

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**NÍVEIS DE IgG ANTI-*LEISHMANIA* E PERFIL DE
CITOCINAS EM CÃES MACHOS E FÊMEAS
ASSINTOMÁTICOS NATURALMENTE INFECTADOS POR
LEISHMANIA (L.) CHAGASI.**

Ana Cláudia Silva Dossi
Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2006

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**NÍVEIS DE IgG ANTI-*LEISHMANIA* E PERFIL DE
CITOCINAS EM CÃES MACHOS E FÊMEAS
ASSINTOMÁTICOS NATURALMENTE INFECTADOS POR
LEISHMANIA (L.) CHAGASI.**

Ana Cláudia Silva Dossi

Orientadora: Profa Dra Valéria Marçal Felix de Lima

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2006

Dossi, Ana Cláudia Silva
D724n Níveis de IgG anti-*Leishmania* e perfil de citocinas em cães machos e fêmeas assintomáticos naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi* / Ana Cláudia Silva Dossi. -- Jaboticabal, 2006
xiii, 63 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006

Orientadora: Valéria Marçal Felix de Lima

Banca examinadora: Rosangela Zacarias Machado, Alexandre Barbosa Reis

Bibliografia

1. ELISA. 2. Cão assintomático. 3. Citocinas. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.928.5:636.7

Trabalho realizado com auxílios financeiros concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP. Processo N° 04/04729-6 (auxílio Pesquisa) e auxílio CAPES da (Bolsa de Mestrado).

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANA CLÁUDIA SILVA DOSSI – nascida em Araçatuba/ SP, aos vinte de Maio de 1977. Ingressou no curso de Ciências Biológicas em meados de Janeiro de 1996, na Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Penápolis, FUNEPE-Penápolis/SP, concluindo o curso em 15 de Dezembro de 1999. Em 2000, ingressou como Técnico de Laboratório na secretaria do Estado da Saúde, Superintendência de controle de Endemias – SUCEN/ Serviço Regional 09 – Araçatuba/SP. No período de 01 de Abril de 2002 a 10 de Dezembro de 2003, foi bolsista TT-3, pela FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, no Projeto: Avaliação do uso Terapêutico de oligodeoxinucleotídeos na Leishmaniose Visceral, sob orientação da Prof^a Dr^a Valéria Marçal Felix de Lima. Em Março de 2004, ingressou como aluna regular no Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA - do curso de Mestrado da FCAV – UNESP- Universidade Estadual Paulista – JÚLIO MESQUITA FILHO, câmpus de Jaboticabal/ SP. Título da Dissertação: Níveis de IgG anti-*Leishmania* e perfil de citocinas em cães machos e fêmeas assintomáticos naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi*, sob orientação da Prof^a Dr^a Valéria Marçal Felix de Lima.

*"As pessoas especiais que encontramos,
tornam o mundo um lugar melhor..."*

(Letícia Rayssa)

Dedicatória:

*Aos meus pais, Cida e Dênis, pelos
grandiosos ensinamentos...
Aos meus irmãos Mauro e Leila, pelo amor
carinho e confiança.*

*Ao meu esposo Júnior, pelo apoio, e pelas
palavras de carinho e incentivo durante este
trabalho...*

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra Valéria Marçal Felix de Lima, pela orientação, oportunidade e confiança durante o período do mestrado.

À Profa Dra Rosemeri Vasconcelos, que desempenhou papel especial neste trabalho, com sua ajuda na leitura de lâminas, e é claro com todo seu caráter, bom humor e companheirismo.

Aos funcionários do CCZ – Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba, pelo esforço e amizade.

Aos funcionários do Hospital Veterinário de Araçatuba, pelo apoio e compreensão a nos ceder o canil.

À Marina pela ajuda, amizade e pelos cautelosos cuidados com os animais.

Ao mestrando Maurício Franco Zanete pela amizade, consideração.

Ao Prof. Dr. Marcelo, por disponibilizar a utilização do seu laboratório, permitindo o uso do nitrogênio líquido, e outros equipamentos.

À Profa Dra Caris Maroni Nunes, pela colaboração em nosso trabalho.

A doutoranda Alexéia pelas dicas na técnica do Western Blot.

Ao Prof Dr Danísio, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À amiga Ana Paula, pelo carinho e companhia durante todos os experimentos e principalmente pela amizade, não esquecendo de forma alguma do “sai daqui...”

A todos do Laboratório de Patologia, pelo carinho, atenção e amizade.

Ao Laboratório Clínico Veterinário da UNESP; ao Prof. Dr Paulo Cearline e a Profa. Dra Sueli pelos hemogramas. À Profa Dra Sueli, pela amizade, consideração e pelo carinho. À Juliana Falcato Vecina, pela consideração, apoio e amizade.

Ao amigo Fábio Bonello pelas constantes discussões no mestrado e pela amizade.

A CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de mestrado.

A todo pessoal do Departamento de Microbiologia de Jaboticabal pelo apoio e carinho durante o período das disciplinas.

A secretária Edna Testa D'aquila devido a sua grande competência e dedicação em seu trabalho, pela sua amizade e carinho.

Ao meu esposo Júnior pelo carinho, dedicação e principalmente pelo incentivo neste período.

Aos meus irmãos Mauro e Leila, aos meus Pais, e aos meus familiares pela força e incentivo.

A todas pessoas que diretamente e indiretamente colaboraram para a elaboração desta dissertação.

E, principalmente aos amigos que conquistei durante o percurso deste projeto.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	1
1.1 Aspectos gerais.....	1
1.2 A imunidade adaptativa na leishmaniose visceral.....	4
1.3 Citocinas regulatórias na LV	7
1.3.1 TGF- β	8
1.3.2 IL-10.....	9
1.3.3 INF- γ	10
1.4 A influência do sexo na leishmaniose.....	12
2. OBJETIVOS	
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. MATERIAL E MÉTODO.....	16
3.1 Animais.....	16
3.2 Coleta das amostras	16
3.3 Detecção de anticorpo <i>L. (L.) chagasi</i> pelo ELISA indireto.....	17
3.4 Western Blotting.....	18
3.5 Cultura de células do baço.....	18
3.6 Quantificação de TGF- β_1	19
3.7 ELISA de citocinas: INF- γ e IL-10.....	19
3.8 Análise Estatística.....	20
4. RESULTADOS	22
4.1 Nível de IgG anti- <i>Leishmania</i> , em cães assintomáticos naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i>	22
4.2 Reatividade cruzada no soro do TGF- β canino com o TGF- β humano.....	25
4.3 Avaliação da produção do TGF- β no sobrenadante do extrato de baço, fígado e no sobrenadante de células esplênicas.....	27
4.4 Avaliação da produção de IL-10 E INF- γ no sobrenadante do extrato do baço e do fígado.....	30
5. DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÃO.....	40
7. REFERÊNCIAS.....	41
APÊNDICE.....	54

LISTA DE ABREVIÇÕES

APS	Persulfato de Amônio
BSA	Albumina sérica bovina
CCZ	Centro de Controle de Zoonozes
CTLA-4	Proteína A 4 associada a linfócito T ativado
DAB	Diaminobenzedina
DO	Densidade Óptica
ELISA	Ensaio imunoenzimático
g	Gramma
h	Hora
Ig	Imunoglobulinas
IL	Interleucina – 2, 4, 5, 10, 12
INF- γ	Interferon gama
Kg	Quilograma
l	Litro
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
LT	Leishmaniose Tegumentar
<i>L</i>	<i>Lutzomyia</i>
LV	Leishmaniose Visceral
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
M	Molar
mg	Miligramas
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
min.	Minutos
ml	Milímetro
mM	Milimolar
<i>n</i>	Número de Amostras
NK	Células Natural Killer
°C	Graus Celsius

PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
qsp	Quantidade Suficiente Para
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS	Sodium-dodecil-sulfato
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
SRD	Sem Raça Definida
SUCEN	Superintendência e Controles de Endemias
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento β
Ta	Células T auxiliares
Ta1	Células T auxiliares tipo1
Ta2	Células T auxiliares tipo 2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral - α
UNESP	Universidade Estadual Paulista
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μm	Micrômetro
ηm	Nanômetros

**NÍVEIS DE IgG ANTI-*LEISHMANIA* E PERFIL DE CITOCINAS EM CÃES
MACHOS E FÊMEAS ASSINTOMÁTICOS NATURALMENTE INFECTADOS
COM *LEISHMANIA (L.) CHAGASI***

RESUMO - O cão é o principal reservatório da *Leishmania (Leishmania) chagasi*, o parasita responsável pela Leishmaniose Visceral (LV) nas Américas. Na (LV) estudos em modelos experimentais, têm mostrado diferenças na resposta imunológica entre macho e fêmea. Na (LVC) tais estudos, não foram realizados. Este trabalho investigou em cães assintomáticos machos e fêmeas, naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*, os níveis séricos de IgG contra antígenos totais de *Leishmania*, o nível de IL-10 e IFN- γ , no sobrenadante do extrato do baço e fígado, e a citocina regulatória TGF- β no sobrenadante do extrato do baço e fígado, e sua produção natural no sobrenadante de cultura de células esplênicas. Os níveis de anticorpos anti-*L. (L.) chagasi* da classe IgG nos cães assintomáticos machos e fêmeas, não apresentaram diferença significativa entre o sexo. O nível de IL-10 mostrou-se elevado, no sobrenadante do extrato do fígado em cães infectados machos e fêmeas assintomáticos e apresentou dominância marcante em relação às outras citocinas. O nível do TGF- β mostrou-se aumentado no extrato do baço. O nível de IFN- γ no baço dos grupos avaliados foi quantitativamente menor que as citocinas IL-10 e TGF- β , diferindo do observado no fígado onde foi observado uma baixa produção de TGF- β em relação ao IFN- γ . No baço, o IFN- γ apresentou diferença significativa em fêmeas assintomáticas quando comparadas com os machos assintomáticos. A observação da predominância das citocinas TGF- β no baço, e IL-10 no baço e fígado, em modelo ex vivo, sugere uma polarização da resposta imunológica para o padrão Th2 em cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*.

Palavras-chaves: Cão Assintomático, ELISA, IFN- γ , IL-10, Sexo, TGF- β

**LEVEL OF IgG ANTI-*LEISHMANIA* AND PROFILE OF CYTOKINES IN MALE
AND FEMALE ASYMPTOMATIC DOGS NATURALLY INFECTED BY
*LEISHMANIA (L.) CHAGASI***

SUMMARY - The dog is the main reservoir of *Leishmania (Leishmania) chagasi*, the parasite responsible for Visceral Leishmaniasis (VL) in the Americas. Experimental studies on VL have shown differences in the immune response of males and females. Such studies have not been carried out on canine visceral leishmaniasis. This study investigated the seric level of IgG against *Leishmania* total antigens, the levels of IL-10 and IFN- γ in the supernatant of spleen and liver extracts, the regulatory cytokine TGF- β_1 in the supernatant of spleen and liver extracts, and its natural production in the supernatant of spleen cell culture, in male and female asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (L.) chagasi*. The levels of anti-*L. (L.) chagasi* IgG antibodies in male and female asymptomatic dogs did not differ significantly between the sexes. IL-10 level was high in the supernatant of the liver extract of male and female asymptomatic infected dogs and predominated over the other cytokines. TGF- β_1 level was increased in the spleen extract. The level of IFN- γ in the spleen of the group evaluated was quantitatively lower than the IL-10 and TGF- β_1 cytokine levels, different from what was observed in the liver, where a low production of TGF- β_1 was observed when compared to IFN- γ . In the spleen, IFN- γ presented a significant difference in the asymptomatic females when compared to the asymptomatic males. The observation of a predominance of TGF- β_1 cytokines in the spleen and of IL-10 in the spleen and liver of an *ex vivo* model suggests a polarization of the immune response towards the Th2 pattern in dogs naturally infected by *Leishmania (L.) chagasi*.

Keywords: Asymptomatic Dog, ELISA, IFN- γ , IL-10, Sex, TGF- β

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Aspectos gerais

A leishmaniose visceral também conhecida como Calazar, é uma enfermidade parasitária, de caráter zoonótico e de distribuição mundial. A doença é causada por protozoários pleomórficos, da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, e do gênero *Leishmania*. De acordo com a espécie, temos manifestações cutâneas, mucocutâneas, cutâneas difusas e viscerais. Os parasitos, de acordo com a espécie, são classificados em dois grandes grupos: os que causam a leishmaniose tegumentar (LT) e os que causam a leishmaniose visceral (LV). Até recentemente, a leishmaniose visceral era considerada uma doença de zonas rurais e de ambientes silvestres, mas, atualmente já está presente em zonas suburbanas e urbanas SANTA ROSA & OLIVEIRA (1997); RIBEIRO (1997).

