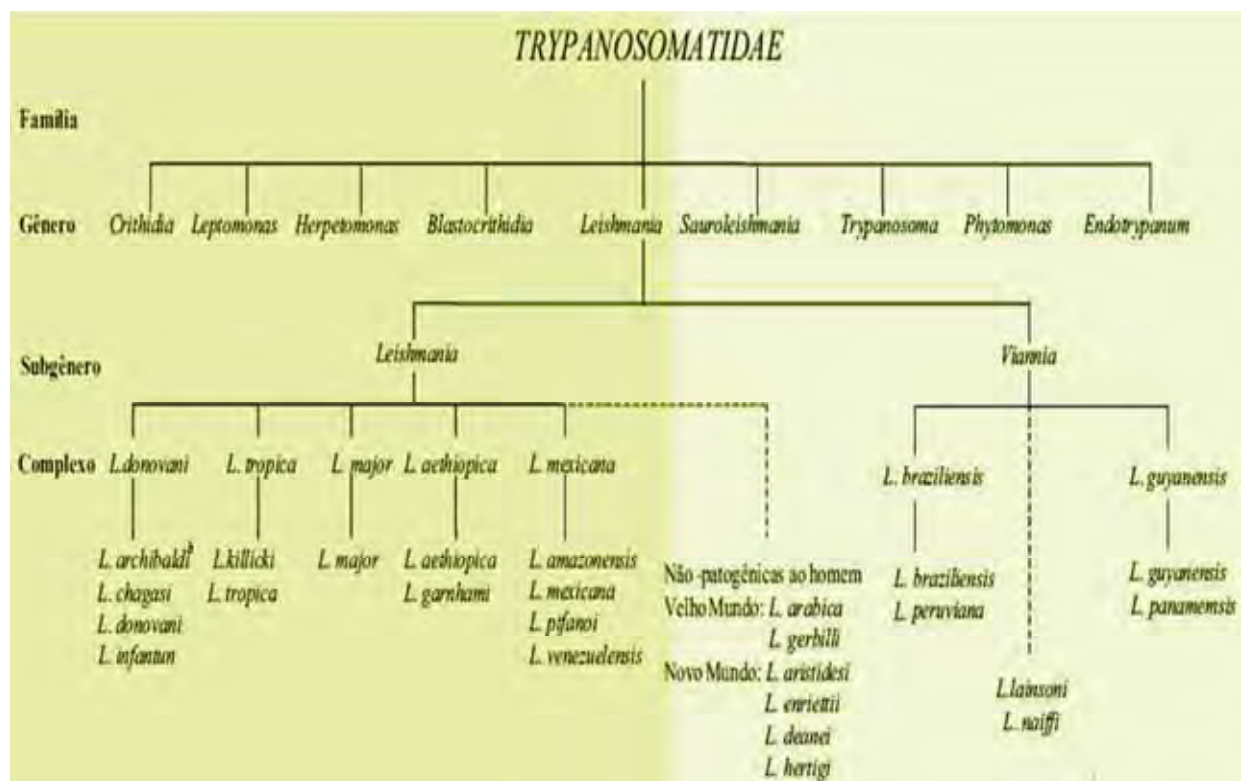


Figura A. Classificação taxonômica do gênero *Leishmania*, a partir da família Trypanosomatidae. A espécie *L. chagasi*, agente patogênico da leishmaniose visceral no Brasil, está sendo considerada como sendo a mesma espécie que a *L. infantum*, agente etiológico da leishmaniose visceral na Europa (WHO, 2010).

O ciclo de transmissão das leishmanioses ocorre através dos vetores hematófagos infectados. No Brasil, o mosquito palha (*Lutzomyia* spp.) é um dos responsáveis pela transmissão (WENIGER et al., 2001). No trato digestivo do vetor hematófago a *Leishmania* apresenta-se sob a forma promastigota e multiplica-se, sendo transmitida para o hospedeiro definitivo durante o repasto sanguíneo (Figura. B). No hospedeiro mamífero, a forma promastigota transforma-se na forma amastigota e multiplica-se dentro dos macrófagos (RITTING; BOGDAN, 2000).

A forma visceral pode apresentar duas formas de transmissão, a zoonótica, onde um animal transmite para o vetor e este, contamina o homem, e a transmissão antroponótica, onde o homem transmite para o vetor, e deste para outro ser humano. A transmissão zoonótica é mais encontrada nas áreas de ocorrência da *L. infantum* e a antroponótica é encontrada nas áreas de ocorrência da *L. donovani* (CHAPUIS et al., 2007).



Figura B- Ciclo da transmissão das leishmanioses cutânea e visceral. Durante o repasto sanguíneo das fêmeas de flebotomíneos, ocorre a infecção do hospedeiro vertebrado pelas formas promastigotas do parasito *Leishmania* spp. e a infecção do hospedeiro invertebrado pelas formas amastigotas (Fonte WHO, 2010).

Existe a possibilidade de outras formas de infecção, nos cães pode ocorrer através das transfusões de sangue, por via vertical (FONSECA, 2009) e através de parasitas hematófagos externos, como pulgas (FERREIRA et al., 2009) e carrapatos (COUTINHO et al., 2005), cuja importância epidemiológica, nestas duas últimas formas, carece de estudos. Em humanos também pode ocorrer através da partilha de seringas por toxicodependentes (CRUZ et al., 2002), por transfusões sanguíneas (LUZ et al., 1997; OTERO et al. 2000), transplantes de órgãos (MARTIN-DAVILA et al., 2008) e por transmissão vertical (FIGUEIREDO FILHO et al. 2005).

No Brasil, nos últimos anos, tem sido registrada a urbanização da forma viscerotrópica (COSTA, 2008). As possíveis causas podem estar ligadas as alterações ambientais provocadas pelo homem, as migrações para as áreas periféricas dos centros urbanos, caracterizadas pela falta de infraestrutura sanitária e pela interação entre cães e os reservatórios silvestres (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

A LVC é mais prevalente que a humana, e do ponto de vista epidemiológico, mais importante, visto que o grande número de animais assintomáticos serve como fonte de infecção para os vetores (DE ANDRADE et al., 2007; LARANGEIRA, 2009).

2.2. Fosfolinoleato-palmitoleato de magnésio e amônio proteico (P-MAPA)

O agregado P-MAPA está registrado sob a patente número 5.073.630 de 17 de dezembro de 1991. Conforme descrito no registro de patente, o agregado é composto de magnésio ($20,1 \pm 0,9\%$), amônio ($10,0 \pm 3,3\%$), fosfato ($45,2 \pm 2,7\%$), ácido linoleico ($11,6 \pm 4,3\%$), proteína total ($0,49 \pm 0,07\%$), ácido aspártico (7,19%), treonina (3,56%), Serina (7,56%), ácido glutâmico (8,53%), prolina (0,5%), glicina (9,62%), alanina (7,46%), valina (1,0%), metionina (4,38%), isoleucina (2,54%), leucina (3,03%), tirosina (0,5%), fenilalanina (1,0%), histidina (2,83%), lisina (3,56%), triptofano (1,3%) e arginina (35,2%) (US PATENT, 1991).

O imunomodulador é produzido a partir de cultura selecionada de *Aspergillus oryzae* (FARMABRASILIS, 2011) e o processo de obtenção é em cultura de aveia,

aquecida à temperatura de 30/35°C, em pH 3-4, com baixa aeração (10l/m) e agitação (40rph) nas primeiras 48 horas de produção. Após 120 horas de fermentação, o produto é filtrado, lavado em água e acetona, sendo a solução precipitada em pH 11. Finalmente os cristais precipitados são lavados com éter sulfúrico e secos (US PATENT, 1991).

O imunomodulador foi desenvolvido pelo médico Odilon da Silva Nunes, natural da cidade de Birigui – SP. A criação do P-MAPA pode ser dividida em três partes. Na primeira, o médico trabalhou sozinho em seu próprio laboratório em sua cidade natal entre os anos de 1950 a 1985, criando um composto químico para combater câncer em modelos animais. A segunda parte vai de 1985 até o final de 1990 e consiste da construção de uma rede de pesquisa para aprimorar a molécula original, que levou aos testes pré-clínicos e clínicos. A terceira fase consiste da criação de um modelo inovador para desenvolvimento de medicamentos dirigido a populações e doenças negligenciadas (FIORAVANTI, 2007).

2.2.1 Primeira Parte:

O interesse por produtos medicamentosos começou desde a idade de 10 anos, quando colecionada diversas espécies de fungos, preparava macerados e utilizava-os para cobrir pequenos ferimentos de animais domésticos. Aos 17 anos descobriu um fungo com propriedades anti-infecciosas e cicatrizantes quando aplicado diretamente sobre os ferimentos de animais, a partir daí, começou a tentar selecionar extratos derivados de fungos. Após se formar em medicina, em 1954, Dr. Odilon retornou a cidade de Birigui onde clinicava e realiza pesquisas. Em um cômodo do consultório, montou um laboratório de química e biologia, onde mantinha uma grande variedade de fungos e camundongos com tumores que utilizava em pesquisa de regressão tumoral.

No início de 1960, Dr. Odilon isolou um extrato que aparentemente induzia regressão tumoral em camundongos e não causava a morte dos animais. Em 1973, os componentes ativos foram extraídos, sendo o primeiro imunomodulador denominado de SB-73.

Nos anos de 1980, durante a epidemia de parvovírus canino no estado de São Paulo, o composto SB-73 foi utilizado em cerca de 250 cães infectados durante 3 dias e apresentou uma taxa de recuperação de 95%. Em cães com cinomose, sem sintomatologia

nervosa, os resultados obtidos foram similares. O imunomodulador também foi utilizado em 40 galinhas com o vírus de *Newcastle* por 4 dias, tendo sido obtido uma taxa de 100% de recuperação, enquanto galinhas tratadas com outros medicamentos vieram a óbito após três dias do aparecimento dos sintomas.

2.2.2 Segunda parte:

Em 1985, o Dr. Odilon em conjunto com o filho, Iseu Nunes apresentaram um resumo dos resultados obtidos do SB-73 com camundongos no encontro da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC). Neste mesmo ano, associaram-se ao professor chileno Nelson Eduardo Durán Caballero, do Instituto de Química da UNICAMP que deu início ao estudo formal do imunomodulador.

Em 1987, os três criaram uma organização não governamental que permitiu trabalhar em três campos distintos: a pesquisa acadêmica, os direitos de propriedade e o desenvolvimento tecnológico. Os estudos pré-clínicos, em camundongos, ratos e macacos, foram realizados em duas universidades públicas e três empresas em três diferentes cidades, sendo concluídos em 1991, mostrando que esse imunomodulador não apresentava efeitos tóxicos relevantes.

Nos anos de 1991 e 1992 apresentaram, em conferências na Itália e Holanda, os resultados positivos de um experimento simples realizado com 25 portadores de HIV.

2.2.3 Terceira parte:

O próximo passo foi transformar a organização não governamental em uma rede de pesquisa farmacêutica internacional sem fins lucrativos, a Farmabrasilis. Nesta época, a substância estava rebatizada de P-MAPA e o Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (NIAID), um ramo dos Institutos Nacionais de Saúde (NIH) dos Estados Unidos, realizaram testes de respostas virais em modelos de viroses em animais. Os testes detectaram a produção de interferon-gama (INF- γ).

O lema da rede é “Ciência com Responsabilidade Social”; a Farmabrilis anunciou que seus novos medicamentos, depois de aprovados pelas autoridades regulatórias, poderão ser “licenciados sem *royalties* quando necessário, de modo a estender o uso para populações que de outro modo seriam incapazes de comprá-los”.

2.2.4. Pesquisas realizadas com o P-MAPA:

Os efeitos do uso diário do imunomodulador em parâmetros sanguíneos e órgãos de *Cebus apella* (macaco prego) foram estudados pelo período de 30 dias. Neste estudo, foram utilizados 23 animais que receberam injeções IM, em 3 concentrações diferentes. O estudo avaliou que não ocorreram alterações tóxicas nos parâmetros hematológicos e nos órgãos desses animais, nas 3 dosagens utilizadas do imunomodulador. Houve redução dos níveis de colesterol e triglicérides e não ocorreram alterações nos níveis de glicose, proteína total, albumina e AST (OLIVEIRA *et al.*, 1992).

