

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

**NÍVEIS DE TNF-ALFA, IL-4 E IL-10 NO BAÇO E FÍGADO  
DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR  
*Leishmania (Leishmania) chagasi***

**Aparecida de Fátima Michelin**

Farmacêutico Bioquímico

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
2009

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

**NÍVEIS DE TNF-ALFA, IL-4 E IL-10 NO BAÇO E FÍGADO  
DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR  
*Leishmania (Leishmania) chagasi***

**Aparecida de Fátima Michelin**

**Orientadora: Profa. Dra. Valéria Marçal Felix de Lima**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Outubro de 2009

## FICHA CATALOGRÁFICA

M623n Michelin, Aparecida de Fátima  
Níveis de TNF-alfa, IL-4 e IL-10 no baço e no fígado de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* / Aparecida de Fátima Michelin. -- Jaboticabal, 2009  
xxii, 90 f. ; il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009  
Orientadora: Valéria Marçal Felix de Lima  
Banca examinadora: Rosimeire de Oliveira Vasconcelos, Hélio José Montassier, Hiro Goto, Iracilda Zeppone Carlos  
Bibliografia

1. Cães. 2. Citocinas. 3. Leishmaniose. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.993.161:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

## **Certificado de Aprovação**

## DADOS CURRICULARES

**APARECIDA DE FÁTIMA MICHELIN** – natural de Birigui, estado de São Paulo. Graduada em Farmácia-Bioquímica, modalidade Análises Clínicas, no ano de 1982, pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). No ano de 1991 participou do curso de Especialização em “Farmácia Hospitalar para o Controle da Infecção Hospitalar”, realizado pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em Natal/RN. Em 1994, concluiu o curso de Especialização em Saúde Pública ministrado pela Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), na cidade de Araçatuba/SP. Em 2002, obteve o título de Mestre pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, no programa de Análises Clínicas, área de concentração em Imunologia Clínica, com a pesquisa intitulada “Citocinas e Óxido Nítrico Induzidos por Enterotoxina Estafilocócica A”. Trabalhou como Farmacêutica-bioquímica no Laboratório São Paulo de Análises Clínicas, em Araçatuba/SP, no período de 1982 a 1984; no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Municipal da Prefeitura de São Paulo, no ano de 1985 até meados de 1986. Neste ano, ingressou como Farmacêutica, através de concurso público, na Secretária Estadual de Saúde do estado de São Paulo, atuando na Farmácia do Ambulatório Regional de Saúde Mental de Araçatuba/SP (1986 e 1987); no então Escritório Regional de Saúde (1988 a 1990) e no Instituto Adolfo Lutz, Laboratório de Araçatuba/SP, de 1991 até a presente data. Também trabalhou na Farmácia Hospitalar da Santa Casa de Misericórdia de Birigui/SP, no período de 1991 a 2006. No ano de 1997, estagiou durante três meses no “Hospital General de Alicante”, na Espanha. Atualmente trabalha como Farmacêutica na área de saúde pública, no Instituto Adolfo Lutz e é docente na Universidade Paulista (UNIP), campus de Araçatuba/SP, onde ministra aulas de Microbiologia. Em 2006 ingressou como aluna regular no Curso de Doutorado do Programa de Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de

Jaboticabal/SP. Tem artigos científicos publicados sobre temas voltados para a Farmácia Hospitalar, Saúde Pública e Saúde Animal, Microbiologia e Imunologia. Participou de vários cursos de extensão nas áreas de sua atuação e de eventos científicos como congressos, seminários e simpósios, de âmbito nacional e internacional, onde apresentou trabalhos.

## EPÍGRAFE

***“Que eu não perca a vontade de ser grande, mesmo sabendo que o mundo é pequeno...***

***E acima de tudo, que eu jamais me esqueça que Deus me ama infinitamente!***

***Que um pequeno grão de alegria e esperança dentro de cada um é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois...***

***A VIDA É CONSTRUÍDA NOS SONHOS E CONCRETIZADA NO AMOR.”***

***Francisco Cândido Xavier***

## DEDICATÓRIA

A Deus, Pai onipotente, minha homenagem primeira por tudo que me lega ao longo da vida.

Aos meus queridos pais, Regina (*in memorian – Agosto de 2009*) e Guilherme, que me acolheram num ninho de amor, onde a honra, a verdade, a honestidade e os bons exemplos nunca deixaram de florescer.

### ***Querida Mamã,***

*Que a estrada se abra à sua frente,  
Que o vento sopra levemente às suas costas,  
Que o sol brilhe morno e suave em sua face,  
Que a chuva caia mansinho  
Em seus campos. . .  
E, até que nos encontremos  
De novo, que Deus te guarde na palma de Suas Mãos*



Aos meus irmãos **Dílson Michelin, Dércio Michelin, Luiz Antonio Michelin e Maria Dirce Michelin Fabrice**, suas esposas e esposo, que juntos construímos uma “grande família”.

Aos meus queridos **sobrinhos e sobrinhas**, um pouco meus filhos, que sempre compreenderam minha forma de amar; e a **Luísa**, sobrinha-neta, pela alegria que nos brinda.

Aos meus filhos **Laura Emília Michelin Gobbo e Lucas Augusto Michelin Gobbo**, expressão maior da minha existência.

Ao meu marido **Ismael Gobbo**, um grande homem.

A **Auzilia Chessa Gobbo e Pedro Gobbo** (*in memorian*); **Sonia Regina Gobi e Neusa Maria Gobi**, que me receberam na família com amor e carinho.

A **Cynira de Barros Macedo Carmini**, que nunca faltou com seu apoio moral e espiritual.

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

**À Profa. Dra. Valéria Marçal Felix de Lima**, a orientadora deste trabalho, pelos valiosos ensinamentos, pela dedicação e especialmente pelo seu otimismo.

*“Obrigada por ter acreditado em mim e no meu trabalho e principalmente pela contribuição ao meu crescimento profissional. Levarei sempre comigo seu exemplo de determinação e profissionalismo. Carinhosamente, muito obrigada”.*

## AGRADECIMENTOS

A **Maria Dirce Michelin Fabrice**, minha querida irmã, companheira de todas as horas, inclusive da primeira de tantas viagens que fiz para Jaboticabal.

A **Aline Michelin Riqueti**, pelo esmero e dedicação dispensados na formatação deste trabalho.

A **Cibele Michelin Fabrice**, estagiária do Laboratório de Imunologia, que me auxiliou com competência na realização de várias atividades analíticas.

A **Daniele Carvalho Michelin**, que sempre me transmitiu bons ânimos nesta empreitada e também me emprestou apoio técnico.

A **Heloize Michelin**, que me auxiliou na digitação do Projeto de Pesquisa e que me fez companhia na viagem para a primeira aula em Jaboticabal.

A **Larissa Michelin Fabrice**, pelas companhias nas tardes de trabalho.

A **Marina Michelin Fabrice**, pela companhia e cuidados dispensados à Laura e ao Lucas nas minhas ausências.

A querida amiga e “irmã” **Neuza Alves Bonifácio**, pela sua amizade incondicional.

A amiga **Maderlene de Almeida Yamada**, nossa querida **Preta**, pelo encorajamento e orações.

Ao **Ricardo Burato Dias**, pela sua amizade em todas as frentes.

Aos meus colegas de trabalho do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório de Araçatuba, em especial ao **Eduardo, Eluíza, Ivone, Joana, Marli, Neide, Neuza, Regina e Teresa** que comigo compartilharam as angústias e os sucessos dessa jornada.

Ao **Edson Luiz Vieira**, pela valiosa contribuição nas “tarefas” de Informática.

À **Luciana Reichert da Silva Assunção**, pela sua confiança, amizade e auxílio na obtenção das amostras.

À estagiária **Simone Oshiro**, pela valiosa colaboração na preparação das amostras e pela amizade.

Ao técnico de laboratório **Almir S. Lemos**, pelo suporte dispensado para a realização das atividades laboratoriais.

Ao Sr. **Odair Vicente**, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pela colaboração na obtenção das amostras biológicas.

A **Edna Maria Testa Dáquila**, secretária do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV), pelo carinho com que nos atendem.

A Profa. **Dra. Elisa Helena Giglio Ponsani**, pela amizade e por ter me indicado o caminho que me levou ao encontro da Dra. Valéria Marçal Félix de Lima.

A Profa. **Dra. Silvia Helena Venturolli Perri**, pelas análises estatísticas.

A Bibliotecária **Isabel Pereira Matos**, pela atenção dispensada durante a realização das pesquisas bibliográficas.

Aos professores que compuseram a banca examinadora na defesa desta tese: **Dr. Hélio José Montassier, Dra. Hiro Goto, Dra. Iracilda Zeppone Carlos e Dra. Rosimeire de Oliveira Vasconcelos** pelas sugestões que foram de grande valia para o enriquecimento deste trabalho.

Às **funcionárias da Seção de Pós-Graduação**, pela dedicação e profissionalismo.

Ao **Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba (CCZA)**, pela permissão na da coleta de amostras.

Ao **Instituto Adolfo Lutz de Araçatuba**, pela contribuição emprestada para a realização desta jornada.