Nas Américas, a LV é conhecida como leishmaniose visceral americana (LVA) e tem como agente etiológico o protozoário da espécie *Leishmania (L.) chagasi*, que recentemente tem sido considerada idêntica a *Leishmania (L.) infantum* SANTA ROSA e OLIVEIRA, (1997); MILES et al. (1999).

Os principais hospedeiros vertebrados incluem uma grande variedade de mamíferos, entre eles, roedores, canídeos, edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados primitivos, primatas e o homem, ALENCAR et al. (1991).

A (LV) tem sido notificada nos cães e no homem, em vários estados brasileiros, sendo considerada uma endemia. Esta zoonose era relatada como uma doença rural, entretanto, nos últimos anos tem aumentado sua prevalência em áreas urbana de grandes cidades do Brasil como Belo Horizonte, Rio de Janeiro e São Paulo MILES et al. (1999).

O primeiro relato da ocorrência de leishmaniose visceral canina no Estado de São Paulo ocorreu em 1998, na cidade de Araçatuba, e foi diagnosticado pelo Serviço de Patologia do Hospital Veterinário da UNESP. Desde então, a doença vem se

disseminando, em toda a região, totalizando 40 municípios com transmissão canina na região de Araçatuba FEITOSA (2001); MIRACELLY (2003).

Os parasitos apresentam duas formas principais: a forma promastigota, que possui núcleo, cinetoplasto e um flagelo livre, encontrada no tubo digestivo do vetor e a forma amastigota, contendo núcleo e cinetoplasto, encontrada principalmente no interior de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM). Ambas as formas se multiplicam por processo de divisão binária ALENCAR et al. (1991).

A transmissão entre hospedeiros vertebrados ocorre através da picada de insetos vetores pertencentes à família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, insetos hematófago da espécie *Lutzomyia longipalpis*, nos vertebrados são encontradas a forma amastigota e no inseto é encontrada a forma promastigota ALENCAR et al. (1991); GENARO et al. (1993).

Os flebotomíneos são conhecidos no Brasil como mosquito palha, asa dura, birigui e tatuquiras SANTA ROSA e OLIVEIRA, (1997). São insetos de pequeno porte (1,0 a 4,0 mm) com o corpo e asas pilosos e coloração castanho claro ou cor palha. Possuem um comportamento característico de voar em pequenos saltos e pousar com as asas entreabertas, o que facilita a sua identificação CASTRO, (1996).

As fêmeas da espécie *L. longipalpis*, são hematófagas e necessitam de ingerir sangue para a maturação dos ovos, elas realizam o repasto sangüíneo no período noturno, iniciando-o cerca de uma hora após o crepúsculo. Quando infectada, a fêmea do flebotomíneo inocula a forma promastigota metacíclica infectante no hospedeiro vertebrado, a qual é fagocitada por macrófagos na derme. As formas promastigotas diferenciam em formas amastigotas no interior das células do hospedeiro vertebrado e passam a se reproduzir por divisão binária. Quando repletas de formas amastigota, as células se rompem, levando a disseminação do parasito por todo o organismo do hospedeiro REY et al. (1991).

Apesar da transmissão da leishmaniose geralmente ocorrer através da picada de um flebotomíneo, é possível que ela ocorra também por contato direto entre o material infectado (úlceras ou secreções), pele lesionada, acidentes no laboratório (através da auto-inoculação por meio de material perfurocortante), transfusão sangüínea ou uso de

drogas. No entanto, estes meios de transmissões devem ser considerados excepcionais, não fazendo parte da epidemiologia da doença. A transmissão congênita pelas células do sistema fagocitário mononuclear infectadas por amastigotas que atravessam a placenta e o contato do sangue materno com o feto no momento do parto também foi relatada GENARO et al. (2003).

O ciclo biológico da *Leishmania (L.) chagasi* é do tipo heteroxênico, envolvendo como transmissor as fêmeas da *Lutzomia longipalpis*, que ao picar um vertebrado infectado, o inseto ingere juntamente com o sangue macrófagos parasitados pelas formas amastigotas. Estas formas amastigotas sofrem uma multiplicação e transformam em promastigotas adaptando-se as novas condições fisiológicas existentes. Após o repasto sangüíneo são encontradas as formas promastigotas que se multiplicam rapidamente por divisão binária, colonizando o trato digestivo do flebotomíneo. Ao exercer novo repasto sangüíneo em um hospedeiro não infectado, sendo o homem ou outro reservatório vertebrado, o flebotomíneo inocula as formas promastigotas tornando-o infectado pelo parasito .

Os cães, considerados os principais reservatórios fora do ambiente silvestre, são importantes na manutenção do ciclo epidemiológico da doença porque a leishmaniose visceral é mais prevalente na população canina que na humana. A infecção no homem, normalmente é precedida por casos caninos, os cães apresentam maior quantidade de parasitos na pele do que o homem, fato que favorece a infecção dos vetores SANTA ROSA & OLIVEIRA, (1997).

Em cães, após a infecção da pele, ocorre a disseminação do parasito por todo o organismo com posterior desenvolvimento dos sintomas. O aparecimento dos sinais clínicos depende da imunocompetência do hospedeiro. A doença canina é geralmente crônica, podendo ser assintomática ou sintomática, quando sintomática é caracterizada por alguns sintomas como: emagrecimento, onicogribose, linfadenopatia, lesões de pele, anemia, conjuntivite, apatia, e outros FERRER, (1999). Geralmente observa-se febre irregular por longos períodos, anemia, alterações dermatológicas e perda de peso progressiva FEITOSA et al. (2000). Pode ocorrer ainda uma evolução de característica latente, e até mesmo a cura espontânea PINELLI et al. (1999a).

A forma assintomática da doença geralmente representa de 20 a 40 % de uma população soropositiva e aproximadamente 80 % desenvolvem a doença NOLI, (1999).

1.2. A imunidade adaptativa na Leishmaniose visceral

Após o processo de infecção, as *Leishmanias* são susceptíveis à ação de neutrófilos, mas, a rápida entrada nos macrófagos, permite ao parasito escapar dos mecanismos microbicidas dos neutrófilos MACHADO et al. (2004), e se expandir nas células do sistema mononuclear fagocítico.

Após a entrada do parasito nos macrófagos ocorre o processamento de antígeno e apresentação para as células T. De maneira geral, a população de linfócitos T auxiliares subdivide-se em duas subpopulações: linfócitos T auxiliares tipo1 (Ta1) e linfócitos T auxiliares tipo 2 (Ta2), as quais são definidas com base no seu padrão de citocinas MOSMANN et al. (1986). As células Ta1 secretam interleucina-2 (IL-2) e interferon- γ (IFN- γ) induzindo a ativação de macrófagos e a resposta mediada por células CHER & MOSMANN, (1987), enquanto que as células Ta2 secretam interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-10 (IL-10) e fator β de transformação do crescimento (TGF- β) fornecendo maior ajuda à resposta mediada por anticorpos COFFMAN et al. (1988); BACELLAR et al. (2000).

Os fatores iniciais que contribuem para a inibição ou proliferação dos parasitos nas células do hospedeiro são pouco compreendidos, mas, citocinas tais como: interferon gama (IFN- γ), interleucina-12 (IL-12), interleucina-10 (IL-10) e Fator β de transformação e crescimento (TGF- β), são conhecidas por influenciar na replicação dos parasitos em macrófagos KEHRL et al., (1986); FOX et al. (1992); MURRAY et al. (1995); BRIGHT et al. (1998); WILSON et al. (1998); WALKER et al. (1999); OMER et al. (2000).

A resistência na LV envolve citocinas como: interleucina-2 (IL-2), interferon-gama (IFN- γ), interleucina-12 (IL-12); e a suscetibilidade está mais associada com a produção de interleucina-10 (IL-10), sendo essa citocina considerada supressora da resposta

imune na Leishmaniose visceral GOTO & LINDOSO, (2004); BACELAR et al. (2000); GOMES et al. (2000).

O controle de algumas infecções por *Leishmania* está associado ao desenvolvimento da resposta imune adaptativa a antígenos específicos, com produção de INF- γ pelos linfócitos Ta1 e a subsequente ativação de macrófagos com produção de óxido nítrico BOGDAN & RÖLLINGHOFF, (1998), por outro lado à resposta Ta2 tem sido associada com suscetibilidade a doença.

Os modelos experimentais em roedores têm sido muito utilizados para estudar a infecção por *L. donovani* e em menor extensão *L. chagasi* e *L. infantum*. Esses apresentam resistência ou suscetibilidade a infecção, mas mesmo as linhagens susceptíveis resolvem a infecção BARBOSA et al. (1987), o que torna os roedores um modelo inadequado para o estudo da doença visceral disseminada. Em contraste, os hamsters desenvolvem doença progressiva no qual os parasitos replicam no fígado, baço e medula causando a morte do hospedeiro GHOSH et al. (1987).

Nos hamsters infectados com *L. donovani*, observa-se no baço altos níveis de RNAm para IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-10 e TGF- β . Embora pouca ou nenhuma IL-4, e existe uma diminuição da expressão do gene que codifica a iNOS, levando a baixa produção Óxido Nítrico (NO). Esses fatores associados levam a falha no mecanismo de morte do parasito pelo sistema imunológico MELBY et al. (2001).

Em contraste, a grande quantidade de dados existentes sobre leishmaniose experimental existe pouca informação sobre a base imunológica em cães com leishmaniose visceral. Nos cães, os mecanismos envolvidos na proteção ou suscetibilidade ainda não estão estabelecidos. Os poucos estudos realizados até o momento não tem sido capazes de estabelecer a existência de dicotomia Ta1 e Ta2. Em cães a resistência à infecção está associada a baixos níveis de anticorpos específicos e desenvolvimento de imunidade celular, com a produção de IL-2, TNF α , e IFN- γ , PINELLI et al. (1994), as citocinas de Ta1 são capazes de estimular a atividade microbicida do macrófago. A suscetibilidade está correlacionada com altos níveis de anticorpos e ausência de resposta mediada por células sem detectável resposta de Ta2.

Estudos recentes, avaliando o perfil de citocinas na leishmaniose visceral canina através de RT-PCR, têm mostrado que os linfócitos de cães assintomáticos infectados experimentalmente que desenvolvem imunidade celular expressam citocinas de Ta1, mas *in vitro* após a estimulação com antígeno solúvel expressam uma resposta Ta1 e Ta2. A imunossupressão que os cães doentes mostram não tem sido associado a um padrão específico de citocinas PINELLI et al. (1999) ou com o aumento de IL-10, que em humanos está associado com suscetibilidade a doença KANE & MOSSER, (2001).

Em tecidos infectados de cães doentes não existe aumento da produção de IL-10 e somente um ligeiro aumento de IL-4 é detectável QUINNELL et al. (2001). É possível que, em cães a resposta seja induzida Ta2 durante o período de incubação da doença e isso poderia determinar a progressão da infecção e o aparecimento dos sintomas.

Em cães experimentalmente infectados observa-se que nos primeiros meses de infecção poucos animais expressam citocinas indutoras de resposta celular, tal fato, pode estar associado ao estabelecimento da infecção, por outro lado, após 11 meses de infecção existe um aumento da proporção de animais expressando IFN- γ e IL-2 SANTOS-GOMES et al. (2002).

Em cães assintomáticos a resposta imunológica é caracterizada por imunidade celular, em contraste em cães sintomáticos a doença está associada com diminuição do número de linfócitos T e B BOURDOISEAU et al. (1997).

A falta de imunidade celular constitui o aspecto mais importante na patogênese e progressão da doença. A falha da resposta das células T é observada pela ausência de resposta linfoproliferativa *in vitro* e reação de hipersensibilidade de tipo tardia negativa para *Leishmania* SACKS et al. (1987); CARVALHO et al. (1989). A infecção não significa necessariamente doença ativa e animais de uma mesma área endêmica podem desenvolver diferentes respostas celulares, como reações de hipersensibilidade de tipo tardio CARDOSO et al. (1998).

Em cães infectados com *Leishmania infantum*, observa-se uma redução no número de linfócitos T CD4+, concomitante, a proliferação do parasito nos macrófagos, o que sugere ausência de resposta imune efetiva no sentido de eliminar o parasito BOURDOISEAU et al. (1997b). A perda das células T CD4+ aumenta a capacidade

dos cães de infectar os flebotomíneos durante a progressão da infecção e a falta da capacidade de controlar o parasitismo permite ao animal a disseminação do parasito para outros tecidos, aumentando a carga parasitária ALVAR et al. (2004).

Essa imunossupressão é uma consequência em parte da diminuição de células T CD4+. Portanto, o grande número de parasitos observados no baço pode ser uma consequência de uma disfunção imunológica, permitindo a multiplicação e disseminação do parasito para vários órgãos incluindo estômago, intestino e pulmão HERVÁS et al. (1996).