Também não apresentou efeitos teratogênicos quando utilizados em altas dosagens em camundongos prenhes, as análises mostraram desenvolvimento e proliferação celulares normais nas estruturas analisadas (HETEM *et al.*, 1992).

JUSTO *et al.* (2003) mostraram que o P-MAPA diminui a taxa de crescimento e reverte a imunossupressão induzida por tumores através da redução na função das células “natural killer” (NK), pelo aumento de produção de IL-2 e INF- γ em camundongos com tumor de Ehrlich.

O P-MAPA apresentou taxa de cura de 95,7%, após 7 dias de tratamento em pacientes humanos portadores de lesões provocada pelo herpes tipo1 e tipo2, sendo que os pacientes não relataram efeitos adversos após o uso, ao contrário do que foi relatado pelos pacientes que fizeram uso do medicamento Aciclovir, medicação normalmente utilizado nestes casos (NUNES; PEREIRA, 2008).

Em um estudo com 25 portadores do vírus HIV, o uso do imunomodulador mostrou melhora em todos os pacientes, mas as melhores respostas foram obtidas com portadores no estágio II e III (NUNES *et al.*, 1991).

O uso do P-MAPA promoveu um aumento das subpopulações de linfócitos TCD4+ e TCD8+ em pacientes humanos portadores de hepatite e imunocomprometidos (FARMABRASILIS, 2011).

2.3. Patologia da LVC

O período de incubação da LVC é variado, cães experimentalmente infectados, apresentaram sintomas entre 3 meses a vários anos (GENARO, 1993).

Os sinais clínicos apresentados pelos cães são, na maioria dos casos inespecíficos, podendo ser confundidos com diversas patologias (GENARO, 1993).

Em relação aos aspectos clínicos, cães infectados podem apresentar a doença sob três formas: assintomático, animais que não apresentam sinais clínicos da infecção; oligossintomáticos onde os animais acometidos podem apresentar alguns sinais como, linfadenopatia, pequena perda de peso e alopecia; e sintomáticos onde vários sinais da doença estão presentes, como hiporexia, lesões cutâneas, onicogribose, ceratoconjuntivite, epistaxe, claudicação, anemia, insuficiência renal, diarreia e outros (CIARAMELLA et al. 1997; FERRER, 1999).

Outros sinais clínicos observados em cães podem ser: atrofia muscular, edema de membros, paresia de membros, melena, apatia, emaciação, uveíte (MARZOCHI et al., 1985; GENARO, 1993), manifestações neurológicas e alterações na composição do liquor nos casos de LVC cerebral (VIÑUELAS et al., 2001).

Alguns cães podem apresentar sinais de uma hepatite crônica ativa devido à multiplicação do protozoário, na forma de amastigotas, nos macrófagos hepáticos ou apresentar glomerulonefrite membranoproliferativa e nefrite túbulo-intersticial, devido à deposição de imunocomplexos nos rins. Nestes casos, a doença pode progredir para um quadro de síndrome nefrótica ou insuficiência renal crônica (FERRER, 1992, 1999).

A doença também provoca alterações dermatológicas, mas normalmente estas alterações não ocorrem sozinhas, podendo ser observado à presença de outros sinais clínicos (FERRER et al., 1992). Os sinais dermatológicos mais comuns são: a dermatite esfoliativa com formação de caspas, hipotriquose e alopecia não pruriginosa, dermatites ulcerativas, formação de pústulas e nódulos, hiperkeratose e despigmentação do focinho e

dos coxins, descamação e alopecia focais do focinho e região peri-ocular e onicogribose (GENARO, 1993; SOLANO-GALLENO et al., 2004, REIS et al., 2009).

A desnutrição observada em cães acometidos por LV pode ser um fator predisponente de agravamento da doença, uma vez que em humanos, a perda de peso devido a desnutrição proteica calórica predispõe esta população a um quadro clínico mais severo de leishmaniose visceral (MALAFAIA, 2008; MACIEL, 2008) e camundongos da linhagem BALB/c com desnutrição apresentam taxa de produção reduzida de INF- γ (SERAFIM et al., 2010).

Em relação às alterações sanguíneas em cães, uma das principais alterações é a ocorrência da disproteinemia devido à resposta imune humoral observada após a infecção. Este desequilíbrio é devido à hiperglobulinemia em razão de um aumento das frações α , β e γ -globulinas e hipoalbuminemia, com consequente inversão da razão albumina/globulina (NOLI, 1999; REIS et al., 2006).

O hemograma de cães sintomáticos pode apresentar um quadro de anemia normocítica, normocrômica não regenerativa (COSTA-VAL et al., 2007) e leucopenia devido a eosinopenia, linfopenia e monocitopenia (ABREU, 2008).

O parasita *Leishmania* spp. apresenta uma ampla variedade antigênica que permite a interação com as células do hospedeiro levando a liberação de mediadores e ativação de células da resposta imunitária inata e adaptativa. As formas promastigotas invadem preferencialmente macrófagos ou células dendríticas que estão envolvidas na destruição do parasito e na liberação de mediadores envolvidos na interação parasito-hospedeiro (MARTINEZ et al., 2009).

A leishmaniose nos vertebrados pode ocorrer devido a habilidade do parasita em resistir a ação microbicida dos macrófagos ativados e a inibição da resposta imune celular do hospedeiro (GRIMALDI; TESH, 1993).

A infecção tem início com a picada do vetor transmissor que inocula normalmente cerca de 100 a 1000 parasitas na forma de promastigotas metacíclicas que são rapidamente englobadas por leucócitos, principalmente os macrófagos, os neutrófilos e as células dendríticas (ROBERTS, 2006). A saliva dos vetores também apresenta fatores de

virulência que permitem a invasão da forma promastigota no macrófago, favorecendo que a doença ocorra mesmo com baixa inoculação parasitária (LAURENTI, 2010).

A resposta imunitária à *Leishmania* é iniciada no local de entrada do parasito através das células sentinelas, incluindo células dendríticas e macrófagos, onde as formas promastigotas de *Leishmania* spp. são interiorizadas por fagocitose, formando um fagossomo que se une com lisossomos para formar um fagolisossomo (RITTIG; BOGDAN, 2000). Os parasitas apresentam uma grande variedade de mecanismos de virulência que possibilitam que a forma amastigota sobreviva no fagolisossoma (HOMMEL, 1999).

A partir de uma infecção cutânea localizada, pode ocorrer a disseminação do parasita através da via linfática ou sanguínea, infectando macrófagos da medula óssea, linfonodo, baço, rim e trato gastrointestinal (GENARO et al., 1988).

Macrófagos são células frequentes no local da infecção e apresentam múltiplas funções: servem como células hospedeiras na multiplicação do parasito, como célula apresentadora de antígenos e como células produtoras de citocinas moduladoras da resposta mediada por linfócitos T. Estas células mediam a ativação de células Th1 que agem sobre os macrófagos infectados como efetores para a morte intracelular do parasito (ZER et al., 2001).

A *L. chagasi* causa um parasitismo intenso no sistema reticuloendotelial, ocasionando alterações expressivas da resposta celular e humoral, com deficiência de INF- γ , aumento da produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e de outras interleucinas (GAMA et al., 2004).

As células TCD4+ dividem-se em duas subpopulações, em Th1 que secretam IL-2, IL-12 e INF- γ , induzindo a ativação de macrófagos e a resposta celular (CHER; MOSMANN, 1987), a subpopulação Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-10 e o fator de transformação de crescimento- β (TGF- β) que auxilia na resposta humoral e as reações alérgicas (BACELLAR et al., 2000).

As citocinas irão regular positivamente (IL-2, INF- γ e TNF- α) ou negativamente (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) a atividade do macrófago na eliminação do parasito (LAURENTI, 2010).

A IL-10 é uma proteína produzida como resultado da ativação imunológica da subpopulações de células T e B e também por macrófagos e monócitos (HOWARD et al. 1993).

Na forma visceral da doença a IL- 10, por ser uma citocina inibidora da resposta imune, principalmente por antagonizar a ação do IFN- γ (BACELLAR; CARVALHO, 2005) e ainda por estar envolvida no bloqueio de sua produção e na regulação da IL-12 (COSTA, 2009) influencia na resolução da infecção.

Embora desprovida de propriedades proinflamatórias (KUHN et al., 1993), a IL-10 claramente tem o potencial de incapacitar a defesa do hospedeiro contra a *Leishmania* spp. e levar à infecção visceral e em paralelo, enfraquecer a responsividade aos quimioterápicos, em camundongos (MURRAY et al., 2002).

Entretanto o papel da IL-10 na LVC ainda é controverso. Em cultura de sobrenadante de cultura de células mononucleares e do teste ELISA de cães sintomáticos PINELLI et al.(1999) detectaram altos níveis, PINHEIRO et al.(2005) através da mesma metodologia encontraram níveis baixos ou não detectáveis em cães oligossintomáticos ou assintomáticos. SANTOS-GOMES et al. (2002) e CHAMIZO et al. (2005) mostram que em cães assintomáticos a expressão de IL-10 não foi conclusiva, e a produção de IL-2 e INF- γ foram predominantes, enquanto CORREA et al. (2007) encontraram altos níveis de IL-10 no fígado de cães sintomáticos.

Em estudo de correlação entre carga parasitária no baço e níveis de IL-10, foi observado que cães com alta carga parasitária apresentaram altos níveis de IL-10 quando comparados aos cães com média e baixa carga parasitária, sendo que o aumento do parasitismo foi correlacionado com a expressão de IL-10 na presença de INF- γ (LAGE et al., 2007). MICHELIN et al. (2011) encontraram a mesma correlação entre carga parasitária no baço e o nível de TNF- α , sugerindo que os níveis de TNF- α e IL-10 possam ser bons marcadores para avaliar a evolução da doença (MICHELIN et al., 2011).

Não se pode esquecer que a resposta imune ao parasito não é a mesma em todos os órgãos, mas é uma resposta órgão específica (REIS et al., 2009). As respostas imunes dos tipos Th1, Th2 ou mistas, Th1/Th2, são observadas em diferentes órgãos de cães infectados com *L. infantum* e estão correlacionadas com a presença ou ausência de sinais

clínicos e também, com a carga parasitária local (BOGGIATTO et al, 2010; BRACHELENTE et al., 2005; STRAUSS-AYALI et al., 2007).

Diversos estudos sugerem um papel regulador importante na resposta imunológica na leishmaniose para as citocinas IL-2 e IFN- γ . A IL-2 é produzida por linfócitos T e tem a função de induzir a proliferação e diferenciação das células T (FREITAS; PINHEIRO, 2010), enquanto o IFN- γ é produzido principalmente por células TCD4⁺ do tipo Th1 e por células NK que são estimuladas por IL-2. E estudos experimentais com animais e em humanos a produção de IL-2 e IFN- γ é baixa durante a patologia e após o tratamento tem sido observado o retorno a níveis normais (PASTORINO, 2002).

A produção do IFN- γ ativa a óxido nítrico sintetase induzível, levando a ação microbicida mediada pelo óxido nítrico. A liberação deste fator leva à morte do parasita em macrófagos (BACELLAR; CARVALHO; 2005).

Em humanos infectados com LV o IFN- γ junto com a IL-2 são importantes para a resposta imune e para a morte das *Leishmanias* e a sua ausência representa o defeito chave na resposta imune a LV (CARVALHO et al., 1985). A produção de IFN- γ no período inicial da infecção humana por *L. (L.) chagasi*, foi associada à capacidade do hospedeiro em prevenir a progressão da doença (CARVALHO et al., 1992).

Cães assintomáticos apresentam uma resposta linfoproliferativa em presença do antígeno da *Leishmania*, reforçando que a resposta celular em cães é mediada por células T, como o descrito em humanos e camundongos (PINELLI et al., 1994).

Experimentalmente a resistência a doença esta associada a proliferação e ativação de células TCD4⁺ do tipo Th1 que produzem IFN- γ , IL-2 e TNF- α e, desse modo, ativam os macrófagos para destruírem as amastigotas intracelulares, via produção óxido nítrico (VOULDOUKIS et al., 1996). As células TCD8⁺ são responsáveis também pela ativação dos macrófagos, com consequente morte dos parasitos intracelulares e/ou através da lise de células infectadas por diferentes citocinas (LIWE et al. 1990; REINER; LOCSLEY, 1995).