A **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal e Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Curso de Medicina Veterinária**, ambas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xvii
RESUMO.....	xix
SUMMARY.....	xxi
I INTRODUÇÃO.....	1
II REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Leishmaniose visceral.....	3
2.2 Resposta imune do hospedeiro na leishmaniose visceral (LV).....	7
2.3 Fator de necrose tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) e leishmaniose visceral (LV).....	12
2.4 Interleucina-4 (IL-4) e leishmaniose visceral (LV).....	14
2.5 Interleucina-10 (IL-10) e leishmaniose visceral (LV).....	16
2.6 A avaliação da presença do parasita na leishmaniose visceral (LV) e o cão como modelo animal para o estudo da leishmaniose visceral (LV).....	18
III OBJETIVOS.....	23
IV MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 Área de estudo.....	24
4.2 Animais.....	24
4.3 Colheita das Amostras.....	25
4.4 Extrato de baço e fígado.....	25
4.5 Quantificação de TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10.....	26
4.6 Densidade parasitária.....	26
4.7 Análise estatística.....	28
V RESULTADOS.....	29
5.1 Quantificação de Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ).....	29
5.2 Quantificação de Interleucina-4 (IL-4).....	30
5.3 Quantificação de Interleucina-10 (IL-10).....	31
5.4 Determinação da densidade parasitária.....	32
5.5 Níveis de citocinas e densidade parasitária.....	33

5.6	Correlação entre os níveis das citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10) e densidade parasitária através da determinação do coeficiente de correlação linear de Pearson.....	35
5.7	Análise da densidade parasitária do baço e do fígado de cães assintomáticos através da determinação do coeficiente de correlação linear de Pearson.....	36
5.8	Análise da densidade parasitária do baço e do fígado de cães sintomáticos através da determinação do coeficiente de correlação linear de Pearson.....	37
VI	DISCUSSÃO.....	38
VII	CONCLUSÕES.....	44
VIII	REFERÊNCIAS.....	45



## LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Quantificação de TNF- $\alpha$ , através de ELISA de captura, em extrato de baço e fígado de cães assintomáticos (n=20) e sintomáticos (n=20), naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i> , e de cães saudáveis (n=12).....	29
Figura 2	Quantificação de IL-4, através de ELISA de captura, em extrato de baço e fígado de cães assintomáticos (n=20) e sintomáticos (n=20), naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i> , e de cães saudáveis (n=12).....	30
Figura 3	Quantificação de IL-10, através de ELISA de captura, em extrato de baço e fígado de cães assintomáticos (n=20) e sintomáticos (n=20), naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i> , e de cães saudáveis (n=12).....	31
Figura 4	Determinação da densidade parasitária, através de PCR em tempo real, em fragmento de baço e fígado de cães assintomáticos (n=20) e sintomáticos (n=20), naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i> .....	32
Figura 5	Correlação entre densidade parasitária em DNA extraído de fragmento do baço e do fígado de cães assintomáticos, naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i> . Forte correlação linear positiva (r=0,93) e significativa entre baço e fígado (p<0,05).....	36
Figura 6	Correlação entre densidade parasitária em DNA extraído de fragmento do baço e do fígado de cães sintomáticos (n=20), naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i> . Forte correlação linear positiva (r=0,95) e significativa entre baço e fígado(p<0,05) .....	37

**LISTA DE TABELAS**

	Página
Tabela 1	
Quantificação de TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10 em extrato de baço e fígado e densidade parasitária em DNA extraído desses órgãos de cães assintomáticos (n=20) e sintomáticos (n=20), naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i> e de cães saudáveis.....	34
Tabela 2	
Correlação entre a concentração de TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 e densidade parasitária obtido no baço e fígado em cães assintomáticos (n=20) e sintomáticos (n=20) naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i> .....	35

**ABREVIATURAS**

CD	<i>Cluster differentiation</i>
CCZA	Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio imunoenzimático em fase sólida
<i>g</i>	Aceleração da gravidade
Ig	Imunoglobulina
IFN	Interferon
IL	Interleucina
kDa	Quilodalton
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
<i>n</i>	Número (tamanho da amostra)
NK	<i>Natural killer</i>
NO	Óxido Nítrico
ng	Nanograma
<i>p</i>	Probalidade (nível de significância)
pg	Picogrma
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Th1	T <i>helper</i> (auxiliar) tipo 1
Th2	T <i>helper</i> (auxiliar) tipo 2

TGF	Fator de transformação de crescimento
TNF	Fator de necrose humoral
TMB	Tetrametilbenzidina
μg	Micrograma

## NÍVEIS DE TNF-ALFA, IL-4 E IL-10 NO BAÇO E FÍGADO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) chagasi*

**RESUMO** - A leishmaniose visceral canina é causada pela *Leishmania (Leishmania) chagasi* que é transmitida por flebotomíneos. A evolução clínica desta parasitose depende de uma complexa interação entre o parasita e a resposta imune do hospedeiro. Os cães infectados, que constituem o principal reservatório doméstico desse parasita, podem permanecer assintomáticos ou tornarem-se sintomáticos. O objetivo deste estudo foi quantificar as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10, em extratos de baço e fígado, de cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* e investigar a ocorrência de associação com a densidade parasitária nestes órgãos. Quarenta cães provenientes da cidade de Araçatuba, estado de São Paulo, área endêmica para leishmaniose visceral canina, soropositivos para *L. (L.) chagasi*, de acordo com ELISA indireto, foram divididos em dois grupos com 20 cães assintomáticos e 20 sintomáticos, com pelo menos três sinais da doença. Um grupo de 12 cães saudáveis, provenientes de área não endêmica, soronegativos para *Leishmania* spp., testados por ELISA indireto e que não apresentaram amplificação do DNA para *L. (L.) chagasi*, fizeram parte do grupo controle negativo. Após eutanásia dos cães, os fragmentos de baço e fígado foram coletados para a quantificação das citocinas, através de ELISA de captura, e determinação da densidade parasitária por PCR em tempo real. Nos animais infectados, os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10, no baço e no fígado, foram superiores aos dos animais do grupo controle. A comparação entre os dois órgãos, nos cães infectados, mostrou que o fígado foi o principal produtor dessas citocinas. O nível de TNF- $\alpha$  e a densidade de parasitas, no fígado, foram mais elevados nos cães sintomáticos, quando comparado com os cães assintomáticos. Os níveis de IL-4 e IL-10 não diferiram entre os dois grupos de cães infectados. Uma fraca associação entre densidade parasitária e produção de IL-10 foi

observada no fígado de cães assintomáticos. O baço apresentou maior densidade parasitária que o fígado, com uma forte correlação linear positiva entre os dois órgãos. Estes resultados indicam que o fígado apresenta uma relação positiva entre a densidade de *L. (L.) chagasi* e a manifestação clínica da infecção. Ainda, o baço é o principal sítio de permanência do parasita em cães.

**Palavras-chave:** Cães, Baço, Citocinas, Fígado, IL-4, IL-10, Leishmaniose, TNF-alfa

**LEVELS OF TNF-ALFA, IL-4, AND IL-10 IN SPLEEN AND LIVER OF  
*Leishmania (Leishmania) chagasi* NATURALLY INFECTED DOGS**

**SUMMARY** – Canine visceral leishmaniasis is caused by *Leishmania (Leishmania) chagasi* that is transmitted by phlebotominae. The clinical evolution of this parasitosis depends on a complex interaction between the parasite and the immune response in the host. Infected dogs, the main domestic reservoir of this parasite, may remain asymptomatic or may become symptomatic. The aim of this study was to quantify the TNF- $\alpha$ , IL-4, and IL-10 cytokines in spleen and liver extracts from asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with *L. (L.) chagasi* and to investigate the association with the parasite density in these organs. A total of 40 dogs from the city of Araçatuba, São Paulo state (an endemic area for canine visceral leishmaniasis), all *L. (L.) chagasi* positive according to indirect ELISA, were divided into two groups, each containing of 20 asymptomatic dogs and 20 symptomatic dogs presenting at least three signs of the disease. A group of 12 healthy dogs from the non endemic area and negative for *Leishmania* spp, as indicated by indirect ELISA, and PCR negative for *L. (L.) chagasi*, were used as negative controls. After euthanasia, fragments from the spleen or liver were collected to quantify the cytokines, with ELISA capture assay, and to check parasite density by real time PCR. In infected dogs, the levels of TNF-  $\alpha$ , IL-4, and IL-10 were higher than in control animals, for the two organs. Cytokine levels in the spleen and liver of infected dogs revealed the liver as the main cytokine-producing organ during infection. The level of TNF- $\alpha$  was higher in the liver of symptomatic dogs, where parasite density was higher than in asymptomatic dogs. The levels of IL-4 and IL-10 did not differ between symptomatic and asymptomatic dogs. A weak association between parasite density and IL-10 production was seen in the liver of asymptomatic dogs. The spleen showed higher parasite density than the liver, with

a strong positive linear correlation between the two organs. These results indicate that the liver presents a positive relationship between *L. (L.) chagasi* density and clinical manifestation of infection. Furthermore, spleen is the major site of high parasite density in infected dogs.

**Key-words:** Cytokines, Dogs, IL-4, IL-10, Leishmaniasis, Liver, Spleen, TNF-alfa



## I INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença parasitária que afeta milhões de pessoas em várias partes do mundo. A forma visceral está emergindo como um importante problema de saúde pública onde os cães, principais reservatórios domésticos para o parasita, desempenham um papel fundamental na transmissão para o homem, através dos flebotomíneos. Após a transmissão, os parasitas inicialmente se multiplicam no interior dos macrófagos da pele, de onde podem se disseminar, por via sangüínea ou linfática, para o baço, fígado, os rins, medula óssea, pele e trato digestivo, urinário e respiratório. Contudo, deve-se considerar que o parasita pode escapar dos mecanismos microbicidas do hospedeiro e sobreviver no meio intracelular. O controle da multiplicação do parasita parece estar diretamente dependente de uma resposta imune celular onde as citocinas são elementos chave.

Assim, o espectro patológico da leishmaniose visceral canina (LVC) é variável devido a fatores inerentes ao parasita e ao sistema imune do hospedeiro. Desta forma, os cães infectados podem permanecer assintomáticos ou desenvolver a doença. Ainda, deve-se considerar que, mesmo os animais assintomáticos apresentam parasitas na pele que, ao lado do baço, é um dos sítios com maior densidade parasitária durante o curso da LVC, constituindo-se, portanto, na mais importante fonte de parasitas para os flebotomíneos.