Em cães o desenvolvimento de resposta imunológica inadequada leva a hipergamaglobulinemia. Esta pode também ser responsável por diversas manifestações auto-ímmunes, tais como: o aumento de imunocomplexos circulantes LOPEZ et al. (1996) e formação de anticorpos anti-núcleo SLAPPENDEL, (1988); MARTINEZ MORENO et al. (1993).

A alta produção de anticorpos nos animais sintomáticos leva a formação de imunocomplexos e a subsequente ativação do sistema complemento causando a vasculite, uveíte, artrite, dermatite GALVÃO CASTRO et al. (1984) e especialmente glomerulonefrite e falha renal SLAPPENDEL, (1988).

A correlação entre as classes e subclasses de imunoglobulinas produzidas e o tipo de resposta em humanos tem sido relatado ANAM et al. (1999). Em cães as subclasses de IgG não são marcadores úteis de estabelecimento de suscetibilidade ou resistência a doença QUINNELL et al. (2003).

Estudos com cães naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi*, mostraram que a produção de imunoglobulinas IgE está associada a sintomas mais severos, e a produção desta subclasse está correlacionada a citocinas de Th2 sugerindo este padrão de resposta ALMEIDA et al. (2005).

1.3. Citocinas regulatórias na LV

1.3.1. TGF- β

O TGF- β - Fator β de Transformação e Crescimento, constitui uma família de citocinas (TGF- β_1 , TGF- β_2 , TGF- β_3), porém o TGF- β_1 é a principal molécula produzida por células imune (célula T, monócitos, e macrófagos), OMER et al. (2000). O TGF- β é uma proteína de 25-kDa produzida por muitas células, incluindo a célula B, linfócito T e macrófagos ativados KEHRL et al. (1986); OMER et al. (2000).

O TGF- β é liberado das células do sistema imunológico inativo ligado a um peptídeo associado à latência (LAP) BARRAL-NETTO et al. (1992), o qual o torna inativo. Extracelularmente, o complexo se liga a proteína ligadora de TGF- β e é estocado na matriz extracelular. Para exercer sua atividade biológica, o TGF- β latente deve ser liberado do peptídeo associado à latência e da proteína ligadora de TGF- β . A ativação pode ocorrer através de vários mecanismos incluindo ação de enzimas que atuam nas proteínas associadas a citocina MUNGER et al. (1997).

O TGF- β é uma citocina multifuncional com potentes efeitos imunossupressores na proliferação celular, produção de citocinas e atividade citotóxica da célula T, KEHRL et al. (1986); FOX et al. (1992); SCHIMITT et al. (1994); BRIGHT et al. (1998); WILSON et al. (2002). O TGF- β inibe o desenvolvimento de resposta Ta1 pelas citocinas IL-12 e IFN- γ SCHIMITT et al. (1994) e bloqueia IL-12 de induzir a sinalização Jak-Star e a produção de IFN- γ por células T ativadas BRIGHT et al. (1998). O TGF- β altera a função dos macrófagos inibindo a síntese de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a produção de óxido nítrico VODOVOTZ et al. (1993); WAHL, (1994); OMER et al. (2000). Essas atividades fortemente sugerem um papel deletério para TGF- β na montagem de uma resposta protetora anti-parasitária Ta1. Adicionalmente, o TGF- β induz regulação negativa de algumas funções microbicidas dos macrófagos e aumento da replicação intracelular de *Leishmania* BARRAL-NETTO et al. (1992); BARRAL-NETTO et al. (1993).

Estudos têm demonstrado que algumas espécies de *Leishmania* induzem a produção de TGF- β por macrófagos BARRAL-NETTO et al. (1992). Então, a presença do parasito pode iniciar e promover a expressão do TGF- β .

Na leishmaniose visceral experimental, estudos recentes têm sugerido um papel patogênico para TGF- β no curso da visceralização da infecção. Em camundongos experimentalmente infectados, a ligação de CTLA-4 presente nos linfócitos TCD4+ a seu contra ligante B7 nos macrófagos, aumenta secreção de TGF- β e interrompe a defesa anti-parasitária do hospedeiro GOMES et al. (2000), nestes animais o uso de anticorpos neutralizantes para TGF- β sugere que o TGF- β atue como mediador solúvel suprimindo a produção de IFN- γ nas culturas com granulomas hepáticos. Em contraste, a neutralização das citocinas produzidas pelas células Ta2 como: IL-10 e IL-4 que não afetam a quantidade de IFN- γ na cultura WILSON et al. (1998).

Em hamsters experimentalmente infectados por *Leishmania donovani* e camundongos experimentalmente infectados por *Leishmania chagasi* foi observado um aumento da produção de TGF- β ativo em cultura de macrófagos RODRIGUES et al. (1998); GANTT et al. (2003). Estudos *in vitro* demonstraram que o parasito causa ativação do TGF- β para liberação do complexo latente GANTT et al. (2003).

Apesar de inúmeros relatos sobre o papel do TGF- β na leishmaniose visceral, nenhum estudo avaliou a atividade desta citocina em cães naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi*.

1.3.2 Interleucina-10

Outra citocina muito estudada na leishmaniose visceral, é a IL-10. A IL-10 é uma citocina produzida pelos macrófagos ativados e por algumas células T auxiliares, cuja principal função é inibir os macrófagos ativados e inibir a produção de citocinas do tipo Ta1, e desta forma manter o controle homeostático das respostas imunes inatas e das mediadas por células BARRAL-NETTO et al. (1998).

Em infecção humana, a IL-10 tem importante papel regulatório, inibi a resposta linfoproliferativa de células mononucleares do sangue periférico a antígenos do parasito e a produção de IFN- γ , por outro lado, a IL-4 e o TGF- β não têm esta atividade BACELLAR et al. (2000). Na infecção experimental em camundongos a IL-10 parece não ter papel inibindo a produção de IFN- γ WILSON et al. (1998).

Um das ações biológicas da IL-10 é inibir muitas funções dos macrófagos ativadas MELBY et al. (2001); tais como: a produção das citocinas IL-12 e TNF e inibir a expressão de co-estimuladores e das moléculas do MHC classe II sobre os macrófagos BOGDAN et al. (1991).

A IL-10 está relacionada à patogênese da infecção em humanos KARP et al. (1993). Estudos mostram que na LVH há níveis significativamente altos de IL-10 e também de INF- γ , provando a existência dos dois tipos de resposta imune Ta1 e Ta2, KARP et al. (1993); KENNEY et al. (1998). Outros estudos sugerem que a IL-10 atue como um fator regulatório que permite o balanceamento entre os dois tipos de respostas KEMP et al. (1999). A neutralização de IL-10 restabelece a proliferação de linfócitos e a produção de INF- γ pelas células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LV ativa CARVALHO et al. (1994); GHALIB et al. (1995).

GHALIB et al. (1993) relataram que pacientes com LV aguda têm habilidade para responder especificamente ao antígeno de *Leishmania* com produção de IL-10. Sugerem que esta seja importante para a persistência do parasito nas células do hospedeiro, possivelmente porque macrófagos e células T estejam produzindo IL-10 em resposta a *Leishmania* e ambos são importantes para a regulação negativa da resposta das células T.

Em cães assintomáticos, experimentalmente infectados com *L. infantum* foi observado a expressão de IL-10 em células mononucleares de sangue periférico estimuladas com antígeno destes animais SANTOS-GOMES et al. (2002) CHAMIZO et al. (2005), sugerindo um papel regulatório. Por outro lado, IL-10 não foi detectada no aspirado de medula de animais naturalmente infectados por *L. chagasi* QUINELL et al. (2001).

1.3.3. Interferon-gama

O IFN- γ é a principal citocina produzida pelos linfócitos T e pelas células matadoras naturais (NK), cuja principal função é ativar os macrófagos, tanto nas

respostas imunes inatas como nas respostas imunes adquiridas mediadas pelas células. IFN- γ é também chamado de IFN tipo II ou IFN- γ imune ABBAS et al. (2003).

A citocina IFN- γ exacerba a ação microbicida dos macrófagos estimulando a síntese de intermediários reativos do oxigênio e do óxido nítrico; estimula a expressão das moléculas de classe I e de classe II do MHC e dos co-estimuladores sobre as APCs. Promove a diferenciação das células T CD4+ virgens para a sub população Ta1. O efeito final do IFN- γ é promover reações inflamatórias ricas em macrófagos e ao mesmo tempo inibir reações ricas em eosinófilos e dependentes de IgE.

O INF- γ desenvolve um papel central na limitação do crescimento de *Leishmania*, INF- γ recombinante ativa macrófagos humano e de camundongo a matar *L. donovani* MURRAY et al. (1983); MURRAY et al. (1985), demonstraram que em modelos murinos é limitante da progressão das leishmanioses, assim, a modulação sistêmica ou localizada dos níveis de INF- γ pode ser um determinante crítico da resolução da doença MURRAY et al. (1992). Apesar de sua importância no controle da doença, somente INF- γ não é suficiente para eliminar o parasito, pois, é necessário também que se tenha à produção de IL-12, migração de células T e células dendríticas para os sítios de parasitismo crônico MELBY et al. (2001).

Na infecção humana por *Leishmania* a produção de INF- γ aumenta a atividade microbicida dos macrófagos MURRAY et al. (1983), e está envolvida no mecanismo de proteção.

Em cães infectados com *L. infantum*, em estudo semi-quantitativo avaliando a expressão de citocinas, foi mostrado que a expressão de IFN- γ e IL-12 está associado com o estabelecimento silenciosos da infecção e com o aparecimento tardio da doença progressiva SANTOS- GOMES et al. (2002).

Em cães, o nível de INF- γ nos tecidos como parâmetro singular, talvez não seja um indicador de resistência a doença, porque cães naturalmente infectados com *L. chagasi*, apresentando ou não sintomatologia, acumulam níveis similares de INF- γ no aspirado de medula óssea QUINNELL et al. (2001).

Na infecção natural de cães por *L. chagasi*, a produção de INF- γ está fortemente associada à produção de anticorpos, o que sugere uma grande regulação positiva de resposta imune anti-*Leishmania* no hospedeiro infectado QUINNELL et al. (2001).

STRAUSS-AYALI et al. (2005), observaram que as células mononucleares do sangue periférico de cães experimentalmente infectados por *L. (L.) infantum* proliferaram e produziram INF- γ em resposta a antígenos, tal produção, não foi detectada em cães naturalmente infectados ou em cães controle, a estimulação com IL-12 exógeno, reverte à capacidade dos animais naturalmente infectados de produzirem o INF- γ .

1.4 A influência do sexo na Leishmaniose

A literatura apresenta algumas observações em que infecções parasitárias são diferentes entre machos e fêmeas KLEIN (2004); ALEXANDER et al. (1999). Conseqüentemente, na Leishmaniose observações demonstram que o sexo e a idade podem influenciar o curso da infecção, levando a resistência ou suscetibilidade ROBERTS et al. (2001).

Além do papel regulatório das citocinas, os hormônios sexuais, têm sido implicados, na evolução da resposta imune na leishmaniose. Tem sido relatado que os hormônios sexuais podem atuar na evolução da infecção. A resposta imunológica humoral e celular é mais intensa em fêmeas do que a induzida em machos sob as mesmas condições experimentais. A resposta imunológica menos intensa dos machos é revertida pela castração ou redução da testosterona OLSEN & KOVACS, (1996) implicando que os hormônios atuam de maneira direta na resposta imunológica.

A castração ou a terapia com estrógeno altera a incidência e a severidade de doenças auto-imunes desencadeadas pela resposta Ta1 em machos GROSSMAN et al. (1991). Os hormônios sexuais influenciam a resposta imunológica, incluindo as citocinas produzidas pelas células T após ativação BEBO et al. (1999).

O papel dos hormônios sexuais no desenvolvimento da resposta imunológica tem sido demonstrado. Existem diferenças na secreção de IL-10 e IL-12 pelas células

apresentadoras de antígenos associadas ao sexo WILCOXEN et al. (2000). As células apresentadoras de antígenos provenientes de camundongos machos durante a ativação das células T secretam IL-10, mas não IL-12, este padrão é invertido em células apresentadoras de antígenos provenientes de animais fêmeas. De maneira similar às células T na presença de andrógenos exógenos secretam mais IL-10 e menos IFN- γ do que células T selecionadas na ausência de andrógenos BEBO et al. (1999).

Estudos epidemiológicos indicaram que a Leishmaniose ocorre mais freqüentemente entre machos adultos do que em fêmeas JONES et al. (1987); ARMIJOS et al. (1997) e outro estudo de área endêmica, mostrou que o homem adquire Leishmaniose cutânea ou Leishmaniose visceral mais freqüentemente que a mulher SHIDDO et al. (1995).

Foi observado em hamsters infectados por *L. (V.) panamensis*, que o sexo teve uma influência significativa na evolução clínica da resposta imunológica. Neste modelo o sexo foi determinante na resposta imune do hospedeiro sendo que machos apresentam um aumento na produção de citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- β quando comparados às fêmeas TRAVI et al. (2002).