A presença de células TCD4⁺ é mais alta em cães assintomáticos quando comparado a cães sintomáticos, e as células TCD8⁺ estão aumentadas em cães assintomáticos e oligossintomáticos em comparação a cães não infectados e sintomáticos

(MARY et al. 1999; REIS et al., 2006), sugerindo que ocorre a lise de macrófagos pelo linfócito TCD8+, representa um mecanismo adicional na resistência à infecção (PINELLI et al., 1995; GOMES-PEREIRA et al., 2004). E em relação à razão TCD4+/TCD8+, a mesma encontra-se reduzida em cães sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos quando comparados a cães não infectados (REIS et al., 2006).

BOURDOISEAU et al. (1997) confirmam a redução de linfócitos TCD4+ e TCD8+ em cães infectados com *L.infantum*, e após o tratamento, o restabelecimento dos níveis normais destas células.

O aumento das células TCD8+ está correlacionado a uma diminuição da parasitemia hepática em camundongos B10. A e B10D2/n infectados com *L. infantum* (GOMES- PEREIRA et al., 2004).

GOMES-PEREIRA et al. (2004) mostram que durante a fase de recuperação em camundongos infectados com *L. infantum*, as células TCD8+ apresentam participação na depuração, provavelmente através da atividade citotóxica. A ativação tardia dessa classe de células se deve a uma conjunção de fatores que necessitam de um período longo para serem sensibilizadas e/ou ativadas, sendo necessária primeiramente a ativação das células TCD4+. O elevado nível de IFN- γ observado antes da fase de recuperação, também pode ser um fator para ativação das células TCD8+.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Vinte cães positivos para leishmaniose visceral, machos ou fêmeas, sem raça definida e adultos foram selecionados. Esses cães eram provenientes do Centro de Controle de Zoonose de Araçatuba (SP) e foram mantidos em canil individual, telado e com água e ração balanceada *ad libitum*. Os canis são pertencentes a Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba (SP).

Os cães foram pesados, identificados, receberam coleira repelente a base de deltametrina, e antes dos testes se iniciarem, receberam duas doses de vermífugo a base de pamoato de pirantel e praziquantel com intervalo de 15 dias. Os mesmos foram selecionados com base nos testes sorológicos positivos para leishmaniose visceral pelo método de ELISA e pela presença de no mínimo três sinais clínicos da doença.

Os cães foram divididos ao acaso em dois grupos: 10 foram escolhidos para compor o grupo controle e 10 para o grupo dos tratados. Os dois grupos de cães tiveram o material biológico coletado antes do início do experimento e ao término do mesmo.

A primeira biopsia de pele foi realizada nos dois grupos antes do início do tratamento com o auxílio do tranquilizante acepromazina (1,1 mg/kg), associado a bloqueio local com xilocaína 1%. Utilizando-se um "punch" de 4 mm foi retirada uma amostra de pele da porção média da orelha, o qual foi armazenada a -80°C até o seu processamento.

As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia radial e foram acondicionadas em tubos com e sem EDTA para a realização dos testes sorológico, hematológico, bioquímico, viabilidade celular, cultura celular e imunofenotipagem.

O uso do imunomodulador P-MAPA no presente trabalho foi aprovado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento através do ofício nº 322, CPV/DFIP.

3.2. Tratamento com P- MAPA

O medicamento P-MAPA foi fornecido pela organização não governamental Farmabrilis na forma liofilizada. No momento do uso, o imunomodulador era ressuspenso em 2 mL de água ultrapura, e para acelerar a dissolução, o medicamento era submetido à sonicação na potência máxima por 5 minutos.

Os cães do grupo tratado receberam P-MAPA na dosagem de 2,0 mg/kg de peso vivo, via intramuscular, a cada três dias, por 45 dias. Os cães controle receberam no mesmo esquema de inoculação, injeções de solução fisiológica. Nos dias da aplicação, os cães, do grupo controle e tratado, passavam por avaliação clínica para avaliação do estado geral.

3.3. Teste *in vitro* da ação citotóxica em células mononucleares após a ação do P-MAPA

A viabilidade celular das células mononucleares do sangue periférico dos cães, após a ação do P- MAPA, foi determinada através do ensaio de MOSSMAN (1983). As células mononucleares foram separadas por gradiente de Ficoll-Paque[®] (Amersham Biosciences - USA), segundo recomendações do fabricante.

Após a separação, as células foram colocadas em meio RPMI 1640[®] (Gibco Industries, Langley, OK, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de L-glutamina e antibióticos. A suspensão celular foi distribuída em placa de 96 orifícios (Corning Inc, NY, USA) e o P- MAPA foi adicionado nas concentrações de 0, 50, 100 e 200 µg/mL por cavidade; o ensaio foi realizado em duplicata. Como controle células mortas por congelamento foram também submetidas ao mesmo procedimento.

A placa foi incubada em ambiente úmido a 37°C em 5% de CO₂ por 72 horas. A seguir foram adicionados 10 µL de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT), na concentração de 5 mg/mL, em PBS, em cada cavidade e a placa foi re-incubada nas mesmas condições por 1 hora.

A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de Dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% em água e a leitura da placa realizada em leitor de espectrofotômetro com filtro de 595nm.

3.4. Atividade leishmanicida do P-MAPA em parasitas livres

Foram cultivadas 5×10^7 promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* a 26°C em meio Schneider (Gibco BRL®) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Sigma®), 200 U/mL de penicilina (Sigma®) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma®), em pH 7,4 em placa de 96 cavidades (Costar®) a 26°C, por 72 horas, na presença de P-MAPA, nas concentrações de 0, 50, 100 e 200 µg/mL por cavidade. Como controle formas promastigotas mortas por congelamento foram também submetidas ao procedimento.

O ensaio foi realizado em duplicata, utilizando-se o mesmo protocolo descrito anteriormente.

3.5. Avaliação sanguínea

As amostras de soro e de sangue foram processadas no Laboratório Clínico da UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba.

O hemograma completo foi realizado por contador automático de células (Celm-CC510®). A determinação da hemoglobina foi realizada pelo método de hemiglobincianida (CELM E - 205S® espectrofotometria) e o volume globular pelo método de microhematócrito (SIGMA 1-13 centrífuga micro hematócrito®). O cálculo dos índices hematimétricos foi realizado de acordo com JAIN (1993).

Para as análises bioquímicas das amostras de soro, utilizou-se um analisador bioquímico automatizado (Analisador automático BTS, Mod. 370 plus, BioSystem®, Espanha), previamente calibrado com calibrador comercial (Calibrator serum, Cód. 18011, BioSystems®, Espanha) e reações monitoradas com controles de nível I (Assayed control serum level I, Cód. 18005, BioSystems®, Espanha) e II (Assayed control serum level II, Cód. 18007, BioSystems®, Espanha).

Utilizando-se um conjunto de reativos comerciais, a concentração de proteína total (Proteína, Cód. 11500, BioSystems[®], Espanha) foi avaliada pela reação de biureto de ponto final; as concentrações de Aspartate aminotransferase (AST/GOT) e as concentrações de Alanine aminotransferase (AL/GPT) por reação cinética contínua (Cód. 11531 e 11553, BioSystems[®], Espanha respectivamente).

Todas as reações bioquímicas foram processadas a 37⁰C, conforme orientações dos fabricantes.

3.6. Quantificação de parasitos em biopsia de pele

A carga parasitária foi avaliada no início e término do tratamento, em ambos os grupos, pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

A extração do DNA das amostras de pele foi realizada utilizando kit para extração de DNA (DNEasy[®] - Quiagen - USA), seguindo as instruções do fabricante. A quantificação foi a partir da PCR em tempo real utilizando SYBR Green I, os “primers” 13A (3´GTG GGG GAG GGG CGT TCT5´) e 13B (3´ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT5´) (RODGERS *et al.*, 1990) em uma concentração de 10mM e 2 µL de DNA.

Os ciclos de temperaturas foram: aquecimento inicial de 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 63°C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos, uma extensão final de 72°C por 5 minutos e finalmente uma curva de “melting” a 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos, 20 minutos até chegar à temperatura de 95°C por 15 segundos.

A curva padrão para quantificação foi realizada a partir de diluições seriadas de DNA extraído de 10⁶ a 10⁻² promastigotas de cultura de *L. chagasi*.

3.7. Avaliação da produção de citocinas no sobrenadante de cultura de células mononucleares

Foram obtidas 5x10⁵ de células mononucleares de sangue periférico e cultivadas em meio RPMI 1640[®] (Gibco Industries, Langley, OK, USA) suplementado com 10% de

soro bovino fetal, 1% de L-glutamina e antibióticos. A suspensão celular foi distribuída em placa de 96 orifícios (Corning Inc[®], NY, USA) e os seguintes controles foram adicionados: 10⁵ formas promastigotas de *L. chagasi* lisadas MHOM/BR/00/MERO2 (10⁵/ poço) ou Fitohemaglutinina (Gibco[®], USA). As culturas foram mantidas em ambiente umidificado a 37°C com 5% de CO₂ por 7 dias.

Após os tempos de cultivo, os sobrenadantes foram individualmente, centrifugados para remoção das células em suspensão e conservadas a -80°C até a quantificação por ELISA.

O protocolo de detecção utilizado para as citocinas foi o recomendado pelo fabricante dos anticorpos utilizados. A metodologia básica consistiu no uso de placas de poliestireno de 96 cavidades de alta afinidade (“Costar high binding”, ½ área, Corning Internacional, New York-USA) que inicialmente foram preenchidas com 50 µL de uma solução contendo 1 µg/mL de anticorpo monoclonal de captura (PharMingen[®]). Após a incubação a 4°C por toda a noite, as cavidades foram esvaziadas e lavadas com solução tampão de salina fosfato (PBS) contendo Tween 20[®] (PBS-T).

A reação foi então bloqueada, à temperatura ambiente, por 30 minutos, com 100 µL com uma solução de PBS contendo 1% de Soroalbumina bovina (BSA - SIGMA). Ao término da incubação, os sobrenadantes foram removidos e após nova lavagem foram adicionados 50 µL dos sobrenadantes de cultura e da curva padrão que teve seus valores estabelecidos de acordo com a absorbância previamente determinada. Após a incubação por 3 horas, à temperatura ambiente, as cavidades foram novamente lavadas e preenchidas com uma solução de PBS-T contendo 1% de BSA, 0,5 mL de Tween[®] 20/L e anticorpo monoclonal anti-citocina conjugado à biotina (1,5 ug/mL). Após 1 hora a temperatura ambiente, as cavidades foram novamente lavadas e adicionaram-se 50 µL do complexo estreptoavidina biotina-peroxidase (Streptoavidin- Dako Corporation[®], CA-USA).

Após incubação por 30 minutos, à temperatura ambiente, as cavidades foram novamente lavadas e a reação antígeno – anticorpo revelada pela adição de 50 µL de Tetra Methy Benzidine (TMB) (Zymed Laboratories[®] – Invitrogen imunodetection – USA). A reação ocorreu no escuro e a temperatura ambiente. Em seguida, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 1 M. A leitura foi realizada em um leitor

automático de ELISA (Metertech[®] Inc. modelo 960) a 450 nm. Os resultados foram expressos em ng/mL de acordo com a curva padrão realizada no momento do experimento.