Atualmente, parte expressiva do conhecimento sobre a resposta imune frente à *Leishmania* spp. é proveniente de estudos em modelos experimentais murinos que, não necessariamente, refletem aquilo que ocorre nos cães.

As perspectivas de controle da leishmaniose são dependentes do progresso da ciência a fim de se obter ferramentas eficientes para serem aplicadas na prevenção e no tratamento dos hospedeiros infectados e doentes. No presente momento, uma das medidas rotineiramente aplicadas no controle do avanço da LV é a eutanásia dos cães infectados. Embora tal medida não seja plenamente aceita

pela maioria da população residente nas áreas endêmicas para LVC, ela pode propiciar uma fonte rica de material biológico para o desenvolvimento de pesquisas.

As citocinas constituem uma família de mediadores protéicos, tanto da imunidade inata como específica, e muitos estudos têm sido desenhados a fim de verificar o papel de algumas delas no processo infeccioso por *Leishmania* spp., como também na evolução clínica dessa doença.

Dentre as citocinas, aquelas reconhecidas de perfil Th1, como a IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  são apontadas em alguns processos infecciosos como protetoras, enquanto que as de perfil Th2, como a IL-4, IL-5 e IL-10, contrariamente, são indicadas com supressoras dessas respostas imunes. Contudo, esta dicotomia não tem sido verificada nclaramente estabelecida para a LVC.

A fim de esclarecer o papel do TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10 na LVC, o presente estudo quantificou estas citocinas no baço e no fígado de cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, com ou sem manifestação clínica, e investigou a ocorrência de associação dos seus níveis com a densidade parasitária presente nesses órgãos.

## II REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Leishmaniose visceral

A leishmaniose é considerada uma doença de prevalência mundial, causada por um protozoário do gênero *Leishmania* da família Trypanosomatidae, que atinge 88 países, sendo 72 destes considerados países em desenvolvimento. A forma visceral ocorre em 65 países, sendo que a maioria dos casos humanos (90%) ocorre em áreas rurais e suburbanas de Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (DESJEUX, 2004). No Brasil, a migração do meio rural para o urbano foi um fator que acelerou a expansão da leishmaniose visceral (LV) (DESJEUX, 2004), especialmente no Nordeste (DANTAS-TORRES, 2006) e Sudeste do país (SANTIAGO et al., 2007). A gravidade desta expansão reside, não somente na sua alta incidência e ampla distribuição, mas também na possibilidade de assumir formas graves e letais quando associada a quadros de desnutrição (GONTIJO; MELO, 2004) e de infecções com o vírus da imunodeficiência humana (ASHFORD, 2000; DAHER et al., 2009).

Na forma visceral três espécies de protozoários do gênero *Leishmania* estão envolvidas com a infecção, dependendo da região geográfica de sua ocorrência. Na Ásia é a *Leishmania (Leishmania) donovani*, ainda na Ásia, na Europa e África é a *Leishmania (Leishmania) infantum* e nas Américas cita-se a *Leishmania (Leishmania) chagasi*, sinônimo de *L. (L.) infantum* (LAINSON; SHAW, 1987; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

No Brasil, a distribuição geográfica da endemia não é uniforme, com tendência a expansão para outras áreas além do Nordeste que, até a década de 1990, concentrava 90% dos casos. Outro fato a ser destacado é a tendência de urbanização da doença, com registro de surtos na década de 1980 em médios e grandes centros urbanos como Teresina (PI), São Luís (MA), Natal (RN), Fortaleza

(CE), Aracaju (SE), Rio de Janeiro (RJ), Montes Claros (MG) e Corumbá (MT). No início de 1990, outros municípios registraram surtos de LV como Belo Horizonte (MG), Feira de Santana (BA), Várzea Grande (MT), Araçatuba (SP), Aquidauana (MS), dentre outros. A partir do ano de 2000, novas epidemias foram reportadas em Três Lagoas e Campo Grande (MS), Caxias, Timon, Codó e Imperatriz (MA), Palmas (TO), Bauru (SP), Paracatu (MG), Camatá (PR) (BEVILACQUA et al., 2001; BRASIL, 2004; COSTA et al., 1990). Com a urbanização da LV, foram registrados, no período de 1980 a 2005, um recorde de 59.129 novos casos da doença. De todos os casos, 82,5% ocorreram na região Nordeste, com registro de expansão para a região Centro-Oeste e Sudeste. Atualmente, 20 estados brasileiros (74%) têm relatado casos autóctones da doença (MAIA-ELKHOURY, 2008). No estado de São Paulo, a transmissão da doença na população humana, no período de 1999 até outubro de 2007, foi observada em 48 municípios, sendo que 23 deles notificaram casos humanos em 2007 (CAMARGO-NEVES, 2007). A taxa de letalidade em 2006 foi de 4,5%, no entanto, com a expansão da doença em novos municípios constatou-se o aumento desta taxa para 8,5% até novembro de 2007. Em Araçatuba (SP), não foi registrado óbito por LV no biênio 2005-2006, porém em 2007 a taxa de letalidade foi de 16,2% (CAMARGO-NEVES, 2007).

A leishmaniose visceral canina (LVC) existe em 55 países dentre aqueles 88 em que a forma humana está presente, ocorrendo especialmente na China, no Mediterrâneo e no Brasil (ALVAR et al., 2004).

No Brasil, uma das primeiras observações da infecção canina por *Leishmania* spp. foi realizada por Evandro Chagas, quando demonstrou a existência da doença no homem, no cão e a infecção do flebótomo *Lutzomyia longipalpis* (CHAGAS et al, 1938). O primeiro caso de ocorrência da LVC, no estado de São Paulo, ocorreu em 1998, na cidade de Araçatuba (FEITOSA, 2000). Desde a primeira detecção até outubro de 2007, a LVC foi registrada em 57 municípios abrangendo todas as regiões em que o vetor foi detectado, exceto a região metropolitana de São Paulo, onde os elementos da cadeia de transmissão ainda não foram elucidados.

A prevalência canina média no estado de São Paulo, obtida a partir de inquéritos censitários realizados em 30 municípios dos 43 com transmissão canina, no ano de 2006, foi de 7,3% (CAMARGO-NEVES, 2007).

Os cães são considerados os principais reservatórios domésticos da *L. (L.) chagasi* (MORENO; ALVAR, 2002). O sexo, a raça e a idade desses animais têm sido avaliados em estudos epidemiológicos, sendo que o sexo não aparece como um fator determinante da doença (AMELA et al., 1995; MORILLAS et al., 1996). Tem-se considerado que 80% dos cães infectados apresentam idade inferior a três anos e outro pico, menos significativo, ocorre entre os 7- 8 anos, quando se inicia o declínio das atividades do sistema imune protetor (AMELA et al., 1995). Os cães de todas as raças, teoricamente, são similarmente suscetíveis à infecção por *Leishmania* spp., embora os da raça Ibizian e Mongrels, provenientes de áreas endêmicas, têm se apresentado mais resistentes, quando comparados com outras raças (SOLANO-GALLEGO et al., 2001). Contudo, não está clara a relevância do patrimônio genético sobre a resistência natural desses animais uma vez que, algumas raças exibem manifestações clínicas peculiares, como a dermatite nodular em boxers (FERRER et al., 1988).

A transmissão, entre hospedeiros vertebrados, ocorre pela picada da fêmea do flebotomíneo hematófago *Lutzomyia longipalpis*. Recentemente, outros artrópodes têm sido descritos como vetores, como o carrapato e a pulga (COUTINHO et al., 2005; 2007; FERREIRA et al., 2009). Em cães, a transfusão sanguínea também tem sido apontada como uma via de transmissão do parasita (OWENS et al., 2001). A transmissão vertical, apontada como provável, não foi comprovada em estudos realizados com filhotes de fêmeas com LVC (ANDRADE et al., 2002).

Estudos sorológicos têm mostrado que entre 50% e 60% dos cães infectados são assintomáticos (MANCIANTI et al., 1986; BRANDONÍSIO et al., 1992) e constituem fonte de infecção para os flebotomíneos (MOLINA et al., 1994; TRAVI et al., 2001). Foi observado que, metade dos cães assintomáticos podem eliminar o parasita espontaneamente e tornarem-se curados (ACEDO-SÁNCHEZ

et al., 1998; FISA et al., 1999). Os demais cães que desenvolvem a doença (GRADONI et al., 1980) são considerados mais infectantes para os insetos vetores quando comparados com os assintomáticos (TRAVI et al., 2001). Contudo, deve-se considerar que fatores como estado nutricional dos cães, a virulência da cepa do parasita, a capacidade vetorial dos flebotomíneos, dentre outras, podem desempenhar importante papel na intensidade de transmissão (ALVAR et al., 2004).

Após a picada dos flebotomíneos, os parasitas são rapidamente distribuídos para os linfonodos e baço e, a partir destes, pode atingir o rim e o fígado (MOLYNEUX; ASHFORD, 1983). O parasita pode também ser encontrado na medula óssea, na pele e nos tratos urinário, digestivo e respiratório (MARZOCHI et al., 1985; SWENSON et al., 1988). Em humanos e em camundongos suscetíveis, o baço, o fígado e a medula óssea são os principais sítios de desenvolvimento do parasita (SMELT et al., 1997).