Em camundongos machos, experimentalmente infectados com *L. (L.) major* uma quantidade bem superior de formas amastigotas foi encontrada no fígado desses animais, quando comparados à quantidade de parasitas no fígado das fêmeas. Além disso, foi observada uma diminuição de 20% no número de parasitas no fígado de machos castrados quando comparados com o grupo controle. Em fêmeas tratadas com testosterona houve um aumento de 88% no número de amastigotas no fígado, sendo esse, diferente significativamente maior do que o encontrado nas fêmeas tratadas com placebo MOCK et al. (1988).

Na infecção experimental em hamsters machos e fêmeas por *L. (L.) donovani* foi mostrado que os machos apresentam maior número de parasitas que as fêmeas. Em animais castrados a administração de testosterona aumenta a contagem de parasitas em machos e fêmeas, por outro lado a administração de estradiol suprime a infecção.

Esses dados sugerem um papel modulatório dos hormônios sexuais na suscetibilidade a infecção por *L. (L.) donovani* ANURADHA et al. (1990).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar parâmetros imunológicos nos cães machos e fêmeas assintomáticos, naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*; e observar a existência de diferenças imunológicas associadas ao sexo.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Verificar os níveis de anticorpos séricos anti-*L. (L.) chagasi* da classe IgG , em cães machos e fêmeas assintomáticos, naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi* e nos controles (animais não infectados);

2.2.2. Avaliar a produção de TGF- β no sobrenadante de células do baço e no sobrenadante do extrato do baço e do fígado, em cães machos e fêmea assintomáticos, naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi*;

2.2.3. Avaliar a produção das citocina IL-10 e IFN- γ , no sobrenadante do extrato do baço e do fígado, em cães machos e fêmeas assintomáticos, naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi* .

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Neste estudo foram selecionados 30 cães adultos de área endêmica, naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, provenientes do Centro de Controle de Zoonozes (CCZ) do município de Araçatuba/ SP- Brasil e animais procedentes do atendimento do Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira”, do curso de Medicina Veterinária – UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Araçatuba.

Os cães classificados como assintomáticos foram divididos em dois grupos: fêmeas ($n=15$) e machos ($n=15$), todos soropositivos para IgG anti-*L. chagasi* pelo método de ELISA indireto LIMA et al. (2003) com títulos altos de anticorpos.

O grupo de cães foi selecionado de acordo com a idade, sexo e raças indefinidas. Os cães selecionados tinham de dois a seis anos e foram identificados de acordo com a arcada dentária. Em relação ao sexo, estes cães foram divididos em grupos de machos e fêmeas, porém, as fêmeas prenhas foram excluídas do grupo devido a variações hormonais descritas na literatura. Todos os animais do estudo foram cadastrados numa ficha de identificação, com a idade, sexo, sintomas clínicos e outras observações necessárias (Apêndice G).

Os animais machos e fêmeas, soronegativos para *L. (L.) chagasi*, de área não endêmica, testados através do método de ELISA indireto, foram incluídos no estudo e utilizados como controle negativo no ensaio ELISA.

3.2. Coleta das amostras

Para a coleta das amostras foi realizada a tranquilização prévia, quando necessário utilizando maleato de acepromazina administrado na dose de 0,05 mg/kg, pela via intravenosa, com um intervalo aproximadamente de quinze min. Os animais foram anestesiados com Tiopental na dose de 15 mg/kg, em seguida foi feita a coleta

de sangue intracardíaco e posteriormente, foi realizada a eutanásia com uma ampola de 10ml de Cloreto de Potássio (KCl).

Após eutanásia foram coletados fragmentos de baço e fígado da maneira mais asséptica possível e imediatamente estes órgãos foram estocados em nitrogênio líquido para quantificação das citocinas. Para realização de cultura de células esplênicas o fragmento de baço foi retirado e imediatamente imerso em tampão salina fosfato contendo antibióticos.

3.3. Detecção de anticorpo *L. chagasi* pelo ELISA indireto

A triagem dos animais positivos e negativos foi realizada pelo ensaio sorológico ELISA, usando como antígeno, lisado total de promastigota *Leishmania (L.) chagasi*. Para a preparação do antígeno, os parasitas foram mantidos em cultura à 26°C em Meio-RPMI-1640 como descrito no (Apêndice D) (Sigma, St. Louis U.S.A.). A preparação do antígeno e o procedimento do ensaio ELISA foram realizados como o descrito por LIMA et al. (2003).

A placa de poliestireno foi coberta com 20 µg/ml de antígeno total do parasito *L. (L.) chagasi*, LIMA et al. (2003); RIERA et al. (1999), em 5 ml de tampão carbonato 0,05 M, pH 9,6 (Anexo A). Após incubação a 4°C por toda à noite. A placa foi lavada com PBS - 0,05% Tween 20 e bloqueada por 1 hora à temperatura ambiente, com 150 µl por poço de uma solução de PBS contendo 10% de soro bovino fetal. Após nova lavagem com PBS - 0,05% Tween 20, as amostras de soro, diluídas 1:400 em PBS - 10% de soro fetal bovino e 0,05% Tween 20, foram adicionadas a cada poço e incubadas por 3 horas à temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente com PBS - 0,05% Tween 20, e foi adicionado 100 µl por poço de anticorpo anti-IgG de cão conjugados à peroxidase (Sigma, St. Louis, U.S.A.), na diluição de (1:1000), foi lavada novamente e adicionado 100µl da solução, contendo 0,4mg/ml (OPD) O-phenylenediamine (Sigma, St. Louis, U.S.A.), e H₂O₂ 0,4 µl/ml em 0.1M ácido cítrico, 0.2M fosfato de sódio dibásico. A reação se desenvolveu em cinco minutos e foi bloqueada com 50µl de HCl-16%. A densidade óptica (DO) foi avaliada a 490 nm utilizando o leitor Spectra Count™

(Packard Bio Science Company, U.S.A.). O ponto de corte, foi determinado com o soro de cães saudáveis, de área não endêmica, utilizando como referência à média mais 3 vezes o desvio padrão obtido no grupo VOLLER et al. (1980).

3.4. Western Blotting

Para avaliação da reatividade cruzada entre o anticorpo anti-TGF- β humano, com o TGF- β canino, foi realizada a reação de Western Blotting.

A proteína TGF- β ativa é encontrada constitutivamente presente no soro, assim, o TGF- β , presente no soro humano e canino foi separado por SDS-PAGE 10% e analisado por Western Blotting (Apêndice B).

A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com PBS 0.01M pH 7.2, adicionado 5% de leite desnatado por 2 horas, a temperatura ambiente. Seguiu-se a reação com anticorpo monoclonal TGF- β , (Promega, Madison, WI), diluído em solução bloqueadora (1:1000), 2 horas, a temperatura ambiente. Após cinco lavagens por dez minutos, as membranas foram incubadas com anti-IgG rato policlonal conjugado a biotina (PharMigen, San Diego, CA) diluído (1:500) incubado por 2 horas, a temperatura ambiente. A reação foi amplificada com estreptoavidina-biotina peroxidase (DAKO Corporation, A/S, Denmark), (1:150) por 45 minutos. Após cinco lavagens com PBS, as fitas foram reveladas em PBS 0.01M pH 7.2, contendo 1 mg /ml Diaminobenedina e 20 μ l H₂O₂.

3.5. Cultura de células do baço

Para a cultura de células esplênicas, o fragmento do baço foi mantido em solução PBS-estéril com antibióticos para o transporte do órgão até o fluxo laminar. Em seguida em condição estéril, as células do baço foram maceradas em RPMI-1640 completo e centrifugadas 4°C por 10 minutos, as soluções utilizadas estão no (Apêndice C). O *pellet* foi previamente lisado em tampão de lise e sempre mantido em gelo.

Após lise, as células foram lavadas 3 vezes em PBS estéril, o *pellet* foi ressuspense em 1 ml de RPMI-1640 completo (Gibco, Pisle, UK). As células foram contadas em câmara de Neubauer (Loptik- Labor). Todo procedimento foi realizado em fluxo laminar em condições estéril. Em seguida, 100µl da suspensão celular (5×10^7 / ml) foram dispensados nos poços de placas estéreis de 24 poços (TPT-92024, Switzerland, Europa). Após 24 horas de incubação em estufa umidificada com 5% CO₂ (REVCO, Asheville, U.S.A.), o sobrenadante foi colhido e centrifugado (Eppendorf, Germany) a 10.000g por 10 minutos a 4°C, e imediatamente estocado em - 80°C, para quantificação do TGFβ.

3.6. Quantificação de TGF-β₁

O nível de TGF-β₁ biologicamente ativo foi quantificado por ELISA, através do kit comercial TGF-β₁, (Promega, Madison, WI).

O TGF-β₁, foi avaliado no sobrenadante da cultura de célula do baço, no sobrenadante do extrato do baço e do fígado. O ensaio foi desenvolvido de acordo com as instruções do fabricante. A sensibilidade do ensaio foi de 580 pg/ ml. A cada placa, foi realizada uma curva padrão. As soluções utilizadas no ensaio estão descritas no Apêndice E.

3.7. ELISA de citocinas : IFN-γ e IL-10

Para a dosagem de citocina no contexto “*ex vivo*”, foi utilizado o seguinte procedimento: fragmentos do baço e do fígado foram retirados do nitrogênio líquido, e após descongelados, 0.1 g de tecido foi ressuspense, em 2 ml de RPMI-1640 completo pH 7.2 (Sigma, St. Louis, U.S.A.). O órgão, foi mantido em gelo e triturado em homogeneizador de tecido (Ultraturrax T8, IKA, Germany), na velocidade 6, por aproximadamente 5 minutos. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000g

por 15 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi imediatamente estocado no -80°C (Revco, U.S.A.) para quantificação de IFN- γ , IL-10 e TGF- β_1 , por ELISA.

O protocolo para detecção de citocinas foi o recomendado pelo fabricante dos anticorpos (R&D Systems, Minneapolis, Minn.). Para quantificação do IFN- γ e IL-10, foi usado placa de 96 poços (NUNC-Maxisorb, Copenhagen, Denmark), o anticorpo monoclonal foi utilizado na concentração de 0.5 $\mu\text{g/ml}$, e o anticorpo biotilado na concentração de 0.125 $\mu\text{g/ml}$, as soluções utilizadas encontram-se no (Apêndice F).

A sensibilidade mínima de detecção na dosagem de IFN- γ foi de 9.6 pg/ ml, e para IL-10 a sensibilidade foi de 380 pg/ ml. As citocinas recombinantes: IL-10 e IFN- γ para realização da curva padrão foram adquiridas pelo mesmo fabricante (R&D Systems, Minneapolis, Minn.).

Ambas as placas foram reveladas com TMB -3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (Promega, Madison, U.S.A.) e a reação foi parada com HCl-1N. A densidade óptica foi avaliada a 450 nm, utilizando o leitor Spectra CountTM (Packard Bio Science Company, U.S.A.).

3.8. Análise Estatística

As médias obtidas em cada grupo de cães fêmeas e machos (assintomático), para cada variável (dosagem de IgG anti-*Leishmania*, quantificação de TGF- β no baço, no fígado e na cultura; quantificação de IL-10 no baço e no fígado e quantificação de IFN- γ no baço e no fígado) são advindas da média da tréplica de cada animal componente do mesmo. Essas médias foram submetidas à análise de variância, considerando que o modelo linear geral proposto incluiu o efeito fixo de status, em dois níveis (fêmeas e machos). Para atender as pressuposições básicas para a realização do teste (normalidade dos resíduos e homocedasticidade), valores menores que zero foram desconsiderados (para TGF- β da cultura, IFN- γ no baço e no fígado) e as variáveis TGF- β do baço e do fígado, IL-10 do baço e do fígado e IFN- γ do baço foram

submetidas à transformação logarítmica e INF- γ do fígado em raiz quadrada. O nível de significância utilizado foi de 5%.

As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa computacional SAS (Statistical Analysis System – SAS Institute).

Para a realização dos gráficos foi utilizado o programa Microsoft Excel 2000.

4. RESULTADOS

4.1 Nível de IgG anti-*Leishmania*, em cães assintomáticos naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*

O nível de anticorpos IgG, anti-*Leishmania*, foi avaliada no soro em cães machos e fêmeas, assintomáticos, naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* e em animais não infectados através do ELISA.

Os resultados obtidos no ensaio ELISA, encontram-se na Tabela 1. Em seguida encontra-se a Figura 1, onde está apresentada a média da densidade óptica obtida no ensaio ELISA dos cães machos e fêmeas assintomáticos, naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* e dos controles.