3.8. Imunofenotipagem de linfócitos por citometria de fluxo

Para obtenção das células mononucleares foram utilizados 10 mL de sangue periférico, colhido com EDTA, de cães participantes dos grupos tratados e controle diluído em PBS (1:1). As células mononucleares foram isoladas por gradiente de densidade com Ficoll Paque[®] (Amersham Biosciences), segundo recomendação do fabricante. As células mononucleares isoladas foram ressuspensa em meio RPMI e em seguida essa suspensão celular foi submetida a contagem. Para marcação foram utilizadas 10^6 células em 100 μ L de volume. Um mL de tampão bloqueio foi adicionado a suspensão celular e incubado por 30 minutos, a 4°C, a seguir a suspensão celular foi centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente. Após o descarte do sobrenadante as células foram ressuspensas com o auxílio de um agitador de tubos por 1 min. Para marcação foi adicionado, em cada tubo, 2 μ L de anticorpos triplamente conjugados a fluorocromos: anti-CD3-canino conjugado a FITC, anti-CD4-canino conjugado ao RPE e anti-CD8-canino conjugado a Alexa flúor 647[®] (abD Serotec, U.K.) ou isotipos controle (abD Serotec, U.K.). Após a incubação por 45 min, a suspensão celular foi centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente, e após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 1 mL de tampão de lavagem; e depois de uma nova centrifugação nas mesmas condições e descarte do sobrenadante, as amostras foram fixadas em PBS-formol 1%. A aquisição de dados foi realizada no equipamento EasyCyte mini[®] (Guava, Hayward, CA) e 10000 eventos foram adquiridos em cada preparação. As análises foram realizadas no Software Guava Express Plus[®], cytosoft 4.1.

A análise dos resultados foi realizada fazendo uma delimitação da população de mononucleares para a retirada de debris celulares (Figura D), em seguida a população selecionada foi reanalisada para a presença de dupla marcação: FITC para o marcador CD3 e alexa-fluor 647 para o marcador CD8, (Figura E) FITC para o marcador CD3 e ficoeritrina para o marcador CD4 (Figura F).

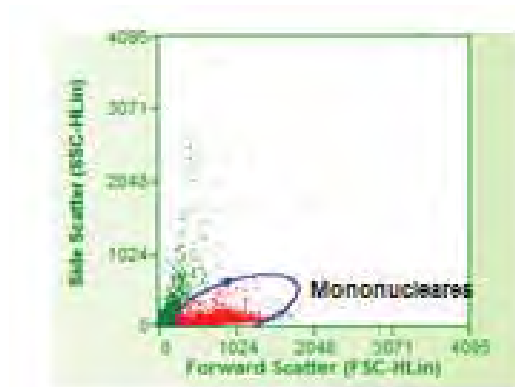


Figura C – A seleção elíptica representa a população de células mononucleares da amostra de sangue periférico de cães sintomáticos para leishmaniose visceral por citometria de fluxo.

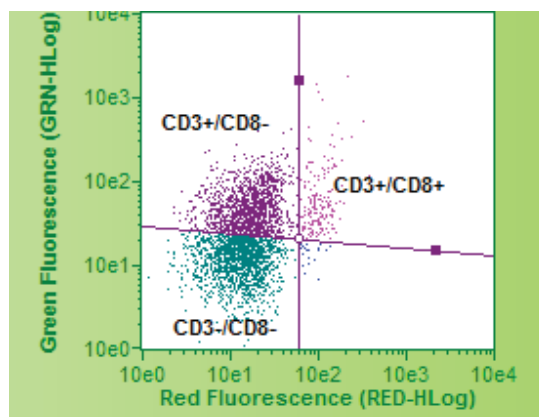


Figura D – Citometria de fluxo de células mononucleares de cães positivos para leishmaniose visceral, no quadrante inferior esquerdo as células não marcadas; no quadrante superior esquerdo, células marcadas somente com $CD3^+$ ($CD3^+/CD8^-$); no quadrante superior direito as células duplamente marcadas ($CD3^+/CD8^+$).

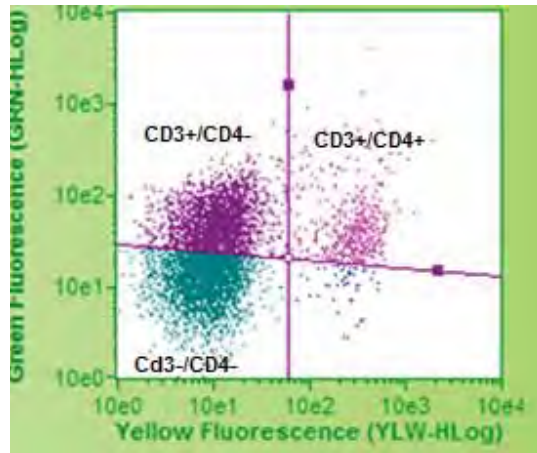


Figura E - Citometria de fluxo de células mononucleares de cães positivos para leishmaniose visceral, no quadrante inferior esquerdo as células não marcadas; no quadrante superior esquerdo, células marcadas somente com CD3⁺ (CD3⁺/CD4⁻); no quadrante superior direito as células duplamente marcadas (CD3⁺/CD4⁺).

3.9. Análise estatística

O teste não paramétrico do Sinal foi utilizado para avaliação da atividade leishmanicida e citotoxicidade celular e, também para a comparação da carga parasitária dos cães do grupo tratado no momento inicial e no final. O teste paramétrico de Tukey foi utilizado na avaliação das diferenças nos níveis dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ dos cães tratados e controles. Na comparação da carga parasitária, entre o grupo controle e o grupo tratado, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. O teste t não pareado foi utilizado para as dosagens de IL-2, IL-10 e INF- γ . Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$. O programa estatístico SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA) foi utilizado para todas as análises deste estudo.

IV. RESULTADOS

4.1. Ação citotóxica, leishmanicida e hemograma

O P-MAPA não apresenta ação leishmanicida “in vitro” (Figura 1), uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa entre a viabilidade de parasita na presença ou na ausência de P-MAPA ($P > 0,05$). O imunomodulador também não apresentou efeito tóxico em culturas de células, mesmo utilizando-se uma dosagem de $200\mu\text{g/mL}$, visto que a queda da viabilidade celular não foi significativa ($P > 0,05$) (Figura 2).

As dosagens das enzimas ALT e AST, quando comparadas antes e após o tratamento, não apresentaram diferenças significativas. A administração do imunomodulador também não provocou alterações significativas na contagem dos leucócitos totais e de suas subpopulações (resultados não mostrados). Os leucogramas de alguns cães tratados mostraram um aumento no número de células, apesar deste aumento não ser estatisticamente significativo, 4 cães apresentaram aumento de neutrófilos segmentados, 2 um aumento de linfócitos, 3 de monócitos e 6 de eosinófilos.

Também não houve alteração da dosagem das proteínas plasmáticas totais. Apesar de não apresentar diferença estatisticamente significativa, os valores dos eritrócitos, hemoglobina e hematócrito apresentaram queda em seis animais do grupo tratado.

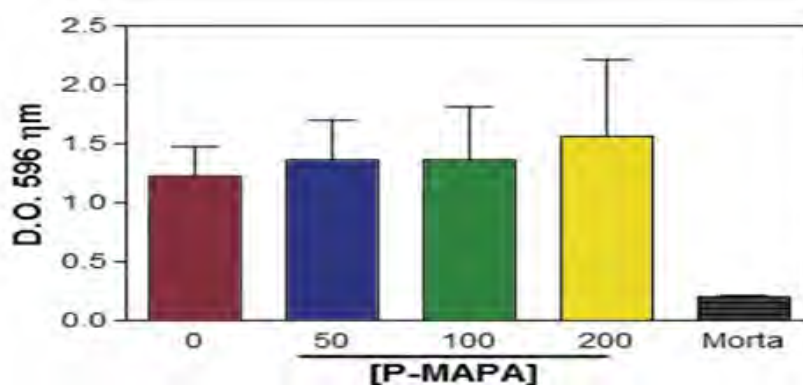


Figura 1 – O imunomodulador P-MAPA não apresentou alteração na viabilidade das formas de promastigotas de *Leishmania chagasi* após a estimulação “in vitro” em diferentes

concentrações ($\mu\text{g/mL}$). Como controle, foram utilizadas formas promastigotas mortas por congelamento.

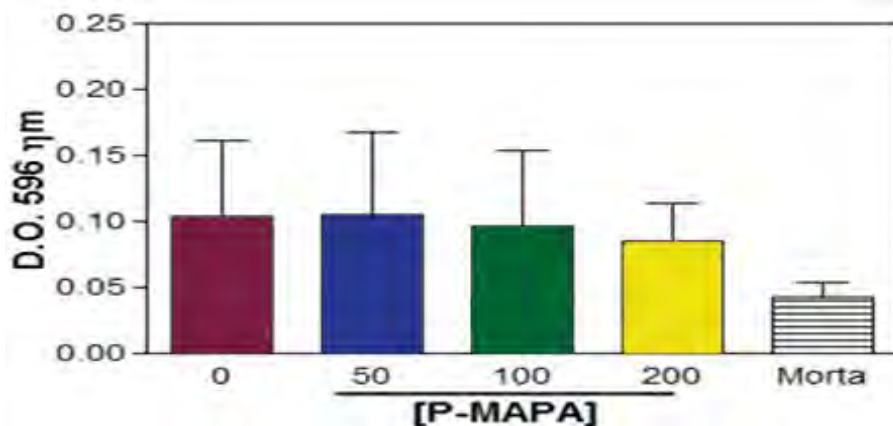


Figura 2. A viabilidade de células mononucleares, de cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*, após estimulação *in vitro* com o imunomodulador P-MAPA não apresentou alterações em diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$). Como controle, foram utilizadas células mononucleares mortas.

4.2. Acompanhamento dos sinais clínicos

Nos cães do grupo tratado, o sintoma mais comum antes do início do tratamento, foi a presença da onicogribose observada nos dez cães deste grupo, seguido de alopecia em nove cães. Em sete cães constatou-se o sub-peso, em seis a seborreia, e em cinco a ceratoconjuntivite seca. Com menor frequência, mas presente em pelo menos dois cães, foram observados a polidipsia, úlceras de pele, claudicação, pelame opaco, emese, hiporexia, nódulos cutâneos, diarreia, uveíte, prurido cutâneo e apatia. Após o tratamento com o imunomodulador, a onicogribose foi observada em seis cães e a alopecia em três. A presença de úlceras de pele ainda foi observada em dois cães e a uveíte, nódulos cutâneos, claudicação e seborreia foram observadas em apenas um cão. Os demais sintomas não foram mais observados (Figura 3).

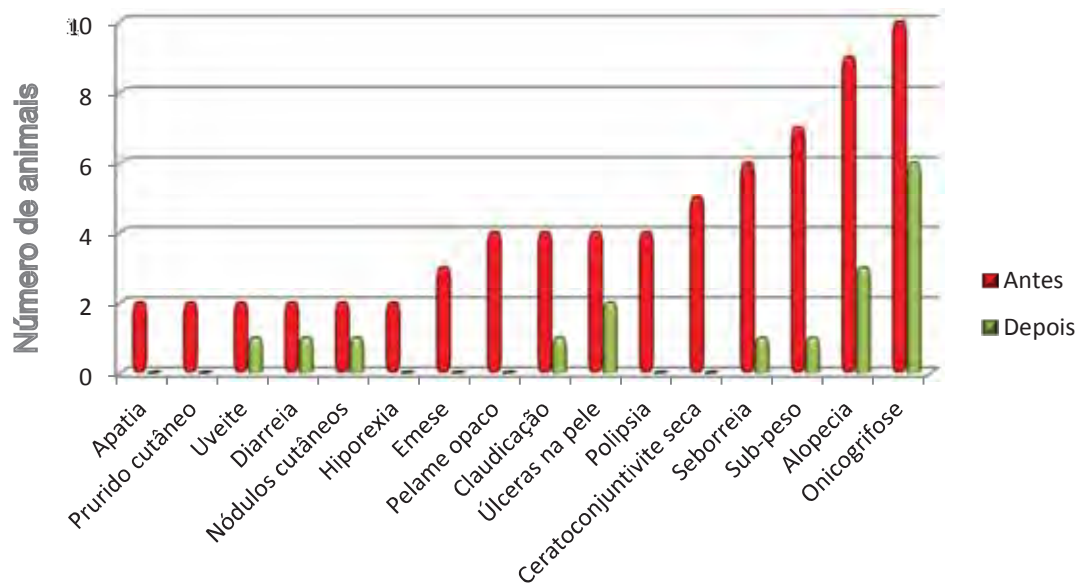


Figura 3: Sinais clínicos apresentados pelos 10 animais do grupo tratado, antes e depois do tratamento com o P- MAPA.