A resposta imune para a infecção por *Leishmania* spp. pode variar marcadamente em diferentes órgãos do mesmo animal. Em alguns deles, a infecção pode ser resolvida, enquanto em outros o patógeno pode persistir (ENGWERDA; KAYE, 2000). A presença do parasita nos tecidos e órgãos desencadeia reações que produzem lesões e sintomas característicos da LVC e que podem estar relacionados com as fases aguda, crônica e terminal da doença. Na fase aguda, podem ser observados sinais clínicos como perda de peso, acompanhada de astenia e apatia. A partir do terceiro mês, surgem manifestações cutâneas, principalmente na região periorbital e auricular e também conjuntivite (HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ et al., 1987). Na fase crônica, os animais apresentam sintomas clínicos inespecíficos como hipertermia, alteração do apetite, polidipsia, dentre outros (HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ et al., 1987; KEENAN et al., 1984). Nesta fase, os sinais característicos que se apresentam são linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia, lesões de pele, epistaxe, atrofia muscular, onicogribose, tremores e deficiências motoras (ABRANCHES et al., 1991; BOURDOISEAU et al., 1997; SLAPPENDEL, 1988). Na fase final da LV,

os cães apresentam-se caquéticos e as úlceras cutâneas se espalham amplamente. A evolução para a morte é decorrente de falência renal ou hepática (FERRER, 1989).

O diagnóstico da LVC não é simples de ser realizado, considerando-se a grande variedade de sinais e sintomas apresentado pelos cães durante as diferentes fases da doença e também, pela possibilidade da concorrência de outras doenças infecciosas, que podem apresentar quadros clínicos semelhantes. Assim, os métodos de diagnóstico laboratorial são ferramentas importantes nesse processo. Estes se baseiam principalmente na detecção do parasita e na avaliação da resposta imune humoral e celular do hospedeiro. A realização de exames laboratoriais, em associação com a avaliação clínica, é fundamental para o estabelecimento do diagnóstico.

O tratamento antimicrobiano de cães, com fármacos usualmente utilizados para humanos, não é recomendado no Brasil uma vez que, os resultados terapêuticos são insatisfatórios, podendo inclusive, promover a seleção de parasitas resistentes (BRASIL, 2004).

A eutanásia dos cães infectados é uma medida que não é bem aceita pela população em geral e ainda, não tem se apresentado eficaz no controle da LVC.

## **2.2 Resposta imune do hospedeiro na leishmaniose visceral (LV)**

A inoculação no hospedeiro de formas promastigotas de *Leishmania* spp. é fundamental para a instalação e desenvolvimento do processo infeccioso. Muitos indivíduos são assintomáticos, enquanto que outros desenvolvem a infecção. A infecção experimental em animais e estudos *in vitro* sugerem a existência de vários mecanismos que permitem a sobrevivência do parasita e a sua multiplicação. Contudo, o soro de alguns indivíduos e certos mamíferos contém fatores capazes de aglutinar ou lisar promastigotas *in vitro*, porém quando no

interior dos macrófagos, as formas amastigotas são protegidas por anticorpos e por outras moléculas solúveis. Assim, a sobrevivência do parasita no hospedeiro é dependente da capacidade que ele apresenta de penetrar na célula do hospedeiro (MALLA; MAHAJAN, 2006).

A imunidade inata desenvolve um papel fundamental na resistência do hospedeiro frente a patógenos intracelulares. Esta resposta pode ser tanto no controle do crescimento do patógeno, durante os primeiros estágios da infecção, como no direcionamento da produção de citocinas que vão conduzir a resposta imune específica (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2005). Um importante evento que ocorre no macrófago, após a interação entre a molécula receptora e o seu ligante, é a ocorrência de um *burst* respiratório e a conseqüente produção de compostos metabólicos tóxicos, como o peróxido de hidrogênio. Em macrófagos peritoneais, as formas amastigotas e promastigotas podem desenvolver o *burst* respiratório de maneira diferente. Isto ocorre, possivelmente, porque a internalização do parasita deve-se a diferentes receptores. Considera-se que o receptor manose/fucose pode ser importante para promastigotas e não para amastigotas (CHANNON et al., 1984).

Em camundongos, as avaliações relativas ao papel desempenhado pelos compostos ROI, produzidos pelos macrófagos, indicam que pode ocorrer falha no *burst* respiratório em macrófagos residentes do fígado, porém outras populações de células podem desempenhar o mecanismo de morte celular dependente de oxigênio (KAUSALYA et al., 1993).

Nesses animais, a relativa contribuição dos compostos intermediários do oxigênio (ROI), derivados do *burst* respiratório de macrófagos, e dos compostos intermediários do nitrogênio (RNI), ocorre, provavelmente, nos primeiros estágios da infecção intracelular, tanto para regular o recrutamento de células inflamatórias mononucleares teciduais, como para conter a replicação dos microrganismos. Possivelmente, RNIs são necessários e suficientes para eventualmente controlar a infecção visceral (MURRAY; NATHAN, 1999).



A formação de granuloma também está associada com o controle da infecção. Levando-se em conta a relação existente entre a estrutura e função, os granulomas podem ser considerados estruturalmente intactos, os quais não apresentam atividade leishmanicida (granuloma “ineficiente”); granulomas com evidente destruição de parasitas (granuloma “hipertrofiado”) e por último, eles podem não ser detectados na forma de nódulos ou agregados (granuloma “invisível”) (MURRAY, 2001).

Os neutrófilos também exercem um papel fundamental na indução de uma resposta imune protetora em camundongos infectados por *L. (L.) donovani*, tanto como célula efetora, envolvida na morte do parasita intracelular, como também influenciando o desenvolvimento de uma resposta imune de perfil Th1 (MCFARLANE et al., 2008).

A imunidade protetora nas infecções por *Leishmania* spp. é mediada por célula e resulta na morte dos parasitas intracelulares pela ativação dos macrófagos e respostas citotóxicas (CARVALHO et al., 1988). A falha no controle do crescimento da *L. (L.) chagasi* no interior do macrófago leva a uma inibição da apoptose (MOORE et al., 1994).

Altos títulos de anticorpos podem ser encontrados durante o curso da infecção e isto constitui uma das ferramentas para a identificação de indivíduos doentes e também, de portadores de infecções subclínicas (BADARÓ et al., 1986). As imunoglobulinas produzidas são da classe IgM, IgA e IgG (GHOSH et al., 1995). Ainda, foi verificado que a classe IgE é produzida tanto em humanos (ATTA et al., 1998), como em cães (ALMEIDA et al., 2005).

Através da utilização de anticorpos monoclonais, específicos para as diferentes subclasses de IgG canino, foi verificado que no soro dos cães assintomáticos houve predominância de anticorpos da subclasse IgG1, enquanto que nos sintomáticos foram observadas todas as subclasses pesquisadas, porém sem predomínio de nenhuma delas (OLIVEIRA et al., 2009).

Em indivíduos com LV, IL-2, IL-12 e IFN- $\gamma$ , dentre outras citocinas, exercem um importante papel na regulação da resposta imune (BACELLAR et al., 1996;

CARVALHO et al., 1985). Foi observado que os níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$ , IL-15, IL-12 p40 e IL-18 estavam mais elevados em pacientes sintomáticos, quando comparados com os assintomáticos e indivíduos saudáveis de áreas endêmicas para LV (HAILU et al., 2004; 2005).

Níveis plasmáticos elevados de IFN- $\gamma$ , assim como de IL-15, IL-12 p40 e IL-18 são característicos nos quadros de LV humana em evolução (CARSON et al., 1995; TRINCHIERI, 1998; AKIRA, 2000). Contudo, significativas reduções nesses níveis podem ser observadas no plasma, após o tratamento, sugerindo um importante papel imunopatogênico destes mediadores (HAILU et al., 2004).

Produtos protéicos de baixo, médio e alto peso molecular, liberados pela *L. (L.) chagasi*, são capazes de estimular esplenócitos de camundongos infectados, suscetíveis (BALB/c) e mais resistentes (C57BL/6). Tais proteínas antigênicas têm atuação na imunidade do hospedeiro e, dependendo de suas características genéticas e da magnitude do parasita, parecem exercer papel chave no controle da replicação do parasita. Nos camundongos sensíveis, com alta carga parasitária, a fração protéica de peso molecular médio é capaz de promover a produção de IL-4, enquanto que as frações de baixo e alto peso molecular podem induzir altos níveis de IL-12. Nos camundongos mais resistentes, após a redução da carga parasitária, a fração protéica de baixo peso molecular é capaz de induzir a produção de IL-4 (ROSA et al., 2005). Após estudos complementares, foi atribuído um papel profilático potencial para a fração protéica com peso molecular intermediário, uma vez que esta foi hábil em induzir reposta Th1, com produção de IL-12, considerada necessária para a manutenção de células de memória em linhagens de camundongos com diferentes níveis de parasitismo (ROSA et al., 2006). Portanto, pode-se considerar que fatores intrínsecos ao parasita podem influenciar no desenrolar das infecções experimentais de camundongos, independentemente de suas características genéticas de resistência ou suscetibilidade (GANGNEUX et al., 2000). Assim, o conceito de resistência e suscetibilidade atribuídos ao perfil de citocinas Th1/Th2, respectivamente, parece

não ser aplicável quando se leva em consideração os camundongos experimentalmente infectados por esse parasita (HONORÉ et al., 1998).

O mecanismo imune, envolvido na proteção e suscetibilidade dos cães frente à *Leishmania* spp., não foi ainda estabelecido. Tem-se considerado que a resposta imune celular tem habilidade de conter a infecção e o animal permanecer assintomático (PINELLI et al., 1994; SANTOS-GOMES et al., 2002). Mudanças na resposta imunológica envolvendo células T têm sido relacionadas com o surgimento de sintomas em cães infectados (CIARAMELLA et al., 1997). Essas mudanças incluem ausência de hipersensibilidade do tipo tardia frente a antígenos de *Leishmania* (CARDOSO et al., 1998; SOLANO-GALLEGOS et al., 2000), diminuição do número de células T no sangue periférico (DE LUNA et al., 1999; PINELLI et al., 1994; PINELLI, 1995) e ausência da produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 pelas células mononucleares do sangue periférico *in vitro* (PINELLI et al., 1994; PINELLI, 1995; SANTOS-GOMES et al., 2002). A produção de altos títulos de anticorpos anti-leishmania, presentes em animais sintomáticos, também não possuem papel protetor (MARTINEZ-MORENO et al., 1995).