Foi observada similaridade entre as médias obtidas do título de anticorpos IgG anti-*Leishmania*, em ambos os grupos. No grupo das fêmeas assintomáticas o valor médio encontrado foi de (1.172 ± 0.4) , e em machos assintomáticos (1.239 ± 0.5) . Nos grupos estudados, não foi observada diferença estatística nos níveis séricos de anticorpos anti-*Leishmania* (Figura 1). Nos controles negativos o valor médio observado foi de (0.160 ± 0.06) nas fêmeas, e de (0.143 ± 0.04) nos machos.

Tabela1. Média obtida na densidade óptica (DO) foi obtida pelo ensaio imunoenzimático ELISA nos cães machos e fêmeas assintomáticos, naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, e nos controles negativos. Em negrito encontra-se o número de identificação do animal, seguido da sua respectiva D.O.

<u>ASSINTOMÁTICOS</u> <u>FÊMEA</u>		<u>ASSINTOMÁTICOS</u> <u>MACHO</u>		<u>CONTROLE</u> <u>NEGATIVO</u> <u>FÊMEA</u>		<u>CONTROLE</u> <u>NEGATIVO</u> <u>MACHO</u>	
20	0.746	40	0.951	49	0.162	23	0.120
52	1.051	51	1.598	70	0.218	24	0.140
53	1.091	62	1.130	79	0.168	25	0.082
54	0.906	68	1.613	80	0.160	39	0.161
56	1.005	69	1.829	81	0.089	58	0.198
61	0.984	73	2.059	83	0.135	59	0.151
63	1.506	74	0.915	88	0.265	77	0.089
72	1.593	76	0.327	98	0.074	87	0.199
75	1.654	78	0.611				
86	0.886	82	0.782				
90	1.872	84	1.267				
91	1.827	85	1.769				
92	0.642	89	1.720				
94	0.970	93	0.789				
96	0.850	97	0.856				

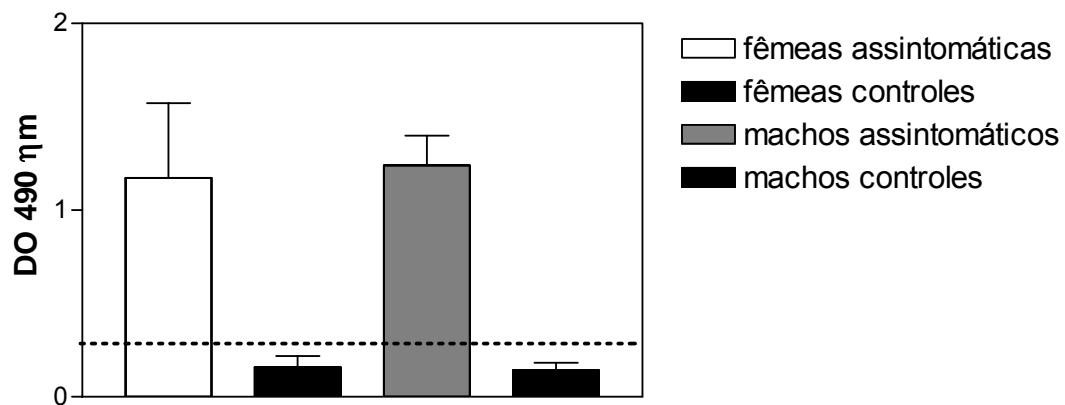


Figura 1. Nível de anticorpo IgG anti-*Leishmania*, nos grupos de cães machos e fêmeas assintomáticos, naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*, contra antígeno total de *Leishmania*. Nos grupos estudados, não foi observada diferença estatística entre o sexo na produção de anticorpos anti-*Leishmania*. Na figura, a linha tracejada indica o ponto de corte utilizado no ensaio, com a D.O. de 0.270 nm.

4.2 Reatividade cruzada no soro do TGF- β canino com o TGF- β humano

Para a realização do estudo, foi utilizado anticorpo TGF- β humano (Kit), devido à ausência de anticorpo canino para este ensaio. O uso deste kit foi validado pela reação de Western Blotting positiva (Figura 2), devido à reatividade cruzada do anticorpo presente no Kit com a proteína TGF- β_1 do soro canino.

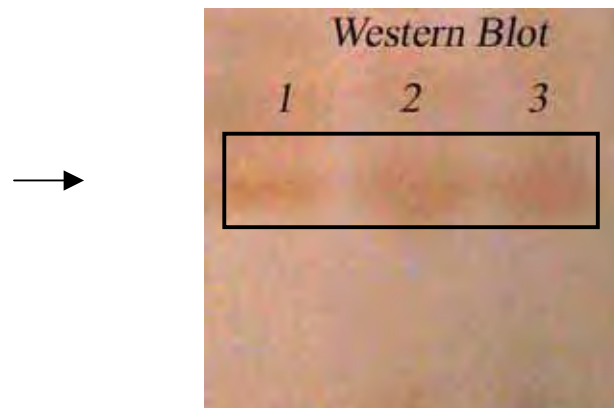


Figura 2. Reação positiva de Western Blotting mostrando a reatividade cruzada dos anticorpos presente no kit humano com a proteína TGF- β humana e canina. No (1) encontra-se a amostra do soro humano; (2) amostra do soro canino fêmea; (3) amostra do soro canino macho.

4.3 Avaliação da produção do TGF- β no sobrenadante do extrato de baço, fígado e sobrenadante de células esplênicas.

Não foi observada diferença significativa entre machos e fêmeas assintomáticos, na produção de TGF- β no sobrenadante de cultura, extrato do baço e do fígado, (Figura 3A, 3B e 3C).

No sobrenadante de cultura “*in vitro*” foram observados valores médios inferiores aos observados “*ex vivo*” (Figura 3A e 3B).

A análise comparativa do fígado e do baço indica que o baço produz mais a citocina TGF- β do que o fígado, (Figura 3B e 3C).

A tabela 3 apresenta as médias de TGF- β produzido no sobrenadante de cultura das células esplênicas e no sobrenadante do extrato do baço e do fígado.

Tabela 2. Nível médio de TGF- β no dos grupos de cães machos e fêmeas, assintomáticos, naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi*, no sobrenadante de cultura de células esplênicas “*in vitro*”, e no sobrenadante do extrato do baço e do fígado em “*ex vivo*”.

	<u>Sobrenadante da cultura de células do baço</u> <u>“<i>in vitro</i>”</u> pg/ml	<u>Sobrenadante do extrato do baço</u> <u>“<i>ex vivo</i>”</u> pg/ml	<u>Sobrenadante do extrato do fígado</u> <u>“<i>ex vivo</i>”</u> pg/ml
Fêmea	6.166,28 \pm	14.737,46 \pm	4.879,63 \pm
Assintomática	3.968,3	5.079,3	2.456,6
Macho	5.334,88 \pm	15.355,32 \pm	5.934,88 \pm
Assintomático	3.434,9	5.052,1	2.566,0

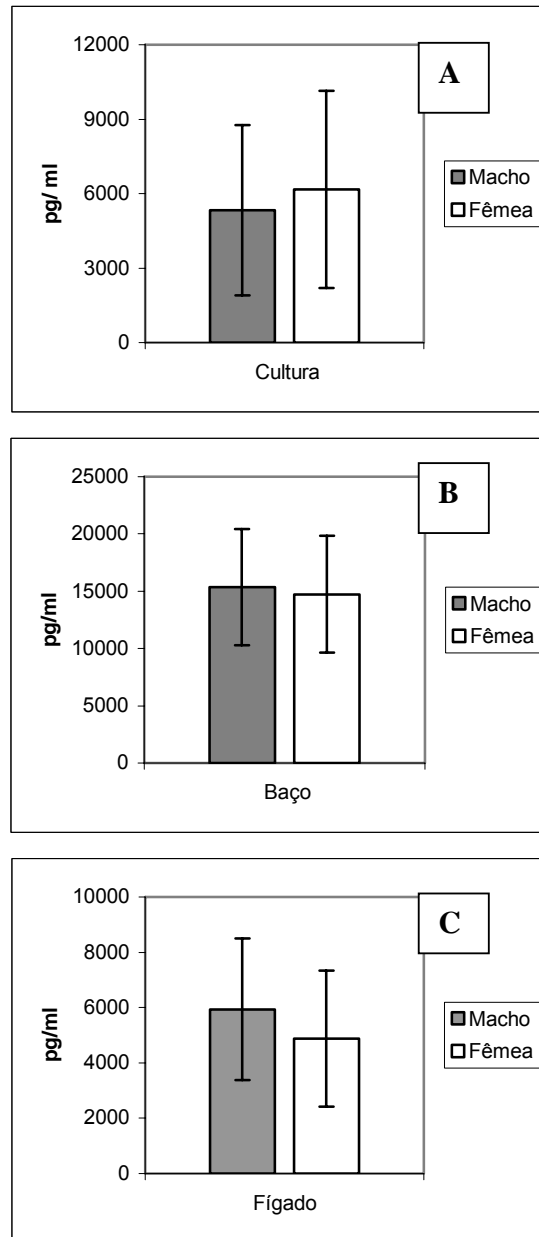


Figura 3. Nível médio de TGF- β nos grupos de cães machos e fêmeas assintomáticos, naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi*, no sobrenadante de cultura de células esplênicas “*in vitro*” (A), sobrenadante do extrato do baço (B) e fígado (C) “*ex vivo*”. Na Figura A, foram utilizados cães machos (n=7) e fêmeas (n=12), nos demais grupos foram utilizados (n=15).

4.4. Avaliação da produção de IL-10 e INF- γ no sobrenadante do extrato do baço e do fígado

Não foi observada diferença significativa entre machos e fêmeas assintomáticos na produção de IL-10 no extrato do baço e do fígado, (Figura 4A e 4B).

No fígado foi observada a dominância da IL-10, quando comparado ao IFN- γ e ao TGF- β , porém, no baço o nível médio de IL-10 foi inferior ao TGF- β .

Na avaliação do INF- γ no extrato do baço foi observada diferença significativa entre machos e fêmeas assintomáticos, o nível médio observado nas fêmeas foi superior a dos machos, (Figura 5A, $P < 0.05$). No fígado não foi observada diferença significativa entre machos e fêmeas, (Figura 5B).

A análise comparativa do baço e do fígado mostrou que o fígado produz quantidades superiores de INF- γ , quando comparado ao baço que apresenta baixas concentrações desta citocina.

O nível médio de INF- γ e IL-10 no extrato do baço e do fígado estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Nível médio de IL-10 e IFN- γ no sobrenadante do extrato do baço e do fígado “*ex vivo*”, nos grupos de cães machos e fêmeas assintomáticos, naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi*.

<u>Assintomático</u>	<u>IL-10</u> (pg / ml)		<u>INF-γ</u> (pg / ml)	
	<u>Baço</u>	<u>Fígado</u>	<u>Baço</u>	<u>Fígado</u>
Fêmea	11.809,0 \pm	55.759,4 \pm	114,4 \pm	11.517,6 \pm
	5.949,5	15.657,8	60.8	13.368,2
Macho	10.782,7 \pm	61.112,7 \pm	52,7 \pm	12.135,4 \pm
	10.482,1	35.040,9	43.2	7.933,0

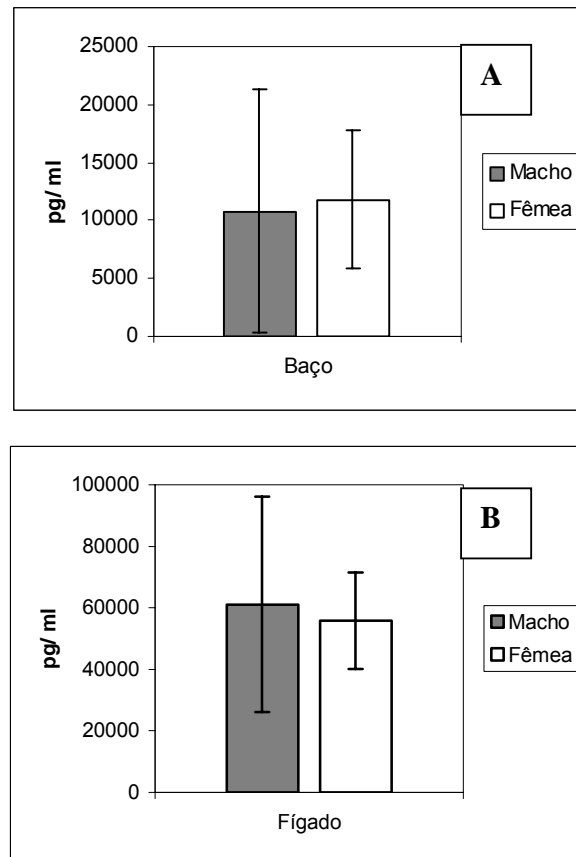


Figura 4. Nível médio de IL-10 nos grupos de cães machos (n=15) e fêmeas (n=15), assintomáticos, naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi*, no sobrenadante do extrato do baço (A) e fígado (B) “*ex vivo*”.