4.3. Avaliação da carga parasitária na pele no grupo tratado e controle

Os valores do ciclo linear (*Threshold cycle* -Ct), obtidos a partir de 2 μ L de DNA de cada amostra, foram analisados tendo como referência a curva padrão obtida para a carga parasitária. A curva de quantificação da carga parasitária apresentou um coeficiente de correlação de (r^2)= 0,98 e a reação apresentou um *slope* de -3,286. A carga parasitária do grupo controle foi maior do que a do grupo tratado ao final do período do estudo (Figura 4; $p < 0,05$). A carga parasitária do grupo tratado mostrou uma redução significativa após o tratamento com o P-MAPA ($p < 0,05$). A tabela 1 mostra os valores observados, através de análise das amostras de pele, da carga parasitária dos cães do grupo tratado antes e após o tratamento.

Tabela 1 - Carga parasitária das amostras de pele de cães do grupo tratado, naturalmente infectados por *Leishmania* spp., antes e após o tratamento com P-MAPA.

Cão	Antes	Depois
	do tratamento	do tratamento
	Nº de <i>Leishmania</i>	Nº de <i>Leishmania</i>
1	$3,6 \times 10^5$	$1,6 \times 10^3$
2	$2,6 \times 10^3$	$3,5 \times 10^2$
3	$4,1 \times 10^3$	$2,9 \times 10^4$
4	$8,1 \times 10^5$	$2,9 \times 10^4$
5	$3,4 \times 10^6$	$2,0 \times 10^4$
6	$6,3 \times 10^3$	$5,0 \times 10^{-3}$
7	$1,3 \times 10^1$	$2,0 \times 10^{-7}$
8	$3,5 \times 10^2$	$3,4 \times 10^{-1}$
9	$3,5 \times 10^0$	$6,8 \times 10^{-5}$
10	$1,0 \times 10^1$	$4,4 \times 10^{-1}$
Média	$4,5 \times 10^5$	$7,8 \times 10^3$
Desvio padrão	$1,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^4$

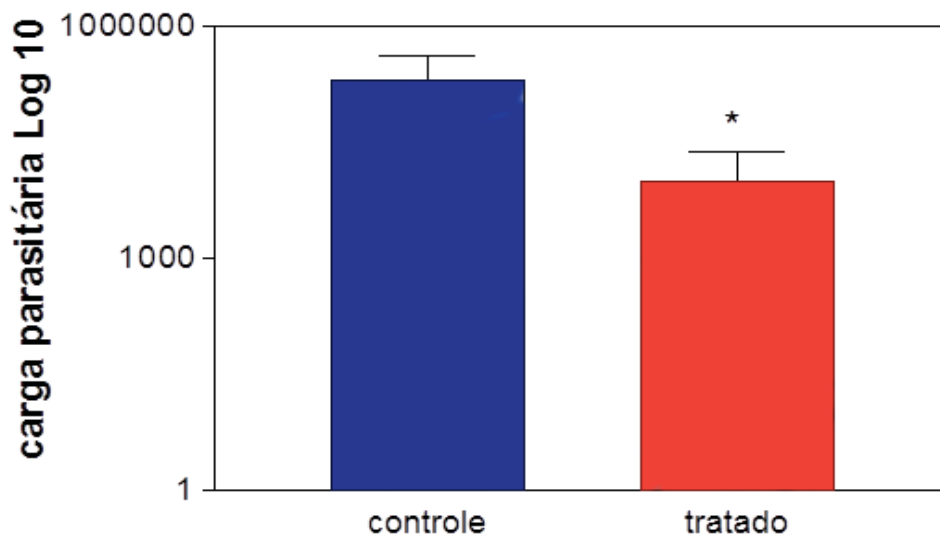


Figura 4. Carga parasitária mediana pele de cães, do grupo controle e do grupo tratado, após 45 dias de tratamento com o imunomodulador P-MAPA. * Diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

4.4. Dosagem de IL2, IL-10 e INF- γ

O ensaio para IL-10 apresentou um coeficiente de correlação (r^2) = 0,97 e sensibilidade de 40ng/mL. Houve redução significativa nos níveis de IL-10 no sobrenadante das culturas estimuladas com antígeno e no meio basal quando comparado ao sobrenadante dos grupos controle (Figura 5). O nível de INF- γ (Figura 6) e IL-2 (Figura 7) no sobrenadante de cultura foi maior no grupo dos cães tratado quando comparado aos cães não tratados, sendo o aumento verificado nas culturas estimuladas com fitohemaglutinina e antígeno específico para *Leishmania chagasi*. O ensaio para INF- γ apresentou uma sensibilidade de 45 ng/mL e $r^2=0,99$ e para IL-2 um $r^2 = 0,99$ e sensibilidade de 35ng/mL.

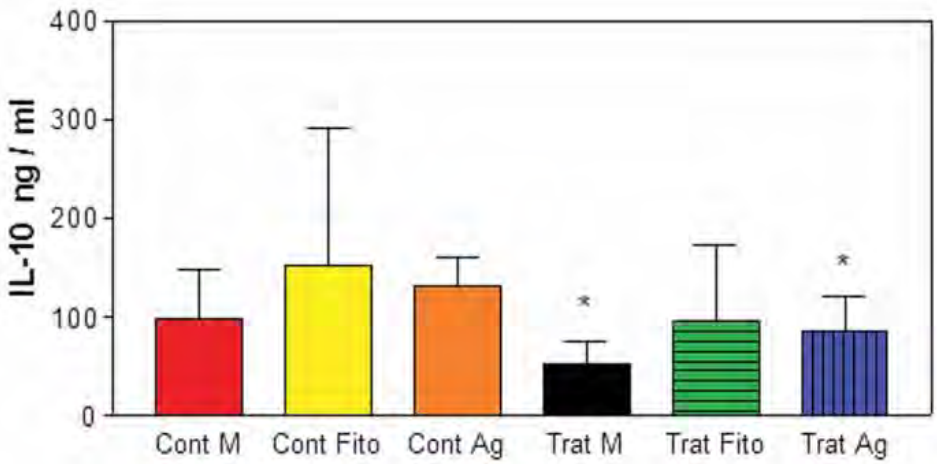


Figura 5. Produção de IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares de cães sintomáticos para LV não tratados (controle - cont) ou tratados (trat) com P-MAPA. Houve uma redução significativa na produção de IL-10 no sobrenadante de cultura de células mononucleares não estimuladas ou estimuladas com antígeno de *Leishmania chagasi* no grupo tratado. M = meio basal, Fito= fitohemaglutinina, Ag = antígeno. * Diferença estatisticamente significativa.

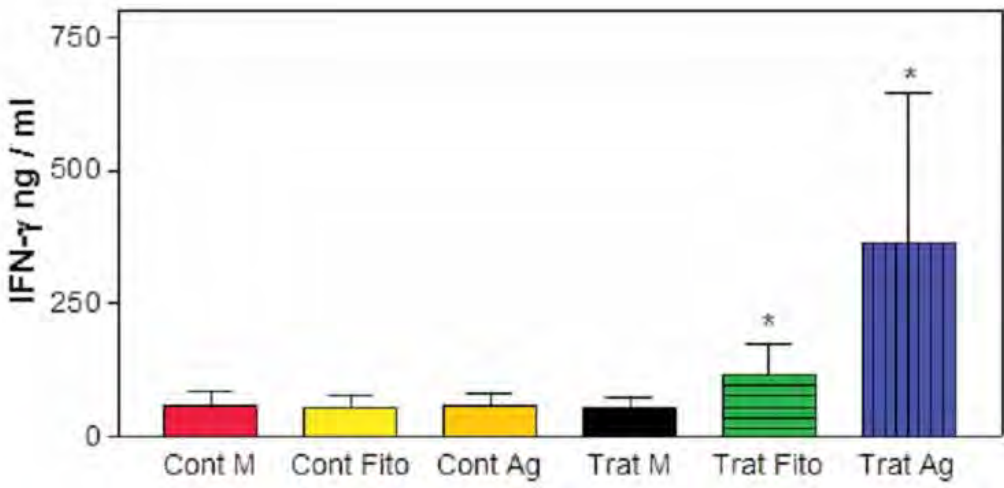


Figura 6. Produção de INF- γ em sobrenadante de cultura de células mononucleares de cães sintomáticos para LV não tratados (controle - cont) ou tratados (trat) com P-MAPA. Houve um aumento significativo na produção de INF- γ no sobrenadante de cultura das células estimuladas com fitohemaglutinina ou estimuladas com antígeno de *Leishmania chagasi* no grupo tratado. M = meio basal, Fito= fitohemaglutinina, Ag = antígeno. * Diferença estatisticamente significativa.

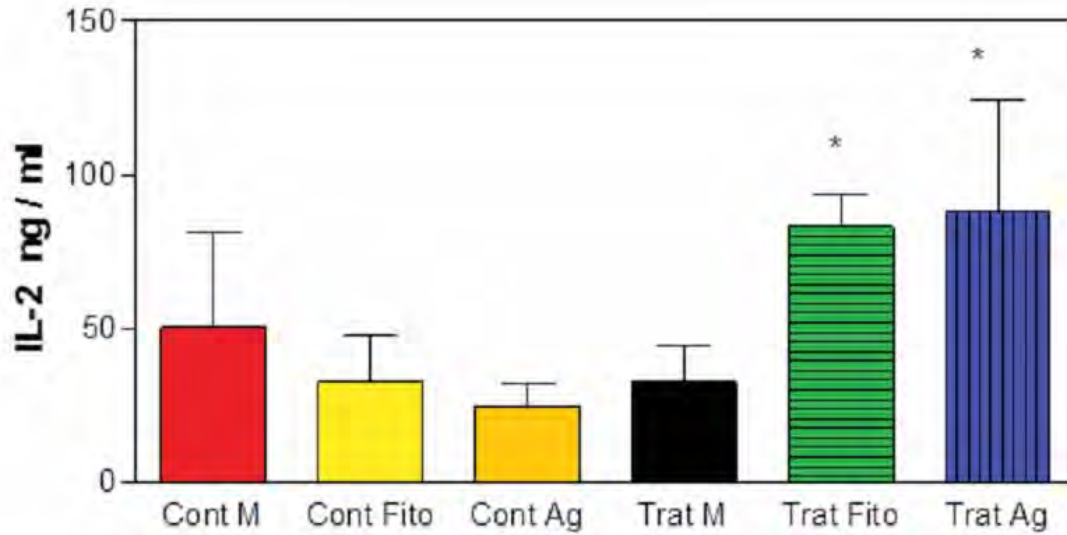


Figura 7. Produção de IL- 2 em sobrenadante de cultura de células mononucleares de cães sintomáticos para LV não tratados (controle - cont) ou tratados (trat) com P-MAPA. Houve um aumento significativo de produção de IL-2 no sobrenadante de cultura das células estimuladas com fitohemaglutinina ou estimuladas com antígeno de *Leishmania chagasi* do grupo tratado. M = meio basal, Fito= fitohemaglutinina, Ag = antígeno. * Diferença estatisticamente significativa.

4.5. Imunofenotipagem dos linfócitos

A análise comparativa da porcentagem de células TCD4+ e TCD8+ antes do início do tratamento, em ambos os grupos, não apresentou diferença estatística significativa (resultados não mostrados). Após o tratamento foi observado um ligeiro aumento das células TCD4+, quando comparada ao grupo controle, porém sem significado estatístico (Figura 8). As células TCD8+ apresentaram um aumento significativo da porcentagem após o tratamento como mostra a Figura 8 ($p < 0,05$).