A resistência à LVC tem sido associada com a ativação de células Th1 e a produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 e TNF- $\alpha$  (PINELLI et al., 1994; PINELLI et al. 1995). O principal mecanismo efetor observado na proteção de cães infectados com *L. (L.) infantum* é a ativação de macrófagos pelo IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e a conseqüente destruição das formas amastigotas intracelulares, principalmente pela produção de óxido nítrico (PANARO et al., 2001; VOULDOUKIS et al., 1996). Também nesses animais, a imunidade mediada por células é capaz de neutralizar o processo imunossupressivo induzido pela infecção por *Leishmania* spp. e favorecer a apoptose de formas amastigotas intracelulares do parasita (HOLZMULLER et al., 2005).

Portanto, as citocinas têm sido reconhecidas como elementos chave na resposta imune do hospedeiro contra *Leishmania* spp. Tanto os macrófagos parasitados, como os linfócitos, as células dendríticas e as células *natural killer*

produzem citocinas envolvidas na resposta inflamatória e na resposta adaptativa ao parasita (BRODSKYN et al., 2003; SACKS; SHER, 2002).

### 2.3 Fator de necrose tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) e leishmaniose visceral (LV)

O TNF- $\alpha$  é sintetizado inicialmente como uma proteína transmembrânica que pode ser clivada proteoliticamente para produzir a forma secretada. A sua principal fonte é o fagócito mononuclear ativado, embora as células T ativadas também podem secretar essa citocina, dentre outras (EIGLER et al., 1995). Esta proteína pode ligar-se às células alvo através de dois receptores: TNFR1 e TNFR2 (DEROUICH-GUERGOUR et al., 2001).

Esta citocina pleiotrópica tem sido implicada na defesa do hospedeiro contra numerosos patógenos intracelulares através da estimulação de diferentes células efetoras que participam de vários mecanismos antimicrobianos (BEUTLER; CERAMI, 1987). A sua ação, em sinergia com IFN- $\gamma$ , é capaz de ativar os macrófagos e destruir *Leishmania* spp. (THEODOS et al., 1991). Contudo, tem-se verificado que esta citocina pró-inflamatória também pode exercer efeito deletério em diferentes respostas imunes a agentes infecciosos (BEUTLER; GRAU, 1993; VASSALLI, 1992).

Na infecção de camundongos BALB/c com *L. (L.) donovani* foi observado que a presença do parasita induz a secreção de TNF- $\alpha$  no fígado, que não é liberada na circulação sangüínea, sugerindo que esta pode ser compartimentalizada nos tecidos. Também, foi sugerido que o TNF- $\alpha$  tem papel crítico na aquisição de resistência a *L. (L.) donovani* e na resolução da infecção experimental nesses animais (TUMANG et al., 1994). Possivelmente, esse papel protetor seja devido à uma resposta tecidual envolvendo a produção progressiva

de TNF- $\alpha$  pelas células de Kupffer durante o curso da infecção (ENGWERDA et al., 1996).

O estudo da resposta imune ocorrida no baço e fígado de camundongos BALB/c, experimentalmente infectados com *L. (L.) donovani*, mostrou uma expressão progressiva de TNF- $\alpha$  durante os quatro meses de acompanhamento desses animais. Esta variação temporal na resposta imune órgão-específica pode estar relacionada com o controle diferencial da carga parasitária nesses órgãos (MUKHERJEE et al., 2003). Os macrófagos do parênquima hepático dessa linhagem de camundongo, quando infectados por *Leishmania (L.) chagasi*, também produziram um nível mais elevado de TNF- $\alpha$ , após 72 horas de infecção, quando comparado com os valores produzidos nas 24 primeiras horas, após a inoculação do parasita. O aumento do nível dessa citocina pode estar diretamente associada com o dano hepático (DIAS COSTA et al., 2007).

A expressão de mRNA para TNF- $\alpha$ , em células esplênicas de “Syrian hamster”, aumentou após uma semana de infecção com *L. (L.) donovani*. Contudo, posteriormente, o nível de sua expressão diminuiu (MELBY et al., 1998). Outro estudo com esses animais, descreveu que após o uso de uma nova formulação de anfotericina para o tratamento de animais infectados com *L. (L.) infantum*, as células do baço mostraram uma regulação positiva na expressão de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (IÑIGUEZ et al., 2006).

A presença de TNF- $\alpha$  em pacientes com leishmaniose visceral tem sido relacionada com a doença em atividade (BARRAL-NETO et al., 1991). Em um estudo realizado em crianças com LV, foi verificado que 100% delas produziram TNF- $\alpha$ , estando esta citocina presente em menor concentração nas amostras provenientes de crianças oligoassintomáticas (GAMA et al., 2004). Contudo, pacientes com calazar ativo também podem apresentar níveis séricos mínimos de TNF- $\alpha$  (ANSARI et al., 2006).

Em cães sintomáticos infectados por *L. (L.) chagasi* não foi possível estabelecer uma correlação entre o nível de TNF- $\alpha$  detectado no soro, com a

doença em atividade (LIMA et al., 2007). O TNF- $\alpha$  produzido pelas células esplênicas de cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* também não foi diferente, comparando o grupo de animais assintomáticos e sintomáticos (LAGE et al., 2007). Os cães experimentalmente infectados por *L. (L.) infantum*, empregados em um estudo longitudinal, mostrou que a expressão de citocinas Th1, como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-12 p40, pelas células mononucleares de sangue periférico foi maior do que a IL-10 e, mesmo assim, não foi possível controlar a infecção que culminou com a progressão da doença (SANCHEZ-ROBERT et al., 2008).

Portanto, o fato do TNF-  $\alpha$  ser uma citocina procedente de várias fontes celulares e desempenhar múltiplos papéis sempre deve ser considerado na interpretação dos resultados obtidos experimentalmente (VASSALLI, 1992).

## **2.4 Interleucina-4 (IL-4) e leishmaniose visceral (LV)**

A IL-4 é uma citocina produzida pelas células T auxiliares e exerce importantes funções sobre diferentes tipos celulares atuando como fator de crescimento e diferenciação de células T, em particular para as células Th2 (ABBAS et al., 1996; NOBLE et al., 1995).

Os estudos realizados em modelos murinos infectados com *Leishmania* spp. têm mostrado que as citocinas de perfil Th2, dentre elas a IL-4, tem sido relacionada com a evolução do quadro clínico apresentado por esses animais (LOCKSLEY; SCOTT, 1991; SCOTT et al., 1989). Em um estudo com camundongos BALB/c, infectados com *L. (L.) donovani*, verificou-se que o predomínio de resposta imune Th1 teve papel protetor na infecção e, que IL-4 ocupou um papel, embora secundário, na suscetibilidade desses camundongos à infecção (LEHMANN et al., 2000). Paradoxalmente, foi mostrado que IL-4 tem um importante papel na efetividade da quimioterapia anti-leishmania, que parece estar

relacionado com a modulação da produção de IFN- $\gamma$  por estes animais infectados (ALEXANDER et al., 2000). Porém, camundongos infectados com *L. (L.) infantum* desenvolveram uma resposta imune mista, com concomitante produção de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10, tanto no baço como no fígado (ROLÃO et al., 2007).

A patogênese da leishmaniose parece estar relacionada com a ação citotóxica da célula T e o controle da LV depende da capacidade das células Th1 em desencadear uma resposta imune com a produção de múltiplas citocinas no início da infecção. Durante infecções experimentais progressivas em camundongos, ocorreu a expansão de células T CD4+, tipo Th2, com secreção de IL-4 que resultaram na ativação policlonal de células B. Posteriormente, o estabelecimento completo da LV foi associado com uma anergia celular. Esta anergia pode ser explicada por uma comunicação inapropriada durante a apresentação do antígeno. Deve-se considerar que, não só a indução de IL-4, mas também da IL-10 pode ser responsável por essa anergia (MALLA; MAHAJAN, 2006).

Os neutrófilos, que apresentam papel primordial no desenvolvimento de uma resposta imune protetora, participando diretamente na morte do parasita, quando depletados, contribuem para o aumento do nível de IL-4 e IL-10 no baço, produzidas pelas células T CD4+ e CD8+ (MC FARLANE et al., 2008).

A produção de IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  pelas células mononucleares de pacientes com LV ativa, *in vivo* e *in vitro*, não permitiram que fosse claramente caracterizado o fenótipo Th2, como tem sido observado em estudos com modelos murinos (CILLARI et al., 1995). A avaliação do perfil de citocinas produzidas por clones de células T, provenientes de um paciente com LV ativa, revelou que apenas as células T CD8+ foram aptas a expressar IL-4 com alta frequência, quando comparado com as células dos clones de células T CD4+ (LAGLER et al., 2003). Pacientes com LV foram avaliados quanto ao perfil de citocinas no soro, sendo que a IL-4 não foi detectada nos pacientes oligoassintomáticos (GAMA et al., 2004). Pacientes com calazar ativo também apresentaram níveis séricos mínimos de IL-4 (ANSARI et al., 2006).

Estudos realizados em cães com LV têm apresentado resultados diferentes quanto a produção de IL-4. A análise da medula óssea, de cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, mostrou que a expressão de IL-4 ocorreu principalmente nos casos clínicos mais severos, sugerindo sua associação com esta patologia (QUINNELL et al., 2001). Por outro lado, cães infectados por *L. (L.) infantum*, apresentaram, após seis meses de infecção, uma elevação na expressão de IL-4 pelas células mononucleares de sangue periférico, que contudo, foi quantitativamente equivalente em cães sintomáticos e assintomáticos (MANNA et al., 2006).

O paradigma Th1/Th2, de resistência e suscetibilidade para parasitas intracelulares, é uma forma grosseiramente simplificada de um complexo trabalho de interação regulatória e anti-regulatória. Tais mecanismos diferem de acordo com a espécie de *Leishmania*, com o hospedeiro envolvido e também em relação ao tecido que está será afetado pela infecção (ALEXANDER; BRYSON, 2005).