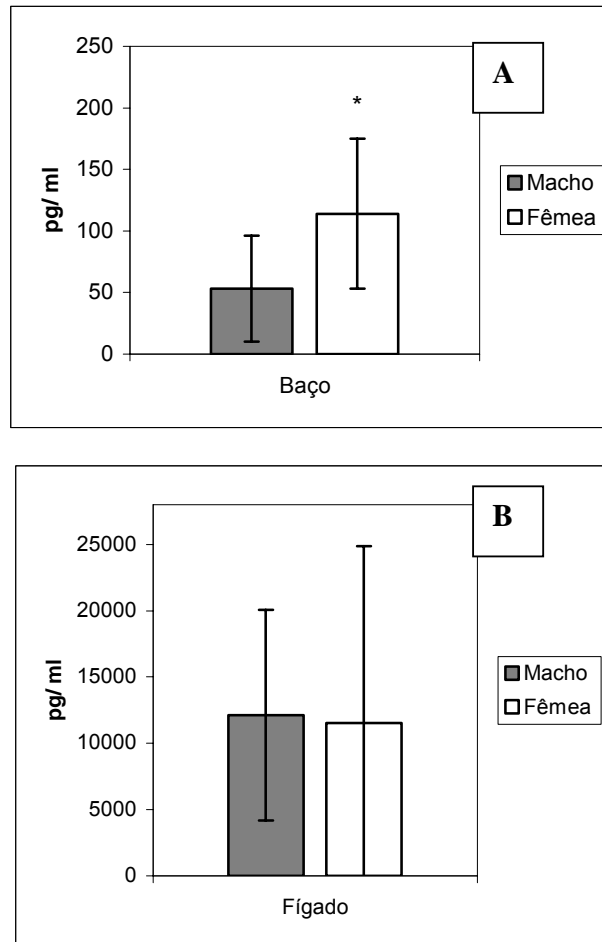


Figura 5. Quantificação do INF- γ , nos grupos de cães machos (n=15) e fêmeas (n=15) assintomáticos, naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*, no sobrenadante do extrato do baço (A) e fígado (B) “ex vivo”. Diferença significativa foi observada entre machos e fêmeas no baço, (Análise de variância, $P < 0.05$).

5. DISCUSSÃO

Estudos avaliando a resposta imunológica em camundongos MUKHERJEE et al. (2003), hamsters RODRIGUES et al. (1998), e humanos BACELLAR et al. (2000), infectados com *Leishmania*, reconhecem que embora parecidos, existem algumas diferenças, consideradas importantes entre a resposta do sistema imune destes modelos. A busca de esclarecimentos no estudo da imunidade na Leishmaniose Visceral nos levou a estudar o modelo canino, o reservatório natural da *Leishmania* e avaliar o seu padrão de resposta imunológica.

O aumento da prevalência de intensidade da infecção causada pela *Leishmania sp* é maior em macho do que em fêmeas, o que sugere diferenças imunológicas associadas ao sexo KLEIN et al. (2004). Na leishmaniose visceral em cães as diferenças imunológicas associadas ao sexo ainda não foram investigadas.

A avaliação do nível sérico de IgG total anti-*Leishmania*, por ELISA, mostrou que os animais machos e fêmeas assintomáticos, apresentaram altos títulos de anticorpos IgG contra antígenos totais de *Leishmania*. Esses resultados discordam dos observados por RHALEM et al. (1999), os quais estudando cães naturalmente e experimentalmente infectados por *L. (L.) infantum* encontraram baixos títulos de anticorpos contra antígeno total de *Leishmania* em cães assintomáticos.

A ausência de diferença significativa entre o sexo no nível sérico de IgG anti-*Leishmania* (Figura 1, $P > 0.05$), coincide com os resultados de TRAVI et al. (2002), neste estudo hamsters machos e fêmeas, infectados com *Leishmania (Viannia) panamensis* não apresentaram diferenças na produção de imunoglobulinas IgG contra antígeno *Leishmania (V.) panamensis*.

A observação de resultados similares nos níveis de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em machos e fêmeas, pode ser justificado devida à alta heterogeneidade genética e etária do grupo, estudos futuros avaliando um grupo mais homogêneo com fêmeas no mesmo período do ciclo reprodutivo devem ser realizados para confirmar esse resultado.

A ausência de diferença entre machos e fêmeas, na resposta imune humoral nos levou a investigar se algumas das citocinas relacionada ao padrão Ta2, como: o TGF- β e a IL-10 apresentavam-se em diferentes concentrações no baço e no fígado de machos e fêmeas.

Para avaliação de TGF- β_1 foi utilizado kit humano em amostras caninas, foi observada reatividade cruzada do anticorpo TGF- β_1 humano com a proteína TGF- β_1 canina. Essa observação confirma os resultados de VERCELLI et al. (2003), os quais mostraram que o TGF- β humano apresenta reatividade cruzada com a proteína canina. Nossos resultados demonstraram que os cães assintomáticos estão produzindo esta citocina no extrato do baço e do fígado.

Não foi observada diferença significativa nos níveis de TGF- β_1 em relação ao sexo em nenhum dos órgãos avaliados (Figura 3, $P > 0.05$), sua produção foi observada tanto em estudo “*ex vivo*” quanto no estudo “*in vitro*”. No extrato de baço foi observado alto nível do TGF- β , sugerindo que tal citocina pode ter papel regulatório na leishmaniose visceral canina.

De fato, tem sido mostrado que a citocina TGF- β é uma citocina regulatória importante na Leishmaniose Visceral. Estudos em modelos experimentais têm mostrado que a citocina TGF- β está associada com a progressão da doença. Em camundongos Balb/c infectados com *L. chagasi*, a neutralização de TGF- β em cultura de granuloma no fígado restaura em parte a produção de IFN- γ , indicando que o TGF- β está associado com a inibição da produção de IFN- γ , WILSON et al. (1998). Em hamster infectado com *Leishmania donovani*, o TGF- β derivado da cultura de células aderentes do baço, inibi a resposta linfoproliferativa contra antígeno de *Leishmania*, sugerindo que a produção de TGF- β durante a infecção é em parte responsável pela imunossupressão observada por RODRIGUES et al. (1998). Em cães não há relatos sobre o seu papel na leishmaniose visceral.

Embora em infecção experimental de camundongos Balb/c com *L. chagasi*, o TGF- β seja o principal responsável em parte, por inibir a produção de INF- γ por células CD4+ localizadas no fígado WILSON et al. (1998). Estudos em humanos indicam que a

citocina IL-10 é a principal citocina regulatória. Em pacientes tratados para Leishmaniose visceral, a citocina IL-10, inibi a resposta linfoproliferativa de células mononucleares de sangue periférico a antígenos de *L. chagasi* e a produção de IFN- γ , por outro lado as citocinas IL-4 e TGF- β , não reduziram a linfoproliferação ou a produção de IFN- γ nas culturas BACELLAR et al. (2000).

Em cães, o nível de IL-10 observado no baço e no fígado nos machos e fêmeas assintomáticos, não mostrou diferença significativa entre os grupos. A detecção de IL-10 no baço e no fígado de cães assintomáticos com leishmaniose visceral confirma os dados observados por CHAMIZO et al. (2005), que observaram em cães experimentalmente infectados a produção de RNA-m para IL-10 em células mononucleares de sangue periférico estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania*.

Na infecção canina é observada imunossupressão, a evolução da infecção está associada com ausência de resposta linfoproliferativa a antígenos do parasito PINELLI et al. (1994). A produção de TGF- β e IL-10 observada nos animais naturalmente infectados sugerem que tais citocinas possam estar envolvidas em mecanismos regulatórios importantes. Estudos, *in vitro*, devem ser realizados para esclarecer o papel regulatório dessas citocinas na leishmaniose visceral canina.

Não foi observada diferença entre machos e fêmeas na produção de citocinas TGF- β e IL-10 associadas ao desenvolvimento da resposta humoral, por outro lado, foi observado que fêmeas assintomáticas produzem quantidades médias mais elevadas de IFN- γ no baço do que os machos. Tal fato sugere que as fêmeas estejam montando uma resposta imunológica mais adequada para o controle da parasitemia no baço, já que em cães, humanos e em modelo experimental o controle da infecção está associado à produção de IFN- γ , SACKS et al. (1987); MURRAY, (1990); PINELLI et al. (1995).

A observação de que fêmeas estão produzindo mais IFN- γ no baço que os machos, indicam um possível efeito hormonal na produção de citocinas, o efeito dos hormônios na imunidade tem sido revisto por ROBERTS et al. (2001); KLEIN, (2004).

Em modelos experimentais a ação dos hormônios na imunidade também tem sido estudada. Em hamsters infectados com *L. (L.) donovani* os machos possuem mais parasitos do que as fêmeas, sendo que, a administração de estradiol aumenta a resistência à infecção ANURADHA et al. (1990).

TRAVI et al. (2002), observaram em hamsters, machos e fêmeas, infectados com *Leishmania (Viannia) panamensis*, diferenças significativas na produção de citocinas entre os sexos, nos machos foi observado aumento na produção de IL-10, IL-4 e TGF- β , quando comparado com as fêmeas. Nos animais infectados a produção do TGF- β , também foi correlacionada com o tamanho das lesões, e fêmeas tratadas com testosterona desenvolveram lesões maiores quando comparadas com as lesões dos machos.

A observação de maior nível de IFN- γ no baço das fêmeas em comparação aos machos, concorda ao observado por SATOSKAR et al. (1998), que observaram que camundongos fêmeas infectados com *Leishmania mexicana* apresentavam um aumento da resposta Ta1.

A análise quantitativa das citocinas estudadas nos diferentes órgãos avaliados sugere que a citocina IL-10, é a principal citocina regulatória na leishmaniose visceral canina, pois, quantitativamente há uma predominância desta citocina no baço e também no fígado quando comparada a IFN- γ . Ao lado da IL-10, a predominância do TGF- β no baço em relação ao IFN- γ , sugere seu papel regulatório na infecção canina. Em humanos, e em infecção experimental, as citocinas IL-10 e TGF- β , têm sido relatadas como supressoras da resposta imunológica GOTO E LINDOSO, (2004).

Nossos resultados mostram que há uma produção concomitante de citocinas Ta1 e Ta2, porém, há um predomínio da resposta Ta2 devido à alta concentração de IL-10 e TGF- β . Em cães naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi*, as citocinas Ta1 e Ta2, avaliadas por RT-PCR, têm mostrado no aspirado de medula óssea uma produção concomitante de citocinas Ta1 e Ta2, e a predominância de Ta2 pode estar associada com a severidade da doença QUINNELL et al. (2001).

Nossos resultados divergem dos dados encontrados por SANTOS-GOMES et al. (2002), os quais observaram que o estabelecimento da infecção não está correlacionado com a expressão de IL-10, e também não concordam com os estudos em de CHAMIZO et al. (2005), ao quais mostraram que cães experimentalmente infectados embora citocinas Ta1 e Ta2 estejam sendo produzidas, a resposta Ta1 que confere a imunidade contra o parasito é preferencialmente expressada nestes animais CHAMIZO et al. (2005).

É importante ressaltar que nos estudos citados a infecção é experimental, a dose de parasito pode diferir da infecção natural e o papel modulatório da saliva do flebotomíneo não é considerado, tais fatores podem ser importantes na determinação da resposta imunológica subsequente e na evolução da doença, como tem sido mostrado por BOGDAN (1998); RHALEM et al. (1999).

Tem sido relatado que o comportamento da resposta imunológica parece diferir em infecção natural e experimental. A influência da IL-12 exógeno na resposta linfoproliferativa de PBMC, a antígeno solúvel de *Leishmania*, foi observado em cães naturalmente infectados com *L. infantum* com linfoproliferação positiva, mas, não há produção de INF- γ . Por outro lado, em cães experimentalmente infectados foi observado proliferação positiva com produção de INF- γ STRAUSS-AYALI et al. (2005).

Foi observado que o perfil de citocinas difere no baço e no fígado, a citocina IFN- γ , mostrou-se reduzida no baço e no mesmo momento ela encontrou-se aumentada no fígado, e a produção de TGF- β foi maior no baço do que no fígado. Tal resultado deve estar associado às diferenças anatomopatológicas observadas no fígado e no baço de cães assintomáticos. Em cães naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi*, o fígado apresenta imunidade efetiva com granulomas bem organizados, cercando o micro ambiente do parasito, por outro lado, o baço não apresenta tal organização celular SANCHES et al. (2004).

Nossos resultados são similares aos observados por MUKHERJEE et al. (2003). Em camundongos infectados com *Leishmania donovani* com doença avançada, foram observados no baço por RT-PCR baixos níveis de INF- γ associado com altos níveis de

TGF- β , e enquanto no fígado observou-se alto nível de INF- γ MUKHERJEE et al. (2003).