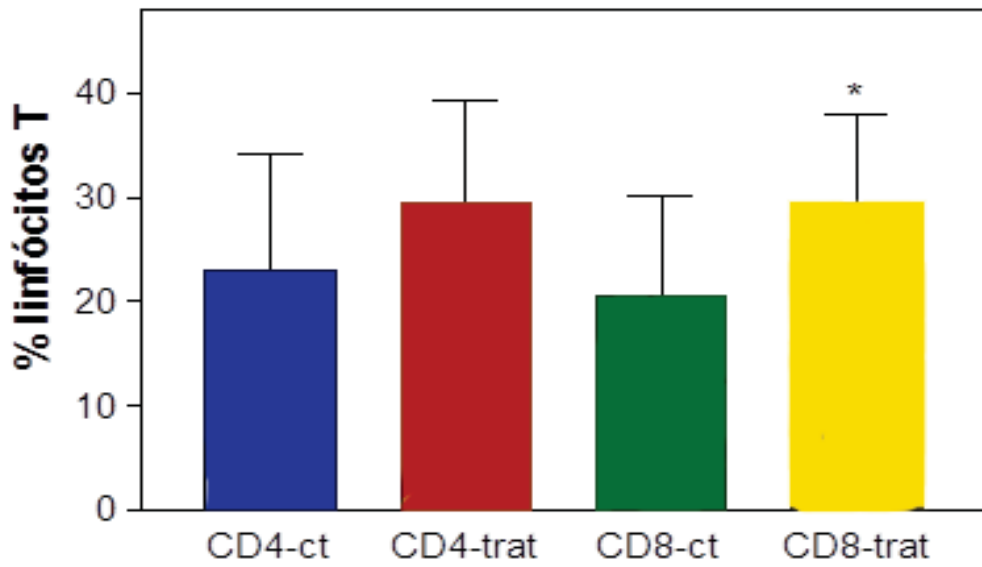


Figura 8. Comparação das populações de células TCD4+ e TCD8+ entre os grupos controle (ct) e tratado (trat) após 45 dias de aplicação do imunomodulador P-MAPA. O aumento de linfócitos TCD8+ em sangue periférico de cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp. do grupo tratado (trat) apresentou diferença estatisticamente significativa (*).

V. DISCUSSÃO

Em razão da proibição do tratamento de leishmaniose visceral canina com fármacos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2008), e em vista do aparecimento de resistência do parasito às drogas mais utilizadas, isto é, os antimoniais (AREVALO et al. 2001; CROFT et al., 2006), e, também do grande impacto social causado pela eutanásia dos cães domésticos positivos, faz-se necessário a pesquisa de novos medicamentos eficientes para o tratamento da LVC e que possam ser utilizados com segurança. O P-MAPA é um composto obtido a partir de culturas selecionadas de *Aspergillus oryzae* e purificado através da cromatografia em coluna de acordo com DURAN; NUNES (1990) e suas propriedades contra diferentes agentes patogênicos vêm sendo estudada (DURAN et al., 1990; JUSTO et al., 2000).

O P-MAPA apresentou-se seguro nos testes “in vitro” não causando alterações na viabilidade celular e nem efeitos citotóxicos. Esses resultados corroboram os encontrados em estudo onde utilizaram-se altas concentrações (120 ug/mL) desse imunomodulador em culturas celulares V-79, que são linhagens utilizadas como padrão para estudos de toxicidade, sendo que a dose letal média (LD50) não foi atingida (FARMABRASILIS, 2011). Estudos sobre o caráter citogênico em linfócitos, com altas concentrações do produto, também não apresentaram alterações nas frequências de aberrações numéricas e estruturais nestas células (FARMABRASILIS, 2011).

A utilização do P-MAPA, na dosagem de 2,0 mg/kg pelo período de 45 dias, mostrou-se segura para esta espécie, uma vez que não foram observadas variações hematológicas, em relação ao primeiro exame, e nas enzimas ALT e AST após o tratamento. A segurança do P-MAPA em outras espécies animais já havia sido demonstrada (DURÁN et al., 1990; SOUZA-BRITO et al., 1991; BELUCCI et al., 1991). A dose letal 50% (DL50) para camundongos, através da aplicação oral e subcutânea, até o momento não foi obtida, mesmo utilizando dosagens 500 vezes mais alta que a dosagem terapêutica. Para a aplicação intra peritoneal, a DL50 para esta espécie foi obtida com uma

dosagem de $2,71 \pm 1,55$ g/kg, sendo a dosagem terapêutica recomendada de 5 mg/kg (FARMABRASILIS, 2011).

Os hemogramas realizados nos cães tratados não mostraram alterações morfológicas ou degenerativas, o que também foi observado em *Cebus apella* que receberam dosagens que variaram de 5 a 30 mg de dose total por 30 dias (OLIVEIRA, 1992). Apesar de não serem estatisticamente significantes, alguns cães tratados mostraram aumento no número de leucócitos. No mesmo estudo com 23 *Cebus apella* (macaco prego) também foi observado um aumento no número de leucócitos, mas neste caso, principalmente de linfócitos e neutrófilos segmentados. Ainda neste estudo, as únicas alterações observadas foram declínio no número de eritrócito e nos valores do hematócrito e hemoglobina do grupo que recebeu a dosagem mais alta, sendo que os parâmetros retornaram ao normal após 30 dias do fim das aplicações (OLIVEIRA, 1992). A exemplo do observado no estudo com *Cebus apella*, em seis cães que receberam tratamento com P-MAPA, também foi registrado declínios nas contagens de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito.

Os cães que receberam injeções do P-MAPA não apresentaram sinais de dor no local da aplicação, bem como, não apresentaram reações adversas após a aplicação e sua utilização, diferente dos tratamentos com antimoniais que apresentam vários efeitos adversos, RIBEIRO et al. (2008) mostraram que a maioria dos cães tratados com produto a base do antimônio apresentaram, após 15 minutos da aplicação, vários efeitos adversos, como, taquicardia, taquipneia, sialorreia, prostração, vômito, defecação e tremores musculares. Tratamentos mais prolongados com antimônio ou com a Anfoterecina B requerem monitoramento contínuo da função renal, podendo ainda ser esperados e distúrbios gastro-intestinais, e não raro os tratamentos em cães devem ser suspensos devidos as complicações (BANETH; SHAW, 2002).

Outro fator complicador do uso do antimonial é em relação à via de administração, que não deve ser intramuscular por causar dor no local da aplicação, abscessos locais e fibrose muscular (BANETH; SHAW, 2002). A propósito desse tipo de complicações, os cães do atual experimento não apresentaram nenhuma complicação posterior à aplicação.

Outra desvantagem do tratamento com o antimonial é a sua rápida absorção e excreção, sendo necessária a administração de altas doses em regime contínuo. Por isso, efeitos adversos são esperados. Em humanos é comum observar vários distúrbios e em muitos casos o tratamento pode levar o paciente ao óbito, sendo o medicamento ainda detectado no cabelo do paciente após um ano do término das aplicações (RATH et al. 2003). Por outro lado a aplicação do P-MAPA em cães mostrou-se eficiente com uma administração a cada 3 dias.

Os cães do grupo tratado com o imunomodulador P-MAPA apresentaram redução significativa nos sinais clínicos, caracterizado por uma melhora no pelame do animal, redução das descamações e prurido da pele e principalmente uma melhora no apetite. A remissão dos sinais ocasionou uma melhora significativa na disposição do animal. Em relação ao grupo controle, os sinais clínicos apresentaram um agravamento com o tempo, tendo sido registrado o óbito de um cão durante a fase do experimento devido a problemas renais frequentes na doença.

A melhora no apetite, após a aplicação do P-MAPA e o consequente aumento da ingestão de ração balanceada, podem ter contribuído para a melhora clínica observada nos animais. Atualmente é reconhecido que a desnutrição protéico calórica e as infecções causadas pela *Leishmania* spp. possuem alguma relação (MALAFAIA, 2008).

SERAFIM et al. (2010) mostram que camundongos subnutridos e portadores de leishmaniose visceral apresentam um aumento de parasitos por miligrama de tecido hepático e esplênico quando comparados a camundongos controle e os animais com subnutrição não apresentaram produção de IFN- γ .

Em relação à carga parasitária, a avaliação da pele é importante, pois a pele é a porta de entrada do parasita no organismo, pode determinar o tipo de resposta imune gerada pelo hospedeiro e é onde ocorre a infecção do vetor por formas amastigotas (KEMP et al., 1996). Os animais tratados com o imunomodulador P-MAPA mostraram uma redução significativa na carga parasitária. Resultados semelhantes no baço e linfonodo foram observados por MANNA et al. (2008) após a administração de metilfosina associado à alopurinol. A redução da carga parasitária pode ocorrer como consequência da ação efetora de macrófagos ativados que promovem a morte do parasita (HOLZMULLER et al.,

2005). Tal atividade pode ser estimulada por IFN- γ secretado por células T CD8+. GUERRA et al. (2009) relataram que cães com baixa carga parasitária apresentam aumento do nível de TCD8+.

Em relação às citocinas, o imunomodulador utilizado induziu aumento da produção de IL-2 e IFN- γ e diminuição de IL-10. Em cães sintomáticos para LVC, a atividade da IL-2 e INF- γ é reduzida (PINELLI et al., 1994), enquanto os níveis de IL-10 aumentam, ocasionando uma supressão da resposta protetora (BACELLAR et al., 2000). Os cães tratados com P-MAPA apresentaram redução de IL-10 e aumento da produção de IL-2 e INF- γ quanto comparados aos do grupo controle. A diminuição da produção de IL-10 pode indicar um reequilíbrio do sistema imunológico para um controle da replicação parasitária. Possivelmente o aumento de IL-2 deve ter colaborado para a proliferação linfocitária e aumento da produção de INF- γ , levando a ativação dos macrófagos.

Cães tratados com uma vacina contra leishmaniose visceral apresentaram resultados semelhantes, tendo sido observado um aumento do nível de IL-2 e IL-4 e INF- γ e redução do nível de IL-10 (BORJA-CABRERA et al., 2009). Esses mesmos resultados foram observados com a utilização do dipeptídeo de muramil que induziu a diminuição da IL-4 e IL-10 e aumento da IL-2 e INF- γ em camundongos BALB/c infectados com *L. donovani*, sendo que o uso do dipeptídeo de muramil associado ao estibogluconate, droga leishmanicida utilizada em hamster, permitiu a redução da dose do último medicamento (PURI et al., 2005).

Nossos resultados mostraram aumento no número de células TCD4+ e TCD8+ após o tratamento, sendo que apenas as células TCD8+ apresentaram um aumento significativo, sugerindo ação imunomodulatória da droga nessa subpopulação. É possível que a secreção de IL-2 observada esteja colaborando para o aumento da população das células TCD8+, e estas atuem promovendo a ativação dos macrófagos e a morte dos parasitas, reduzindo a carga parasitária.

Ainda, cães sintomáticos experimentalmente inoculados com antígeno solúvel de *Leishmania* apresentaram diminuição dos níveis de INF- γ , podendo esta diminuição estar associada ao baixo nível de células TCD4+ também observado em cães sintomáticos (CARRILLO et al., 2007; CARRILLO, MORENO, 2009). Alguns estudos mostram que, após

tratamento, o nível de TCD4+ retorna aos valores normais (MORENO et al. 1999; GUARGA et al., 2002; GUERRA et al., 2009) mostrando o papel das células T CD4+ no controle da doença.

Os cães do grupo controle, antes de receberem a primeira dose de P-MAPA, apresentavam baixos níveis de INF- γ e TCD4+ e após o término do tratamento esses parâmetros se elevaram. Apesar do aumento das células TCD4+ não apresentarem significância estatística, o aumento real do número de células desta população, pode indicar imunoestimulação.

As células TCD8+ são importantes para o controle de infecções causadas por protozoários pela sua capacidade de lisar as células infectadas e pela produção de citocinas (COELHO-CASTELO et al., 2009). MARY et al. (1999) mostraram a importância da presença das células TCD8+ no controle da infecção por *Leishmania infantum* em pacientes humanos assintomáticos associada a produção de INF- γ . O aumento da população TCD8+ associado à redução da carga parasitária indica que o imunomodulador estimulou a imunidade celular dos cães.

Semelhante aos nossos resultados, níveis elevados de TCD8+ são observados em cães assintomáticos com baixa carga parasitária (REIS et al., 2006). Altos níveis de TCD4+ e TCD8+ podem ser a chave para uma efetiva resposta imune contra a doença (REIS et al., 2006), uma vez que a destruição dos parasitas está associada a um número elevado de linfócitos (DA-CRUZ et al., 1994; REIS et al., 2006).

O aumento de TCD8+ tem sido observado com o uso de outros imunomoduladores no tratamento da leishmaniose visceral (BORJA-CABRERA et al., 2004) semelhante ao observado com P-MAPA. Por outro lado, quimioterápicos parecem não afetar de maneira significativa essa população celular, sendo observado somente um aumento na população TCD4+ (MORENO et al., 1999; GUARGA et al., 2002).