Atualmente, substanciais evidências sugerem que o desenvolvimento de uma efetiva imunidade tipo 1 pode envolver significativamente as citocinas de perfil Th2 como a IL-4 e a IL-13 (ALEXANDER; MCFARLANE, 2008).

## **2.5 Interleucina-10 (IL-10) e leishmaniose visceral (LV)**

A IL-10 é uma citocina produzida por macrófagos ativados, por alguns linfócitos e outras células não-linfocitárias. Dentre as suas funções, destacam-se a inibição da produção de citocinas pelos macrófagos e a inibição das funções acessórias destas células na ativação dos linfócitos T (MOORE et al., 1994). A IL-10 tem sido apontada como uma das principais citocinas supressoras da resposta imune protetora, tanto em modelos murinos como em humanos com LV (BACELLAR et al., 2000; BARRAL et al., 1993).



O papel inibitório da IL-10 foi observado em um estudo conduzido por Murray et al. (2002), com camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) donovani* e tratados com anti-IL-10R, onde os animais apresentaram uma marcante cura.

A produção de IL-10 pelas células mononucleares de pacientes com LV ativa, *in vivo* e *in vitro*, pode desempenhar um papel importante na inibição da ativação de macrófagos induzida por IFN- $\gamma$  (CILLARI et al., 1995).

A IL-10 é uma citocina que modula tanto a resposta imune inata como a adaptativa, primariamente por exercer efeitos antiinflamatórios. Durante muitos processos infecciosos, as células T CD4+ produzem tanto IFN- $\gamma$  quanto IL-10 (TRINCHIERI, 2001).

Em indivíduos com LV, que foram avaliados quanto ao perfil de citocinas no soro, verificou-se que a IL-10 foi detectada em 88,9% dos pacientes oligoassintomáticos, cujos níveis foram significativamente inferiores quando comparados com aqueles que apresentavam a forma aguda (GAMA et al., 2004). A ocorrência de calazar ativo parece ser acompanhada de níveis séricos elevados de IL-10 (ANSARI et al., 2006). Na avaliação dos níveis plasmáticos de citocinas, em pacientes naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, verificou-se que os maiores níveis de IL-10 foram associados com o *status* clínico dos pacientes com LV. Este fato permitiu sugerir que IL-10, em associação com a baixa frequência de monócitos TNF- $\alpha$  positivos e baixos níveis de nitrato e nitrito, é o principal mecanismo associado com a LV ativa (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006).

Embora a produção de IL-10 em humanos esteja associada com quadros de LV, estudos realizados com esta citocina com a LVC nem sempre leva às mesmas considerações.

A expressão de IL-10, em aspirado de medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, não foi superior aos dos cães não infectados (QUINNELL et al., 2001). Outros estudos, realizados com células mononucleares de sangue periférico de cães infectados, mostraram que poucos, dentre os animais sintomáticos, expressaram IL-10 quando estimulados com antígeno deste parasita (SANTOS-GOMES et al., 2002). Por sua vez, a produção de IL-10 não foi

diferiu quando se comparou cães experimentalmente infectados assintomáticos com cães não infectados (CHAMIZO et al., 2005).

Porém, contrariamente a estes resultados, outros estudos mostram um papel importante para IL-10 no progresso de evolução da infecção. Assim, verificou-se que um elevado teor de IL-10 foi detectado no baço e no fígado, tanto dos cães sintomáticos quanto assintomáticos (CORREA et al., 2007) e ainda, em outro estudo com linfonodos, foi observada que a maior expressão de IL-10 ocorreu nos cães sintomáticos, quando comparado com os assintomáticos (ALVES et al., 2008).

Em detrimento das diferenças entre os resultados obtidos nesses estudos, informações recentes mostram que IL-10 produzida por células auxiliares Th1 podem limitar os efeitos danosos causados pela exacerbação da resposta inflamatória, contudo este controle pode também limitar a efetividade de resposta imune, resultando numa incapacidade de eliminar totalmente o patógeno (TRINCHIERI, 2007).

## **2.6 A avaliação da presença do parasita na leishmaniose visceral (LV) e o cão como modelo animal para o estudo da leishmaniose visceral (LV)**

O diagnóstico da LV não difere substancialmente entre humanos, caninos e outros animais, uma vez que em todas as espécies os dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais devem ser considerados juntos.

Os métodos laboratoriais podem estar relacionados com o isolamento do parasita, através de técnicas diretas e indiretas, e técnicas de imunodiagnóstico para detectar respostas imunes celulares e humorais do hospedeiro.

Nos cães, a detecção direta do protozoário pode ser realizada através da pesquisa de célula parasitária em *imprintes* e em esfregaços corados ou cultura de amostras que podem ser obtidas, por métodos invasivos, dos linfonodos

poplíteos, medula óssea e ainda, através da biópsia de outros tecidos, como o baço e o fígado. Nos *imprintes* e esfregaços corados, a forma de *Leishmania* spp. a ser verificada é a amastigota, enquanto que nas culturas é a forma promastigota. Deve-se considerar que, a observação da presença de formas parasitárias nestas preparações coradas está diretamente relacionada com a densidade de parasitas presente no material coletado. Para as culturas, cabe lembrar que possuem como inconveniente a necessidade de adaptação do parasita ao meio de cultivo, a demora na obtenção dos resultados e a freqüente contaminação, o que as tornam um método raramente utilizado como diagnóstico primário. O exame citológico, o isolamento e o cultivo apresentam baixa sensibilidade, especialmente nos estágios iniciais da doença quando a carga de parasitas é ainda pequena (ALVAR et al., 2004).

Outras técnicas estão disponíveis para a pesquisa do parasita, porém com uso restrito. Uma delas consiste na inoculação experimental em animais de laboratório, especialmente em camundongos ou *hamsters*, que requer, freqüentemente, a morte desses animais. A outra é o xenodiagnóstico que é realizado apenas em laboratórios especializados, uma vez que necessita de colônias de flebotomíneos estabelecidas para esta finalidade (ALVAR et al., 2004; MOLINA et al., 1994).

A reação da polimerase em cadeia (PCR) pode ser desenvolvida a partir do DNA genômico ou do minicírculo do cinetoplasto (kDNA) do parasita em amostras de sangue, pele, linfonodo, conjuntiva, medula óssea, baço e fígado de cães (IKONOMOPOULOS et al., 2003; MOREIRA et al., 2007; NICOLAS et al., 2002). Contudo, deve-se considerar que embora a obtenção de amostra de sangue seja um procedimento menos invasivo, quando comparado com aqueles realizados para a obtenção das outras amostras citadas, a carga parasitária nesse tecido biológico é menor se comparada com a pele e a medula óssea (QUARESMA et al., 2009). Embora a sensibilidade e especificidade desta técnica sejam consideradas elevadas, ela está condicionada, além da amostra biológica, a

numerosos outros fatores que incluem os iniciadores, o método de extração do DNA e o protocolo de amplificação a ser empregado (LACHAUD et al., 2002).

Uma das variações da PCR convencional, denominada PCR em tempo real, permite a detecção e a quantificação de parasitas em tecidos infectados. Especula-se que a densidade parasitária, em diferentes tecidos, pode guardar uma relação direta com as manifestações clínicas presentes nos cães (MANNA et al., 2009; REIS et al., 2009). Esta técnica em sido empregada em estudos da LV em humanos (MARY et al., 2004; WORTMANN et al., 2004; WORTMANN et al., 2005) e também em cães (ALVES et al., 2008; MANNA et al., 2006; SOLANO-GALLEGO et al., 2007).

A PCR em tempo real pode ser monitorada através do uso da sonda TaqMan<sup>®</sup> que permite detectar seqüências específicas nos fragmentos de DNA amplificados (HOLLAND et al., 1991). Esta sonda apresenta em uma das extremidades um fluoróforo e na outra, um *quencher*. Os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada após a atividade da *Taq* DNA polimerase. Durante a PCR em tempo real a sonda TaqMan<sup>®</sup> hibridiza com a seqüência da fita simples de DNA complementar alvo para a amplificação. No processo de amplificação, a sonda TaqMan<sup>®</sup> é degradada devido a atividade da exonuclease da *Taq* DNA polimerase, separando o *quencher* da molécula fluorescente durante a extensão. A separação do fluoróforo do *quencher* resulta em um aumento da intensidade da fluorescência. Assim, durante o processo de amplificação, a emissão de luz é aumentada de forma exponencial. Esse aumento da fluorescência ocorre apenas quando a sonda hibridiza e quando a amplificação da seqüência alvo é estabelecida (HEID et al., 1996).

Esta técnica constitui uma rápida alternativa para a quantificação de DNA (HEID et al., 1996) possibilitando a determinação do número de microrganismos presentes em amostras clínicas (KATAKURA et al., 1998). Portanto, é considerada uma das mais promissoras ferramentas para a detecção e quantificação de *Leishmania* spp.. Esta técnica tem sido útil para caracterizar a flutuação da carga parasitária ocorrida durante o processo infeccioso por

*Leishmania* spp., inclusive realizando determinações do número de parasitas a nível sistêmico e compartimentalizado, uma vez que se busca estabelecer uma associação entre a densidade parasitária e as características imunológicas, histopatológicas e clínicas dos hospedeiros (BRETAGNE et al., 2001; MELBY et al., 1998; REIS et al., 2009; ROLÃO et al., 2004).

Alguns estudos, aplicando esta técnica, foram realizados com cães, tanto assintomáticos como sintomáticos para LV. Os resultados obtidos tem demonstrado que a avaliação simultânea da carga parasitária e os níveis de citocinas representam uma ferramenta importante para avaliar o desenvolvimento da doença (ALVES et al., 2008; FRANCINO et al., 2006; MANNA et al., 2006; 2009). Inclusive, o uso desta ferramenta permitiu verificar que cães com lesões renais severas apresentaram elevada carga parasitária neste órgão (SOLANO-GALLEGO et al., 2007).