O perfil diferenciado de citocinas no baço e no fígado sugere a produção de citocinas ativadoras e desativadoras, o INF- γ pode estar associado ao controle da infecção no fígado, por outro lado, à progressão da infecção no baço pode estar associada à síntese inadequada de INF- γ e a produção de citocinas desativadoras como o IL-10 e TGF- β .

Em conclusão nossos resultados indicam que em cães assintomáticos naturalmente infectados há uma diferença na produção de citocinas no baço e no fígado, e que alta produção das citocinas IL-10 e TGF- β , quando comparado com a produção do IFN- γ , sugere a predominância da resposta imunológica para o tipo Ta2.

6. CONCLUSÃO

A análise dos resultados obtidos da avaliação da produção de IgG anti-*Leishmania* e das citocinas TGF- β_1 , IL-10 e INF- γ no sobrenadante do extrato do baço e do fígado e no sobrenadante de cultura de células brancas do baço, em cães machos e fêmeas assintomáticos naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, permitiu concluir:

- Animais assintomáticos produzem altos títulos de anticorpos da classe IgG contra antígeno total de *Leishmania*.
- As fêmeas assintomáticas estão montando uma resposta mais adequada para o controle do parasito, pois, produzem maiores níveis de INF- γ no baço.
- As citocinas Ta1 (INF- γ) e Ta2 (TGF- β_1 , IL-10) estão sendo produzidas no baço, no fígado e também no sobrenadante de células esplênicas, portanto, há produção *ex vivo* e *in vitro*. A imunidade adaptativa no fígado difere da resposta observada no baço.
- O baço apresentou maior nível médio de TGF- β_1 *ex vivo*. Enquanto, o fígado apresentou maior nível médio de IL-10 e INF- γ *ex vivo*.
- As citocinas relacionadas aos dois padrões Ta1 e Ta2 estão co-existindo na LVC.
- Cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* tem maior habilidade em produzir resposta imune do tipo Ta2.

7. REFERÊNCIAS *

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. Citocinas. In:____. **Imunologia celular e molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. p. 235-269.

ALENCAR, J. E; NEVES, J.; DIETZE, R. Leishmaniose visceral (Calazar). In: VERONEZI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 706-717.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A .R.; RUSSELL, D.G. *Leishmania* species: models of Intracellular parasitism. **J. Cell. Sci.**, London, v.112, p. 2993-3002, 1999.

ALMEIDA, M.A.O. et al. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v.106, p.151-158, 2005.

ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, London, v.57, p.1-88, 2004.

ANAM, K. et al. Differential decline in *Leishmania* membrane antigen-specific immunoglobulin g (IgG), IgM, IgE, and IgG subclass antibodies in Indian kala-zar patients after chemotherapy. **Infect. Immun.**, Washington, v.67, p.6663-6669, 1999.

ANURADHA, P.R.; KATIYAR, J.C. Sex–influenced population kinetics of *Leishmania donovani* in hamster. **Indian J. Exp .Biol.**, New Delhi, v.28, p.876-879, 1990.

ARMIJOS, R.X. et al. The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in subtropical Ecuador. **Trop. Med. Int. Health**, Oxford, v. 2, p.140-152, 1997.

* Referências de acordo com as normas da ABNT 6023, 2000.

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

BARBOSA, JR. A.A.; ANDRADE Z.A.; REED, S.G. The pathology of experimental visceral leishmaniasis in resistant and susceptible lines of inbred mice. **Braz J Med Res.**, São Paulo, v. 20, p.63–70,1987.

BARRAL, A. et al. Transforming growth factor β as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.90, p.3442-3446, 1993.

BARRAL-NETTO, M. et al. Human_ Leishmaniasis@ cytokines.Bahia.Br. **Braz. J. Med. Biol. Res**, São Paulo, v. 31, p.149-155, 1998.

BARRAL-NETTO, M. et al. Transforming growth factor- β in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science**, Washington, v.257, p.545-548, 1992.

BEBO, B.F. et al. Androgen alter the cytokine profile and reduce encephalitogenicity of myelin- reactive T cells. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 162, p. 35-40, 1999.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **Int. J. Parasitol.**, Oxford, v.28, p.121-134, 1998.

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. **J. Exp. Med.**, New York, v.174, p.1549-1555, 1991.

BOURDOISEAU, G. et al. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Vet. Immunol Immunopathol.**, Amsterdam, v.56, p.345-351, 1997a.

BOURDOISEAU, G. et al. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v.59, p.21-30, 1997b.

BRIGHT, J.J.; SRIRAM, S. TGF- β inhibits IL-12-induced activation of Jak-STAT pathway in T lymphocytes. **J. Immunol.**, Baltimore, v.161, p.1772-1777, 1998.

CARDOSO, L. et al. Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. **Vet.Parasitol.**, Amsterdam, v. 79, p. 213-220, 1998.

CARVALHO, E.M. et al. Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.83, p.860-864, 1989.

CARVALHO, E.M. et al. Restoration of INF- γ production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, Baltimore, v.152, p.5949-5956, 1994.

CASTRO, A.G. Controle diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral. (Calazar) – Normas Técnicas: **Fundação Nacional da Saúde**, Brasília, 1996. 86p.

CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v.103, p.67-75, 2005.

CHER, D.J.; MOSMANN, T.R. Two types of murine helper cell clone. II Delayed-type hypersensitivity is mediated by Th1 clones. **J. Immunol.**, Baltimore, v.138, p.3688-3694, 1987.

COFFMAN, R.L. et al. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. **Immunol. Rev.**, Copenhagen, v.102, p.5-28, 1988.

FEITOSA, M. M. **Leishmaniose visceral: um desafio crescente**. São Paulo: Intervet pet, 2001. 15p.

FEITOSA, M.M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). **Clin. Vet.**, São Paulo, n. 28, p.36-44, 2000.

FERRER, L.M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM. 1999, Barcelona, **Proceedings...**, Barcelona, 1999, p.6-10.

FOX, F. E. et al. Transforming growth factor- b inhibits human T cell proliferation through multiple targets. **Lymphokine Cytokine Res.**, New York, v.11, p. 299-305, 1992.

GALVÃO CASTRO, B. et al. Polyclonal B cell activation, circulation immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v.56, p. 58-66,1984.

GANTT, K. R. et al. Activation of TGF- β by *Leishmania chagasi*: Importance for Parasite Survival in Macrophages. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 170, p. 2613-2620, 2003.

GENARO, O. *Leishmania visceral americana*. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 37-53.

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

GHALIB, H.W. et al. IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. **J. Immunol.**, Baltimore, v.154, p.4623-4629, 1995.

GHALIB, H.W. et al. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.92, p.324-329, 1993.

GHOSH, A.K.; GHOSH, D.K. Infection pattern of leishmaniasis in hamsters produced by recent isolates from kala-azar patients in India. **Indian J. Med. Res.**, New Delhi, 1987, v.86, p.14–19, 1987.

GOMES, N. A. et al. TGF- β mediates CTLA-4 suppression of cellular immunity in murine kalaazar. **J. Immunol.**, Baltimore, v.164, p. 2001-2008, 2000.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A.L. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v.37, p.615-623, 2004.

GROSSMAN, C. J.; ROSELLE G. A.; MENDENHALL. C. L. Sex steroid regulation of autoimmunity. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 40, p.649, 1991.

HERVÁS, J. et al. Pathological study of visceral leishmaniasis in a Jackal. **Vet. Rec.**, London, v. 139, p. 293-295, 1996.

JONES, T.C. et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis*. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.156, p. 73-83, 1987.

KANE, M.M.; MOSSER, D.M. The role of IL-10 in promoting disease progression in Leishmaniasis. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 166, p. 1141-1147, 2001.

KARP, C.L. et al. In vivo cytokine profiles in patients with kala-zar: marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.91, p.1644-1648, 1993.

KEHRL, J.H. et al. Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. **J. Immunol.**, Baltimore, v.12, p.3855-3860, 1986.

KEMP, K. et al. Leishmania-specific T cells expressing interferon-gamma (IFN-gamma) and IL-10 upon activation are expanded in individuals cured of visceral leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v.116, p.500-504, 1999.

KENNEY, R.T. et al. Splenic cytokine responses in Indian kala-azar before and after treatment. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.177, p. 815-818, 1998.

KLEIN, S. L. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. **Parasite Immunol.**, Oxford, v.26, p. 247-264,2004.

LIMA, V.M.F. et al. Anti-*leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v.36, p.485-489, 2003.

LOPEZ, R. et al. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. **Zentralbl. Veterinarmed B**, Berlin, v. 43, p. 469-74, 1996.

MACHADO, P.R.L. et al. Immune response mechanisms to infections. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v.79, p.647-664, 2004.

MARTINEZ MORENO, A.; MARTINEZ CRUZ, M.S.; BLANCO, A., Immunological and histological study of T and B lymphocyte activity in canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 51, p.49-59, 1993.

MELBY, P.C. et al. *Leishmania donovani*: Evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. **Exp. Parasitol.**, New York, v.99, p.17-25, 2001.

MILES, M.A.; VEXENAT, J.A.; CAMPOS, J.H.F.; CASTRO, J.A.F. Canine leishmaniasis in Latin América: control strategies for visceral leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona, p. 46-53, 1999.

MIRACELLY, K. Experiência pode mudar quadro da doença no país. **Folha da Região**, Araçatuba, 26 jan. 2003. caderno B, p. 4.

MOCK, B.A., NACY, C.A. Hormonal modulation of sex differences in resistance to *Leishmania major* systemic infections. **Infect. Immun.**, Washington, v. 56, p. 3316-3319, 1988.

MOSMANN, T.R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles the lymphokines activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, Baltimore, v.136, p.2348-2357, 1986.

MUKHERJEE, P.; GHOSH, A.K.; GHOSE, A.C. Infection pattern and immune response in the spleen and liver of BALB/c mice intracardially infected with *Leishmania donovani* amastigotes. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 86, p.131-138, 2003.

MUNGER, J.S. et al. Latent transforming growth factor β : structural features and mechanisms of activation. **Kidney Int.**, New York, v. 51, p.1376-1383, 1997.

MURRAY, H.W. Effect of continuous administration of interferon- γ in experimental visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 161, p. 992-994, 1990.

MURRAY, H.W. et al. Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. Differential T cell and lymphokine roles in initial versus established immunity. **J. Immunol.**, Baltimore, v.148, p.1858-1863, 1992.

MURRAY, H.W. et al. Antimicrobial response of a T cell deficient host to cytokine therapy: effect of interferon- γ in experimental visceral leishmaniasis in nude mice. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.171, p.1309-1316, 1995.

MURRAY, H.W.; RUBIN, B.Y.; ROTHERMEL, C.D. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. **J.Clin.Invest.**, New Haven, v.72, p.1506-1510, 1983.

MURRAY, H.W.; SPITALNY.G.L.; NATHAN, C.F. Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gama. **J. Immunol.**, Baltimore, v.34, p. 1619-1622, 1985.

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

OLSEN, N.L.; KOVACS, W.J. Gonadal steroids and immunity. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v. 17, 369, 1996.

OMER, F.M.; KURTZHALS, J.A. L.; RILEY, E.M. Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF- β ? **Parasitol. Today**, Amsterdam, v.16, p.18-22, 2000.

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun.**, Washington, v.62, p.229-235, 1994.

PINELLI, E. et al. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in major histocompatibility complex-restricted manner. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, v.25, p.1594-1600, 1995.

PINELLI, E. et al. Measurement of dog cytokines by reverse transcription-quantitative competitive polymerase chain reaction. **Immunogenetics**, New York, v. 49, p. 696-699, 1999.

PINELLI, E.; RUTTEN, V.P.M.G.; RUITENBERG, E.J. Cellular immune responses in canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona, 1999a. p.60-4.

QUINNELL, R.J. et al. IgG subclass responses in longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v.91, p.161-168, 2003.

QUINNELL, R.J. et al. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.183, p.1421-1424, 2001.

REY, J.A. et al. Infectivity of the subspecies of the *Leishmania braziliensis* complex in vivo and in vitro. **Am. J. Trop. Med. and Hyg.**, Baltimore, v.43, p.623-31, 1991.

RHALLEN, A. et al. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 81, p. 173-184, 1999.

RIBEIRO, V.M. Leishmanioses. **Revista do conselho Federal de medicina veterinária**, n.11, p.13-4, 1997.

RIERA, C.; VALLADARES, J.E.; GÁLLEGO, M. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 84, p.33-47, 1999.

ROBERTS, C.W.; WALKER, W.; ALEXANDER, J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 14, p. 476-488, 2001.

RODRIGUES JR, V.; SILVA, J.S.; CAMPOS-NETO, A. Transforming growth factor β and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Infect. Immun.**, Washington, v.66, p.1233-1236, 1998.

SACKS, D.L. et al. An analysis of T cell responsiveness in Indian Kala-azar. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 138, p. 908 – 913, 1987.

SANCHEZ, M.A. et al. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Hyg.**, Baltimore, v.70, p.618-624, 2004.