VI. CONCLUSÕES

O uso do P-MAPA mostrou-se seguro para o uso em cães.

Os resultados observados “in vitro” mostram que a droga imunomodulatória P-MAPA não apresenta citotoxicidade e não tem ação leishmanicida;

Nas condições estudadas, a utilização do imunomodulador P-MAPA não apresentou variação da contagem de células sanguíneas e nos parâmetros de AST e ALT significativas nos cães, também não apresentou efeitos adversos no momento da aplicação ou durante o experimento, portanto, seu uso, na dosagem utilizada, mostrou-se segura para utilizar em cães acometidos de leishmaniose visceral;

O imunomodulador promoveu principalmente a remissão da onicogribose, da alopecia, do sub- peso, seborreia, ceratoconjuntivite seca e polidipsia, e reduziu a carga parasitária de cães com leishmaniose na forma sintomática;

O P-MAPA proporcionou aumento da resposta imunológica celular em cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp., verificada pelo aumento da IL- 2, INF- γ , das células TCD8+ e pela redução do IL-10.

O presente estudo permite sugerir que o P-MAPA tem potencial como droga terapêutica na leishmaniose visceral canina, pois estimula a imunidade celular.

VI. REFERÊNCIAS

ABREU, R. T. **Alterações eritropoéticas e leucopoéticas na leishmaniose visceral canina**. 114 f. Dissertação (mestrado)-Instituto de Ciências Exatas e Biologia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, 2008.

AREVALO, I. et al. A. Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, US, v. 33, n. 11, p.1847–1851, 2001.

ARRUDA, D.C. et al. Antileishmanial activity of terpenenerolidol. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, DC, v. 49, p. 1679–1687, 2005.

BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M. Imunopatogênese da leishmaniose. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, BA, v. 75, p. 24-34, 2005.

BACELLAR, O. et al. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, San Diego, CA, v. 12, p. 1228–1231, 2000.

BANETH, G.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmanioses. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 106, p. 315-324, 2002.

BELUCCI, S. et al. SB-73 a new immunomodulating compound in the treatment of AIDS patient. In: INTERNATIONAL AIDS CONFERENCE, Florence, IT, 7., 16-21 jun. 1991. **NLM Gateway**, US: Library of Medicine. Disponível em: <<http://gateway.nlm.nih.gov/MeetingAbstracts/ma?f=102183252.html>>. Acesso em: 30 jul. 2011.

BOGGIATTO, P. M. et al. “Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, DC, v. 17, n. 2, p. 267-273, feb. 2010.

BORJA-CABRERA, G.P. et al. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. **Vaccine**, Kidlington, GB, v. 22, p. 2234-2243, 2004.

BORJA-CABRERA, G.P. et al. Nucleoside hydrolase DNA vaccine against canine visceral leishmaniasis. **Procedia in Vaccinology**, Netherlands, v. 1, p. 104-109, 2009.

BOURDOISEAU, G. et al. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, NL, v. 56, p. 345-51, 1997.

BRACHELENTE, C. et al. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T Helper-2–biased immune response. **Veterinary Pathology**, New York, US, v. 42, n. 2, p. 166–175, mar. 2005.

BRANDÃO FILHO, S. P. **Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar americana associada a Leishmania (V.) braziliensis na zona da mata Atlântica do estado de Pernambuco, Brasil**. 102 f Tese (doutorado)-Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria interministerial nº 1.426, 11 de julho de 2008. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, v. 145, n. 133, 14 jul. 2008. Seção 1, p. 37.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, Brasília, DF: Ministério da Saude, 2006. 120p. **Portal da Saúde**, Brasília, DF. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_visceral2006.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2011.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. Classificação epidemiológica dos municípios para a Leishmaniose Visceral Americana. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 4, n. 39, p.1-12, 2007.

CARVALHO, E. M. et al. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Investigation**, New York, US, v. 76, p. 2066-2069, 1985.

CARVALHO, E. M. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani* chagasi. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, US, v. 165, p. 535-540, 1992.

CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Washington, DC, v.128, p.67-70, 2009.

CARRILLO, E. et al. Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, Kidlington, GB v. 25, p.1534-1543, 2007.

CHAMIZO, C.; MORENO J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, NL, v. 103, p. 67-75, 2005.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Microbiology**, Reading, UK, v. 5, p. S7-S16, nov. 2007.

CHER, D. J.; MOSMANN, T. R. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by Th1 Clones. **The Journal of Immunology**, Baltimore, US, v. 138, n. 11, p. 3688-3694, jun. 1987.

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, London, UK, v. 141, p. 539-543, 1997.

COELHO-CASTELO, A. A. M. et al. Resposta imune a doenças infecciosas. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 42, n. 2, p. 127-142, 2009.

CORRÊA, A. P. F. L. et al. Evaluation of transformation growth factor b1, interleukin-10, and interferon-g in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, n. 143, p. 267-274, 2007.

COSTA, C. H. N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n.12, p. 2959-2963, dez. 2008.

COSTA, C. H. N.; VIEIRA, J. B. F. V. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 34, n. 2, p. 223-228, mar./abr. 2001.

COSTA, D. J. **Vacinas de DNA codificadoras de proteínas salivares de *Lutzomyia longipalpis* na infecção de *Leishmania chagasi* em cães**. 149 f. Tese (doutorado)-Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009.

COSTA-VAL, A. P. da. et al. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **The Veterinary Journal**, London, GB, v. 174, n. 3, p. 636-643, 2007.

COUTINHO, M. T. Z. et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 128, p. 149–155, 2005.

CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, IN, v. 123, n. 3, p. 399–410, 2006.

CRUZ, I. et al. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. **The Lancet**, London, GB, v. 359, p. 1124-1125, 2002.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do Gênero *Leishmania* patogênica para o homem. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 5-9, 1937.

CUNHA, L. C. et al. A própolis no combate a tripanossomatídeos de importância médica: uma perspectiva terapêutica para doença de chagas e leishmaniose. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 40, n.2, p. 105-124, abr.-jun. 2011.

DA-CRUZ, A. M. et al. Leishmania-Reactive CD4+ and CD8+ T Cells Associated with Cure of Human Cutaneous Leishmaniasis. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 62, n. 6, p. 2614-2628, jun. 1994.

DE ANDRADE, R. A. et al. Clinical value of anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, NL, v. 116, p. 85-97, 2007.

DOS-SANTOS, W. L. et al. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: emaciation, spleen parasitism, specific test reaction. **Veterinary Immunology Immunopathology**, Amsterdam, NL, v. 123, p. 251-259, 2008.

DURÁN, N. et al. A biotechnological product and its potential as a new immunomodulator for treatment of animal phlebovirus infection: Punta Toro virus. **Antiviral Research**, Amsterdam, NL, v. 83, p. 143-147, 2009.

DURÁN, N. et al. Comparison of the antiviral activity and toxicity of a protein magnesium ammonium phospholipoleate anhydride polymer with other antiviral drugs. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 23, p. 1303-1313, 1990.

DURÁN, N. et al. New perspectives in immunomodulatory therapy of tumor induced by naextracelular aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. **International Journal Molecular Medicine**, Athens, GR, v. 4, p. 49, 1999.

DURÁN, N. et al. SB-73-immunostimulant. **Drugs of the Future**, Barcelona, ES, v. 18, n. 4, p. 327, abr.1993.

DURÁN, N.; NUNES, O. D. S. Characterization of an aggregated polymer from *Penicillium* sp. (PB-73 Strain). **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 23, p. 1289-1302, 1990.

DUTRA, R. C. et al. Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodone marginatus Vogel*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 19, n. 2A, p. 429-435, abr./jun. 2009.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **The American Journal Tropical Medicine Hygiene**, Mclean, US, v. 55, n. 2, p. 125-130, 1996.

FARMABRASILIS, 2001. Estudo de toxicidade e segurança - Toxicidade in vivo - toxicidade aguda – toxidade em animais. Farmabrasilis. Disponível em: <http://www.farmabrasilis.org.br/todos_conteudos_interna.php?idioma=br&id=170>. Acesso em: 29 maio 2011.

FERREIRA, M. G. P. A. et al. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 165, p. 150–154, 2009.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. **Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Fórum**, Barcelona, ES, p. 6-10, 1999.

FERRER, L. Leishmaniasis. In: KIRK, R. W. (Ed.); BONACURA, J. D. (Ed.). **Current Veterinary Therapy XI: small animal practice**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992. p. 266-270.

FIGUEIRO FILHO, E. A. et al. Leishmaniose visceral e gestação: relato de um caso. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 2, p. 92-87, 2005.

FIORAVANTI, C.; **Medicamentos em países em desenvolvimento: um estudo de caso do composto brasileiro P-MAPA**. Dissertação (Mestrado)-Universidade de Campinas, Campinas, 2007.

FONSECA, M. J. da. **Estudo da seroprevalencia de anticorpos anti-*leishmana* spp. numa população que coabita com canídeos com leishmaniose**. 87 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisboa, PT, 2009.

FRANCO, A. M. R. **Leishmaniose tegumentar em *Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758 (Marsupialia: Didelphidae): estudo da infecção experimental por *Leishmania* spp.** 145 f. Dissertação (Mestrado)-Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, 1990.

FREITAS, J. C. C. de; PINHEIRO, D. C. S. N. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania* spp. **Revista Portuguesa Ciências Veterinárias**, Lisboa, PT, v. 109, p. 573-576, 2010.

GAMA, M. E. A. et al. Serum cytokine profile in the sub clinical form of visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 37, p. 129-136, 2004.

GENARO, O. **Leishmaniose visceral canina experimental**. Belo Horizonte. 1993. 202p. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GENARO, O. et al. Naturally occurring visceral leishmaniasis in dogs: clinical aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 83, p. 43, 1988.

GILLESPIE, R. D.; MBOW, M. L.; TITUS, R. G. The immunomodulatory factors of blood feeding arthropod saliva. **Parasite Immunology**, Oxford, GB, v. 22, p. 319-331, 2000.

GOMES-PEREIRA, S. et al. Hepatic cellular immune responses in mice with “cure” and “non-cure” phenotype to *Leishmania infantum* infection: importance of CD8 β T cells and TGF- β production. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Reading, UK, v. 41, p. 59-68, 2004.

GRIMALDI, G. JR.; MC-MAHON-PRATT, D.; SUN, T. Leishmaniasis and its etiologic agents in the New World: an overview. **Progress in Clinical Parasitology**, New York, NY, v. 2, p. 73–118, 1991.

GRIMALDI, G. JR.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the new world. Current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.

GUARGA, J. L. et al. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, NL, v. 88, p. 13-20, 2002.

GUERRA, L.L. et al. Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, Berlin, DE, v. 104, p. 611–622, 2009.

HÉRVAS, J. et al. Pathological study of visceral leishmaniasis in a Jackal. **Veterinary Record**, London, UK, v. 139, p. 293-295, 1996.

HETEM, S.; KANNO, C. M.; SILVA, N. I. Effects of the immunomodulator SB-73 on tooth germs and palate development. In: INTERNATIONAL AIDS CONFERENCE, Amsterdam, NE, 8., 19-24 jul. 1992. **NLM Gateway**, US: Library of Medicine. Disponível em: <<http://gateway.nlm.nih.gov/MeetingAbstracts/ma?f=102201158.html>>. Acesso em: 30 jul. 2011.

HOLZMULLER, P. et al. Lymphocytes of dogs immunized with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with Leishmania infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, NL, v. 106, p. 247-257, 2005.

HOMMEL, M. Visceral leishmaniasis: biology of the parasite. **The Journal of Infection**, London, GB, v. 39, p. 101-111, 1999.

HORIMOTO, A. M. C.; COSTA, I. P. da. Frequência de autoanticorpos e dosagem de complemento sérico em pacientes com diagnóstico de leishmaniose cutânea ou visceral. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 49, n. 5, p. 529-546, 2009.

HOWARD, M. et al. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. **The Journal of Experimental Medicine**, New York-US, v. 177, p. 1205-1208, apr. 1993.