O cão constitui um excelente modelo para o estudo da LV, uma vez que os sintomas em cães são semelhantes àqueles manifestados em humanos, com exceção à perda de pelos, a onicogribose e o emagrecimento. Desta forma, o progresso no conhecimento da LVC poderá contribuir para a prevenção da infecção no homem (HOMMEL et al., 1995). Muitos estudos com cães, natural e experimentalmente infectados com *Leishmania* spp., têm sido desenvolvidos nos últimos anos. Contudo, uma das lacunas encontradas para a realização desses estudos tem sido a falta de marcadores imunológicos caninos, o que tem contribuído para o retardamento na produção do conhecimento nesta área. As informações sobre a base imunológica da LV em cães são escassas, quando comparada com as obtidas em modelos humanos e murinos (SOLBACH; LASKAY, 2000).

Mais recentemente, o surgimento de algumas outras ferramentas tem contribuído para o desenvolvimento da pesquisa nesta área. Merece destaque a produção de anticorpos monoclonais contra homólogos caninos de *cluster of differentiation* (CD) humanos (COBBOLD; METCALFE, 1994), que permitem reconhecer a população de linfócitos caninos e monitorar esses grupos de células

em condições normais (RABANAL et al., 1995) e patológicas (BOURDOISEAU et al., 1997). Também, a clonagem, o seqüenciamento e a expressão de muitas citocinas têm permitido a pesquisa desses mediadores imunológicos através do emprego de diferentes técnicas (ARGYLE et al., 1999; DEVOS et al., 1992; KNAPP et al., 1995; VAN DER KAAIJ et al., 1999).

Portanto, a determinação da densidade de *Leishmania* spp., conjuntamente com outras determinações em tecidos e órgãos, são ferramentas promissoras para o estabelecimento de novos estudos sobre novas terapias medicamentosas (GUERRA et al., 2009).

### III OBJETIVOS

1. Verificar os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10 em tecidos esplênico e hepático, provenientes de cães soropositivos para *Leishmania (Leishmania) chagasi* e de cães não infectados.
2. Determinar a densidade de *L. (L.) chagasi* em tecidos esplênico e hepático, provenientes de cães soropositivos para esta espécie.
3. Correlacionar os níveis de citocinas (IL-4, IL-10 e TNF- $\alpha$ ) produzidos no baço e fígado de cães soropositivos para *Leishmania (L.) chagasi* com a densidade deste parasita nestes órgãos.

## IV MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Área de estudo

O município de Araçatuba, (21° 12' 32" S; 50° 25' 38" W), com área total de 1.167.311 Km<sup>2</sup>, no estado de São Paulo Brasil, é uma área endêmica para leishmaniose visceral canina (LVC).

Os ensaios foram desenvolvidos no Laboratório de Imunologia, do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA – UNESP).

### 4.2 Animais

Quarenta cães adultos, machos ou fêmeas, entre dois e cinco anos de idade, sem predileção por raça ou peso, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba (CCZA), foram selecionados quanto a soropositividade para *L. (L.) chagasi* por ELISA indireto, segundo Lima et al., (2003).

Os animais foram divididos em dois grupos: assintomáticos (n = 20) e sintomáticos (n = 20). Este último grupo consistiu de animais com pelo menos três sinais clínicos de LVC (febre, dermatite, linfadenopatia, onicogrifose, perda de peso, caquexia, problemas de locomoção, conjuntivite, epistaxe, hepatoesplenomegalia, edema e apatia).

Um grupo controle negativo composto por 12 animais saudáveis, machos ou fêmeas, sem predileção por idade, raça ou peso, provenientes de área não endêmica (Londrina, Paraná, Brasil) foi incluído no estudo. Estes cães foram



soronegativos para *L. (L.) chagasi* e não apresentaram amplificação do DNA para esta espécie de protozoário.

### **4.3 Colheita das Amostras**

Os cães foram eutanasiados pelo seguinte processo: inicialmente tranqüilizados com 0,05 mg/Kg de maleato de acepromazina (iv), seguido de administração rápida (20 s) de 15 mg/Kg de tiopental sódico (iv) e de 10 ml de cloreto de potássio 19,1%, pela mesma via. Foram obtidas amostras de sangue total para o exame sorológico e, de fragmentos de baço e de fígado. Estes fragmentos de órgãos foram utilizados para a determinação das citocinas e para a quantificação da densidade parasitária. As amostras de sangue total foram mantidas sob refrigeração e os fragmentos dos órgãos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido para evitar a desnaturação das citocinas.

### **4.4 Extratos de baço e fígado**

Os extratos dos órgãos foram obtidos para quantificar as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10, através da técnica de ELISA de captura. Para isto, 1 g de fragmento de baço ou fígado e 2 ml de meio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos), pH 7,2, foram processados, sob refrigeração, em um triturador de tecidos (Ultraturrax T 8, Staufen, Alemanha), por aproximadamente 5 minutos. O homogeneizado resultante foi centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C (Eppendorf 5810 R, Hamburg, Alemanha) e o sobrenadante foi imediatamente estocado a -80 °C (Revco, Golden Valley, MN, Estados Unidos).

#### 4.5 Quantificação de TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10

As citocinas TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10 foram quantificadas, usando o extrato de baço ou fígado, através do método imunoenzimático ELISA de captura, com anticorpo monoclonal anti-canino produzido em camundongos e com anticorpo policlonal anti-canino biotinalado produzido em cabras (R&D System, Minneapolis, MN, Estados Unidos). As placas com 96 cavidades (Nalgene Nunc Internacional, Rochester, NY, Estados Unidos) foram sensibilizadas com 0,5  $\mu$ g/mL de anticorpo monoclonal e 0,1  $\mu$ L/ml de anticorpo de detecção, respectivamente. TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10 caninos recombinantes (R&D System, Minneapolis, MN, Estados Unidos) foram usados para gerar a curva padrão. O teste foi realizado de acordo com a orientação do fabricante de anticorpos e revelado com o cromógeno 3,3',5,5' – tetrametilbenzidina – TMB (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos). As placas foram lidas em leitora Spectra Count (Pachard Bio Science Company, Piscataway, NJ, Estados Unidos), com filtro de 450 nm. A sensibilidade mínima para detecção de TNF- $\alpha$  foi de 3,12 pg/50  $\mu$ l, para IL-4 foi de 78 pg/50  $\mu$ l e para IL-10 foi de 90,65 pg/50  $\mu$ l.

#### 4.6 Determinação da densidade parasitária

A determinação da densidade parasitária foi realizada por meio da reação da polimerase em cadeia em tempo real (PCR em tempo real), conforme descrito por Rolão et al. (2004). Para tanto, 35 mg de baço ou de fígado de cada animal foram processados para a extração de DNA utilizando um *kit* comercial (PCR-

template Preparation Kit , Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante.

Para a construção da curva padrão foi utilizada a forma promastigota do parasita *L. (L.) chagasi*. A quantificação dos parasitas foi realizada através da contagem em câmara hematocimétrica de Neubauer (valor médio de quatro contagens). A suspensão de parasitas foi diluída em série de 10, variando de  $1 \times 10^6$  a  $10^{-1}$  parasitas. Essas diluições foram então processadas para a extração do DNA, como descrito acima.

Foram utilizados iniciadores e sonda interna de oligonucleotídeos desenhados a partir de regiões do minicírculo do cinetoplasto de *L. (L.) chagasi* (GenBank accession number AF169140), conforme descrito por Rolão et al., (2004). As amostras de DNA foram analisadas usando os seguintes oligonucleotídeos (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA): iniciador direto LshNRf (forward, 5'-GGTTAGCCGATGGTGGTCTT-3'), reverso LshNRr (reverse, 5'-GCTATATCATATGTCCAAGCACTTACCT-3') e sonda interna LshNRp TaqMan<sup>®</sup> (5'-ACCACCTAAGGTCAACCC-3'). A reação de PCR foi realizada em termociclador Icyler iQ (Bio-Rad Laboratories, CA, Estados Unidos). Dois microlitros de cada amostra de DNA foram adicionados a uma mistura contendo: 10  $\mu$ L de TaqMan<sup>®</sup> Universal Master Mix, No AmpErase<sup>®</sup> UNG (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos); 2  $\mu$ l de cada um dos iniciadores (900 nM), 2  $\mu$ l de sonda TaqMan<sup>®</sup> MGB (FAM<sup>™</sup> fluoróforo) (200 nM) e 2  $\mu$ l água purificada e isenta de DNase. As amostras foram ensaiadas em duplicata. Para cada ensaio, foi incluído um controle positivo e negativo. As condições ideais para amplificação foram 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60 °C por 60 segundos.

O *threshold* de detecção foi determinado automaticamente como a média da linha basal mais 10 vezes o desvio padrão, representando o nível de *background* calculado a partir do ciclo dois até o dez. Os resultados foram transformados em log baseando-se em curva padrão previamente realizada.

#### 4.7 Análise estatística

As variáveis estudadas (nível TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10 e densidade parasitária em ambos os órgãos) foram submetidas à análise pelo método dos quadrados mínimos, considerando o efeito de grupo (ANOVA). As médias por grupo foram comparadas através do teste de Tukey, sendo que os dados foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias, pré-requisitos necessários para esta análise.

A análise de correlação foi feita entre os valores de TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10, com os valores da densidade parasitária para cada grupo. O valores da densidade parasitária no baço e no fígado, para cada grupo, foram submetidos a análise de regressão.

Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

Para todas as análises estatísticas foi empregado o programa computacional SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, Estados Unidos).