SANTA ROSA, I.C.A.; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose Visceral: Breve Revisão sobre uma Zoonose Reemergente. **Clin. Vet.**, São Paulo, v.11, p.24-28, 1997.

SANTOS-GOMES, G.M. et al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v.88, p.21-30, 2002.

SATOSKAR, A.; AL-QUASSI, H.H.; ALEXANDER, J. Sex-determined resistance against *Leishmania mexicana* is associated with the preferential induction of a Th1-like response and INF-gamma production by female but not DBA/2 mice. **Immunol Cell Biol.**, Austrália, v.76, p. 159-166, 1998.

SCHIMITT, E. et al. T helper type 1 development of naive CD4⁺ T cells requires the coordinate action of interleukin-12 and IFN- γ and is inhibited by TGF- β . **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, v. 24, p. 793-798, 1994.

SHIDDO, S.A. et al. Visceral leishmaniasis in Somalia: prevalence of markers of infection and disease manifestation in a village in an endemic area . **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 89, p. 361-365, 1995.

SLAPPENDEL, R. J. Canine leishmaniasis: a review based on 95 cases in the Netherlands. **Vet. Q.**, Boston, v. 10, p. 1-16, 1988

STRAUSS-AYALI, D. et al. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. **Intern. J. Parasitol.**, Oxford, v.35, p.63-73, 2005.

TRAVI, B.L. et al. Gender is major determinant of clinical evolution and immune response in hamster infected with *Leishmania spp.* **Infect. Immun.**, Washington, v. 70, p. 2288-2296, 2002.

VERCELLI, A. et al. Expression of transforming growth factor β isoforms in the skin, kidney, pancreas and bladder in german shepherd dog affected by renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis. **J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.**, Berlin, v.50, p.506-510, 2003.

VODOVOTZ, Y. et al. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor- β . **J. Exp. Med.**, New York, v. 178, p. 605, 1993.

VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; BARTLETT, A. Enzyme-linked immunosorbent assay. In: ROSE, N., FRIEDMAN, H. (Ed), **Manual of clinical immunology**. Washington: American Society for Microbiology, 1980. 359-371.

WAHL, S.M. Transforming growth factor beta: The good, the bad, and the ugly. **J. Exp. Med.**, New York, v.180, p.1587-1590, 1994.

WALKER, P.S. et al. Immunoestimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12 and IFN- γ dependent mechanisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 96, p.6970-6975, 1999.

WILCOXEN, S.C. et al. Gender-dependent IL-12 secretion by APC is regulated by IL-10. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 164, p. 6237 -6243, 2000.

WILSON, M.E. et al. The importance of transforming growth factor β in murine visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, Baltimore, v.161, p.6148 –6155, 1998.

WILSON, M.E. et al. The TGF- β response to *Leishmania chagasi* in the absence of IL-12. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, v. 32, p. 3556- 3565, 2002.

APÊNDICE

Apêndice A – Fórmulas e preparos das soluções utilizadas nas reações do ensaio imunoenzimático do ELISA:

- Tampão Carbonato:

0,29% de NaHCO₃,

0,15% de Na₂CO₃ em H₂O . Ajustar o pH 9,6 com ácido cítrico;

- Solução de PBS :

0,8 % de NaCl,

0,11% de Na₂HPO₄,

0,02% de KH₂PO₄,

0,02% de KCl em H₂O. Ajustar o pH 7.0;

- Solução de PBS-Tween :

0.05% de Tween-20 em PBS;

- Tampão Bloqueio :

1% (m/v) de BSA em PBS; ou

10% SBF em PBS;

- Tampão Bloqueio-Tween:

0.05% de Tween-20 em tampão bloqueio;

- Diluyente do OPD:

Ácido Cítrico (Solução a 0.1 M 1,92g para 100ml) 6, 075 ml;

Fosfato de Sódio dibásico (Solução a 0.2M 2,84g para 100ml) 6,425;

12,5 ml de água bidestilada + água oxigenada (20V) 37,5µl + 10mg.

Apêndice B – Fórmulas e preparos das soluções utilizadas na reação do Wersten Blot.1. Preparação de reagente para eletroforese:1.1 Tampão Tris HCl (pH 6.8):

12,11 g de Tris base;
100 ml de água destilada qsp.

Dissolver o Tris e ajustar o pH para 6.8 e completar o volume. Estocar em frasco escuro a 4 ° C.

1.2 Tampão Tris HCl (pH 8.8):

18.15 g de Tris base;
100 ml de água destilada qsp.

Dissolver o Tris em banho de 56 °C se necessário ajustar o pH para 8.8 e completar o volume. Estocar em frasco escuro a 4 ° C.

1.3 Tampão de Amostra:

0.6 ml de Tris HCl 1 M pH 6.8;
5.0 ml de glicerina;
2.0 ml de SDS 10 %;
2.0 ml de Azul de bromofenol 0.5 %;
0.5 ml de Mercaptoetanol.
Estocar a -20 °C.

1.4 Sodium-dodecil-sulfato (SDS) 10%:

10 g SDS;
100 ml de água deionizada.

1.5 Persulfato de Amônio (APS)10%:

0.05 g APS;
500 µl de água deionizada.

1.6 Solução corante do gel:

1.25g Comassie brilhante blue;
37.5 ml Ácido acético;
250 ml Metanol;
qsp 500ml de água deionizada.

1.7 Solução descorante:

75 ml de Ácido acético;
250 ml de Metanol;
qsp 1000ml de água deionizada.

1.8 Acrilamida:

29.2 g de acrilamida;
0.8 de metileno bis acrilamida;
qsp 100 ml de água deionizada.

1.9 Solução reveladora - Substrato DAB:

15mg de DAB;
15 ml de PBS pH 7.4;
20 μ l de peróxido de hidrogênio.
Fazer a quantidade necessária para o uso.

1.10 Solução bloqueio:

5 % de leite desnatado;
em PBS 0.01M pH 7.2.

1.11 Solução corante Ponceau:

1g Ponceau S;
10 % ácido acético, qsp.

2. Gel de corrida (10%):

3.3 ml de Água deionizada;
2.8 ml de Acrilamida;
2.1 ml de Tris pH 8.8;
83.3 μ l de SDS 10 %;
86 μ l de APS 10%;
6 μ l de TEMED.

Colocar o gel de corrida e em seguida completar com 2 ml de água destilada. Esperar o gel polimerizar (30 min.), retirar a água e colocar o gel de empilhamento.

3. Gel de empilhamento (5%):

1.4 ml de Água deionizada;
325 μ l de Acrilamida;
250 μ l de Tris pH 6.8;

20 µl de SDS 10 %;
25 µl de APS 10%;
3 µl de TEMED.

Para montagem do gel, é necessário verificar se há vazamento na cuba. A corrida foi realizada com 80 volts.

Após a realização da corrida o gel foi retirado cuidadosamente da cuba e foi marcado o lado das amostras.

Em seguida o gel foi colocado na solução Tampão de Transferência e montado na placa de transferência.

4. Montagem da placa de transferência:

Foram utilizadas seis folhas de papel filtro e uma membrana de nitrocelulose do mesmo tamanho do gel, estas foram colocadas em imersão no tampão de transferência por 3 min. Em seguida foi montada as três folhas de papel filtro, a membrana de nitrocelulose (lado brilhante para cima), o gel e as três folhas de papel filtro restantes para a transferência das proteínas. Foi retirado as bolhas e o Transblot[®] (Semy- Dry/ Bio –Rad) foi ligado em 15 volts durante 1 h.

Após a corrida o gel foi retirado do Trans - Blot[®], e corado na solução Comassie Blue (por 1 h), e a membrana de Nitrocelulose foi corada com solução Ponceau (0.5 %, por 1h). Foi marcado com um alfinete o lado das bandas. Quando necessário foi feito o bloqueio em leite desnatado por 2 h e a membrana foi estocada entre papéis filtro úmidos em PBS e acondicionada em saco plástico a -20°C.

5. Reação do soro com o anticorpo:

As tiras foram cotadas e lavadas por 15 min. com PBS 0.01 M pH 7.2. Após o bloqueio por 2 h, a temperatura ambiente, foi incubada o Anticorpo por 2h a temperatura ambiente, diluídos em solução bloqueadora.

Após este processo, a membrana foi lavada 5 vezes por 10 min. para a retirada do excesso de anticorpo.

Em seguida, foi realizada a reação com anticorpo marcado com peroxidase, diluído em solução bloqueadora a temperatura ambiente, e incubado por 2 h.

A membrana foi novamente lavada 5 vezes por 10 min. para a retirada do excesso de anticorpo conjugado.

As tiras da membrana foram reveladas com substrato cromógeno DAB (Diaminobenzedina).

Apêndice C – Fórmulas e preparos das soluções utilizadas na Cultura de Células do Baço.

Para a preparação do meio de RPMI para cultura de células esplênicas, foi utilizado:

Meio RPMI celular:

10,39g RPMI,

2g de bicarbonato de sódio,

2,38g de HEPES, para 1 litro de H₂O Milliq.

Após a mistura tornar-se homogênea sob agitação dos componentes com barra magnética, foi acrescentado 10% SBF, antibióticos – Penicilina/ Streptomicina. Após correção do pH para 7,2, a fase líquida foi filtrada em membrana de 0,22 µm, vedada com Parafilm (SIGMA) e conservada em geladeira a 4°C de maneira estéril.

Para o transporte do baço até o momento da cultura, foi utilizado PBS-estéril, juntamente com antibióticos para evitar algumas contaminações;

Solução de PBS- estéril com antibióticos:

0,8 % de NaCl,

0,11% de Na₂HPO₄,

0,02% de KH₂PO₄,

0,02% de KCl em H₂O, pH 7.0;

10 ml de Penicilina/ Streptomicina,

2.5 mg / l de anfotericina.

Após processo de esterilização em autoclave a solução foi filtrada em membrana de 0,22 µm, vedada com Parafilm (SIGMA) e conservada em geladeira a 4°C de maneira estéril.

Tampão de lise:

0.16M de cloreto de amônio (NH_4Cl) /solução A;

0.17M tris, ajustar o pH 7.65 com HCl –1N /solução B;

Após homogeneizar as duas soluções, juntar 450 ml da solução A mais, 50 ml da solução B. Filtrar em Millipore e estocar em frascos vedados com parafilm a 4 °C.

Apêndice D – Fórmulas e preparos das soluções utilizadas nas culturas do parasito.

Para a preparação do meio de RPMI para cultura de *Leishmania*, foi utilizado:

Meio RPMI- Leishmania:

10,39g RPMI,

2g de bicarbonato de sódio,

2,38g de HEPES, para 1 l de H₂O MilliQ.

Após a mistura tornar-se homogênea sob agitação dos componentes com barra magnética, foi acrescentado 10% SBF, antibióticos – Penicilina/ Streptomicina e 2% de urina masculina de maneira estéril. Após correção do pH para 7,2, a fase líquida foi filtrada em membrana de 0,22 µm e conservada em geladeira a 4°C de maneira estéril.

Apêndice E – Fórmulas e preparos das soluções utilizadas nas reações do ensaio imunoenzimático do ELISA - sanduíche para a citocina TGF- β ;

Solução tampão carbonato:

0.025M bicarbonato de sódio;

0.025M carbonato de sódio;

Ajustar o pH para 9.7.

Solução para Lavagem:

20mM de Tris – HCl (pH 7.6);

150mM de NaCl;

0.05% (v/v) Tween –20

Apêndice F – Fórmulas e preparos das soluções utilizadas nas reações do ensaio imunoenzimático do ELISA - sanduíche para IL-10 e INF-gama.

Tampão de Lavagem:

PBS pH 7.4;
0.05% Tween -20;

Tampão Bloqueio:

PBS pH 7.4;
1% BSA;
5% Sucrose;
0.05% NaN₃ (azida sódica).

Tampão de diluição:

PBS pH 7.4;
1 % de BSA.

Solução Substrato:

Mix de reagente A + B (1:1);

Estrepto -avidina Biotina:

Preparar 1:500 em tampão diluição, 30 min. antes do uso e proteger da luz.

Apêndice G – Ficha de identificação dos animais utilizados na pesquisa.

DATA: __/__/__

NÚMERO: _____

IDENTIFICAÇÃO: _____.

() assintomático () sintomático

Sexo: () macho () fêmea

Idade: _____

Sintomas comuns (SC):

- () hepatomegalia;
- () esplenomegalia;
- () onocogribose;
- () linfadenomegalia;
- () dermatite;
- () diarreia;
- () ulcerações;
- () febre _____;
- () emagrecimento;
- () prostração;
- () alopecia;
- () nódulos subcutâneos;
- () conjuntivites;
- () sinais neurológicos;
- () hemorragias.

Observações: _____

_____.

Resultado do exame sorológico: () positivo () negativo

D.O.: _____.