HUMMADI, Y. M. AL-M.; NAJIM, R. A.; AL-BASHIR, N. M. *Leishmania major* and *Leishmania tropica*: I the in vitro effects of an immunomodulator, S2-Complex. **Experimental Parasitology**, San Diego, US, v. 111, p. 47-54, 2005.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Media, US: Williams e Wilkins, 1993.

JERONIMO, S. M. B. et al. **Tratado de medicina interna**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

JUSTO, G. Z.; DURAN, N.; QUEIROZ, M. L. S. Myelopoietic response in tumour-bearing mice by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, NL, v. 388, p. 219–226, 2000.

JUSTO, G. Z.; DURÁN, N.; QUEIROZ, M. L. S. Natural killer cell activity, lymphocyte proliferation and cytokine profile in tumor-bearing mice treated with mapa,. a magnesium aggregated polymer from *Aspergillus oryzae*. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, New York, US, v. 25, n. 3, p. 305-319, aug. 2003.

KEYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; BERTELS, S.; SIEMS, K. Anti leishmanial activities of aphidicolin and its semisynthetic derivatives. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, DC, v. 45, n. 1, p. 288–292, 2001.

KEMP, M.; THEADER, T. G.; KHARAZMI, A. The contrasting role of CD4+ T cells in intracellular infection in humans: leishmaniasis as an example. **Immunology Today**, Amsterdam, NL, v. 17, n. 1, p. 13-16, jan. 1996.

KUHN, R. W. et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, Cambridge, US, v. 75, n. 2, p. 263-274, Oct. 1993.

LAGE, R. S. et al. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, NL, v. 115, p. 135-145, 2007.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICH, R. **The leishmaniasis in biology and medicine**, London, GB: Academic Press, p.1-121, 1987.

LARANGEIRA, D. F. **Avaliação da imunidade humoral e celular em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* e sua correlação com a transmissibilidade para o vetor.** 79 f. Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecologia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2009.

LAURENTI, M. D. **Patologia e patogenia das leishmanioses.** 140 f. Tese (livre-docência)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2010.

LAVERAN, C. L. A; MESNIL, F. Surun protozoiaire nouveau (*Piroplasma donovani* Lou. Etmean) Parasite d'une fièvre Índé. **Comptes Rendus de l'Association des Anatomistes**, Nancy, FR, n. 137, p. 957-961, 1903.

LIEW, F.Y.; MILLOTT, S. et al. Macrophage killing of *leishmani* parasite in vivo is mediated nitric oxide from l-arginine. **The Journal of Immunology**, Baltimore, US, v. v. 15, n. 144, p. 4794-4797, jun. 1990.

LUZ, K. G., SILVA, V., GOMES, E. Prevalence of anti-*Leishmania donovani* antibody among Brazilian blood donors and multiply transfused hemodialysis patients. **The American Journal Tropical Medicine Hygiene**, Mclean, US, v. 57, p. 168-171, 1997.

MA, G. et al. Antimicrobial and antileishmanial activities of hipocrellins A and B. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, DC, v. 8, n. 11, p. 4450–4452, 2004.

MACIEL, B. L. L. **Associação entre fatores nutricionais e a resposta frente a infecção por *Leishmania chagasi*.** 113 f. Dissertação (mestrado)-Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

MADEIRA, M. F. et al. Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, Berlin, DE, v. 103, n.1, p. 1-10, 2008.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, dez. 2008.

MALAFAIA, G. O sinergismo entre a desnutrição protéico-calórica e a leishmaniose visceral. **Revista Saúde.Com.**, Jequié, BA, v. 4, n. 2, p. 134-147, 2008. Disponível em: <<http://www.uesb.br/revista/rsc/v4/v4n2a05.pdf>>. Acesso em: 25 maio 2011.

MANNA, L. et al. Interferon-gama (INF- γ), IL4 expression levels and *Leishmania* DNA load as prognostic markers for monitoring response to treatment of leishmaniotic dogs with miltedosine and allopurinol. **Cytokine**, San Diego, CA, v. 44, n. 2, p. 288-292, nov. 2008.

MARTIN-DAVILA, P.; FORTUN. J.; LOPEZ-VELEZ, R.; Transmission of tropical and geographically restricted infections during solid-organ transplantation. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 21, p. 60-96, 2008.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, US, v. 27, p. 451-483, 2009.

MARY, C. et al. Control of *Leishmania infantum* Infection Is Associated with CD81 and Gamma Interferon- and Interleukin-5-Producing CD41 Antigen-Specific T Cells. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 67, n. 11, p. 5559–5566, 1999.

MARZOCHI, M.C.A. et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 3, p. 349-357, jul./set. 1985.

MAURICIO, I. L. et al. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, Cambridge, US, v. 119, n. 3, p. 237-246, 1999.

MELO, A. de; JUSTO, G. Z.; SOUZA-QUEIROZ, M. L. de. Stimulation of myelopoiesis in *Listeria monocytogenes*-infected mice by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. **Human & Experimental Toxicology**, Hampshire, GB, v. 20, p. 38-45, 2001.

MICHELIN, A.de F.; PERRI, S.H.V.; LIMA, V.M.F. Evaluation of TNF- α , IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, London, GB, v. 105, n. 5, p. 373–383, 2011.

MORENO, J. et al. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, NL, v. 71, p. 181-195, 1999.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, NL, v. 65, n. 1/2, p. 55–63, dec.1983.

MUKHERJEE, S.; UKIL, A.; DAS, P. K. Immunomodulatory peptide from cystatin, a natural cysteine protease inhibitor, against leishmaniasis as a model macrophage disease. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, DC, v. 51, n. 5, p. 1700-1707, may, 2007.

MURRAY, H.W. et al. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v.70, n.11, p. 6284-6293, 2002.

NICOLE, C. Sur trois cas d'infections spléniques infantiles à corps de Leishman observés en Tunisie. **Archives du Institute Pasteur de Tunisia**, Tunis, TN, v. 3, p. 1-26, 1908.

NOLI, C. Canine leishmaniasis. **Waltham Focus**, v. 9, p. 16-24, 1999.

NOLI, C.; AUXILIA, S. T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. **Veterinary Dermatology**, Oxford, GB, v. 16, p. 213–232, 2005.

NUNES, O. D. (in memoriam); PEREIRA, R. S. Regression of herpes viral infection symptoms using melatonin and SB-73: comparison with Acyclovir. **Journal of Pineal Research**, Malden, US, v. 44, n. 4, may, p.373–378, 2008.

NUNES, O. D. et al. SB-73 a new immunomodulating compound in the treatment of AIDS patients. International Conference on AIDS. In: INTERNATIONAL AIDS CONFERENCE, Florence, IT, 7., 16-21 jun. 1991. **NLM Gateway**, US: Library of Medicine. Disponível em: <<http://gateway.nlm.nih.gov/MeetingAbstracts/ma?f=102183252.html>>. Acesso em: 30 jul. 2011.

NUNES, O. D.; DURAN, N. E. C. **Polymeric Anhydride of Magnesium and Proteic Ammonium Phospholinoleate with Antiviral, Antineoplastic and Immunostimulant Properties**. US n. PI 5,073,630, 17 dec. 1991.

OLIVEIRA, J. A. et al. Effects of immunomodulator SB-73 on the hematologic parameters of the tufted capuchin (*Cebusapella*). A subchronic study. In: INTERNATIONAL AIDS CONFERENCE, Amsterdam, NE, 8., 19-24 jul. 1992. **NLM Gateway**, US: Library of Medicine. Disponível em: <<http://gateway.nlm.nih.gov/MeetingAbstracts/ma?f=102201158.html>>. Acesso em: 30 jul. 2011.

OTERO, A. et al. Short Report: Occurrence of *Leishmania donovani* DNA in donated blood from sero reactive Brazilian blood donors. **The American Journal Tropical Medicine Hygiene**, Mclean, US, v. 62, n. 1, p. 128-131, 2000.

PASTORINO, A.C. et al. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **The Journal of Pediatrics**, Saint Louis, US, v. 78, n. 2, p. 120-127, 2002.

PEREIRA, W. K. V. et al. Immunomodulatory effect of Canova medication on experimental *Leishmania amazonensis* infection. **The Journal of Infection**, London, GB, v. 51, p. 157–164, 2005.

PINELLI, E. et al. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 62, n. 1, p. 229-235, jan. 1994.

PINELLI, E. et al. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, NL, v. 69, p. 121-126, 1999.

PINELLI, E.; GONZALO, R. M.; BOOG, C. J. P. *Leishmania infantum* specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex restricted manner. **European Journal Immunology**, Weinheim, DE, v. 25, p. 1594-1600, 1995.

PINHEIRO, P.H.da C. et al. Recombinant Cysteine Proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* Implicated in Human and Dog T-Cell Responses. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 73, n. 6, p. 3787-3789, jun. 2005.

POLI, A. et al. Comparison of aminosidine (paromomycin) and sodium stibogluconate for treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 71, p. 263-271, 1997.

PURI, A. et al. Immunomodulatory activity of analog of muramyl dipeptide and their use as adjunct to chemotherapy of *Leishmaniadonovani* in hamster. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, NL, v. 5, p. 937-946, 2005.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 550-555, ago. 2003.

REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, US, v. 13, p. 151-157, 1995.

REIS, A. B. et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, GB, v.146, p. 303-311, 2006.

REIS, A.B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, NL, v. 128, p. 87–95, 2009.

RIBEIRO, R. R. et al. Reduced Tissue Parasitic Load and Infectivity to Sand Flies in Dogs Naturally Infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following Treatment with a Liposome Formulation of MeglumineAntimoniate. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, DC, v. 52, n. 7, p. 2564-2572, jul. 2008.

RITTING, M. G.; BOGDAN, C. Leishmania host–cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitology Today**, Amsterdam, NL, v. 16, n. 7, p.292–297, nov. 2000.

ROBERTS, M. T. M. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **British Medical Bulletin**, Edinburgh, GB, v. 75/76, p.115–130, 2006.

ROSA, M. S. S. et al. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, DC, v. 47, n. 6, p. 1895–1901, 2003.

ROSS, R. Further notes on leishman's bodies. **The British Medical Journal**, London, GB, v. 2, p.1401, nov. 1903.

SANTOS, D.O. et al. Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, Berlin, DE, v. 103, p. 1-10, 2008.

SANTOS-GOMES, G. M. et al. Cytokine expression. During the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, NL, v.88, p.21-30, 2002.

SERAFIM, T. D. et al. Immune response to *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection is reduced in malnourished BALB/c mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 6, p. 811-817, set. 2010.

SMITH, A.C. et al. Activity of the novel immunomodulatory compound tucaresol against experimental visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, DC, v. 44, n. 6, p. 1494-1498, jun. 2000.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Histological and Immunohistochemical Study of Clinically Normal Skin of *Leishmania infantum* infected Dogs. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburg, GB, v. 130, n. 1, p. 7-12, jan. 2004.

SOUZA-BRITO, A. R. et al. Biochemical response in a sub-chronic test in rats with the immunomodulator SB-73. REUNIÃO ANNUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA EBIOLOGIA MOLECULAR, 20., 1991. **Resumos ...** Caxambu, MG, 1991

STRAUSS-AYALI, A.; JAFFE, C.; BANETH, G. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Research**, Les Ulis, FR, v. 38, n. 4, p. 547–564, jul./ago. 2007. Disponível em: <http://www.vetres.org/index.php?option=com_article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/vetres/abs/2007/04/v07066/v07066.html>. Acesso em: 27 set. 2011.

TIUMAN, T.S. et al. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, DC, v. 49, n.1, p.176–182, 2005.

UNITED STATES PATENT. Nunes et al. Patent number: 5,073, 630, Date of Patent: Dec. 17, 1991.

VIÑUELAS, J. Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 1001, p. 23-27, 2001.

VOULDOUKIS, I., DRAPIER, J. C., NÜSSLER, A. K. Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage anti*leishmanial* activity via the L-arginine nitric oxide pathway. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, DC, v. 40, p. 253-256, 1996.

WENIGER, B. et al. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal of Ethnopharmacol**, Lausanne, CH, v. 78, n. 2/3, p.193–200, 2001.

WHO. **Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis**, Geneva, 22–26 mar. 2010.

ZER, R. et al. Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. **International Journal of Parasitology**, Oxford, GB, v. 31, p. 810-814, 2001.