## V RESULTADOS

### 5.1 Quantificação do Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ )

Os níveis médios de TNF- $\alpha$  foram superiores no fígado, quando comparado com o baço, tanto no grupo de cães assintomáticos, como no grupo de cães sintomáticos ( $p < 0,05$ ). O valor médio obtido no fígado dos cães sintomáticos foi superior ao grupo de cães assintomáticos ( $p < 0,05$ ). Porém, tal diferença não foi observada no baço dos cães destes dois grupos. Os valores médios obtidos para os cães infectados, assintomáticos e sintomáticos, tanto no baço quanto no fígado, foram maiores ( $p < 0,05$ ) que aqueles obtidos no baço e no fígado dos cães saudáveis (Figura 1).

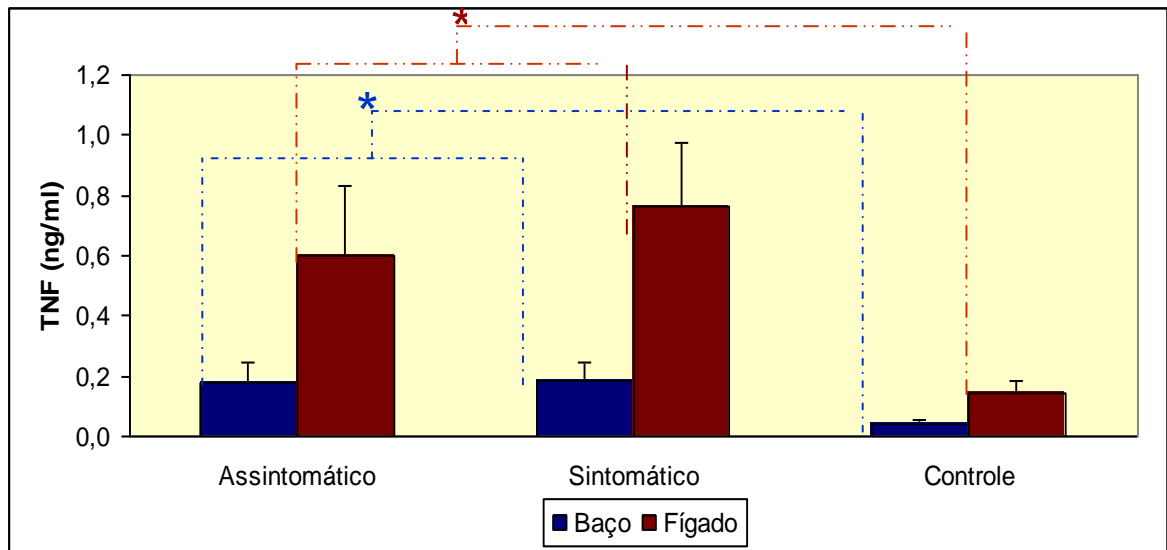


Figura 1. Quantificação de TNF- $\alpha$ , através de ELISA de captura, em extrato de baço e fígado de cães assintomáticos (n=20) e sintomáticos (n=20), naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* e de cães saudáveis (n=12) (\*  $p < 0,05$ , teste de Tukey).

## 5.2 Quantificação de Interleucina-4 (IL-4)

Os níveis médios de IL-4 foram superiores no fígado, quando comparado com o baço, tanto do grupo de cães assintomáticos como no grupo de cães sintomáticos ( $p < 0,05$ ). Os valores médios obtidos no baço e no fígado dos cães assintomáticos não mostraram diferença quando comparado com o grupo de cães sintomáticos. Os valores médios obtidos para os cães infectados, assintomáticos e sintomáticos, tanto no baço quanto no fígado, foram maiores ( $p < 0,05$ ) que aqueles obtidos nos cães saudáveis (Figura 2).

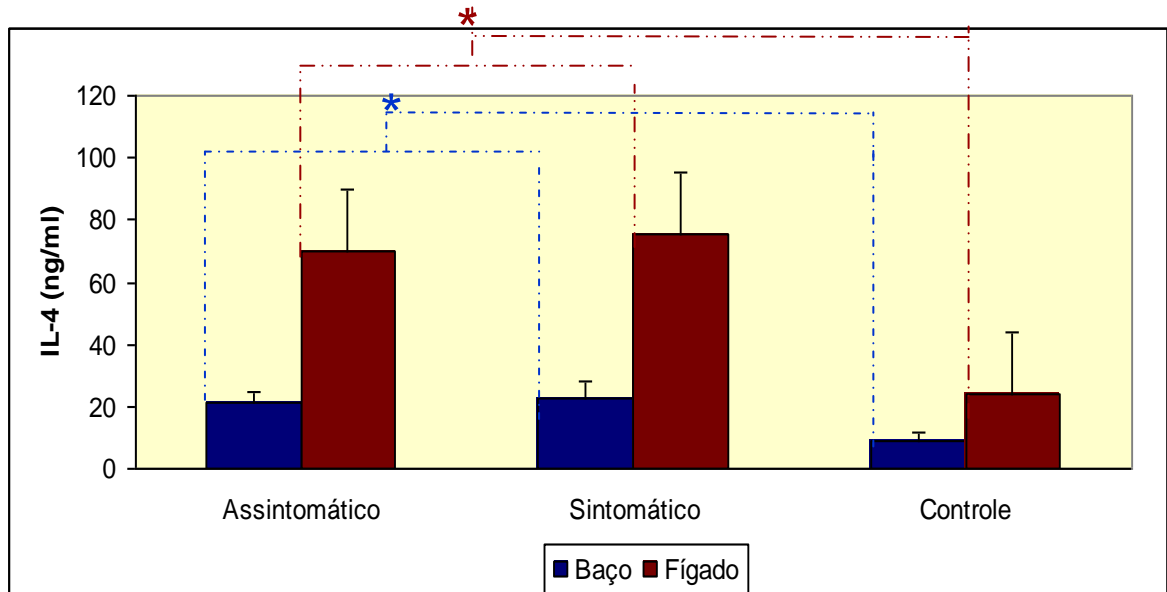


Figura 2. Quantificação de IL-4, através de ELISA de captura, em extrato de baço e fígado de cães assintomáticos (n=20) e sintomáticos (n=20), naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* e de cães saudáveis (n=12) (\*  $p < 0,05$ , teste de Tukey).

### 5.3 Quantificação de Interleucina-10 (IL-10)

Os níveis médios de IL-10 foram superiores no fígado, quando comparado com o baço, tanto no grupo de cães assintomáticos quanto no grupo de cães sintomáticos ( $p < 0,05$ ). Os valores médios obtidos no baço e no fígado dos cães assintomáticos não mostraram diferença quando comparados com o grupo de cães assintomáticos. Os valores médios obtidos para os cães infectados, assintomáticos e sintomáticos, tanto no baço quanto no fígado, foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) que aqueles obtidos nos cães saudáveis (Figura 3).

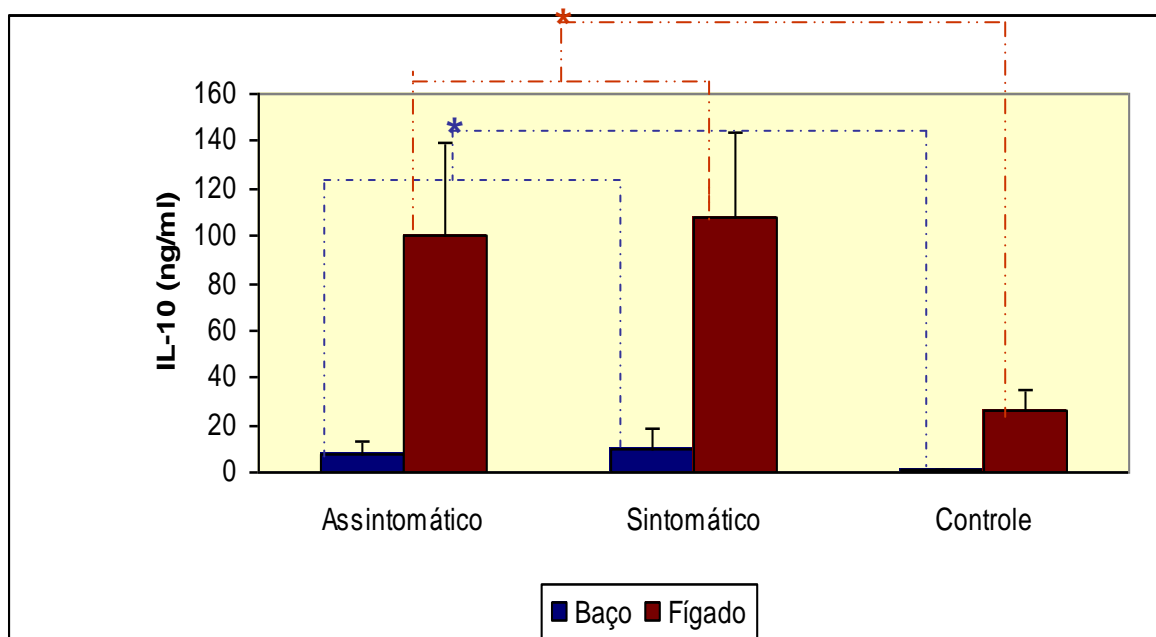


Figura 3. Quantificação de IL-10, através de ELISA de captura, em extrato de baço e fígado de cães assintomáticos (n=20) e sintomáticos (n=20), naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* e de cães saudáveis (n=12) (\*  $p < 0,05$ , teste de Tukey).

#### 5.4 Determinação da densidade parasitária

Os valores médios da densidade parasitária do baço, de cães assintomáticos e sintomáticos, foram superiores, quando comparados com os do fígado ( $p < 0,05$ ). O valor médio da densidade parasitária do baço de cães assintomáticos, não foi diferente quando comparado com o dos cães sintomáticos. Os cães sintomáticos apresentaram um maior valor médio de densidade parasitária no fígado ( $p < 0,05$ ), quando comparado com os assintomáticos (Figura 4).

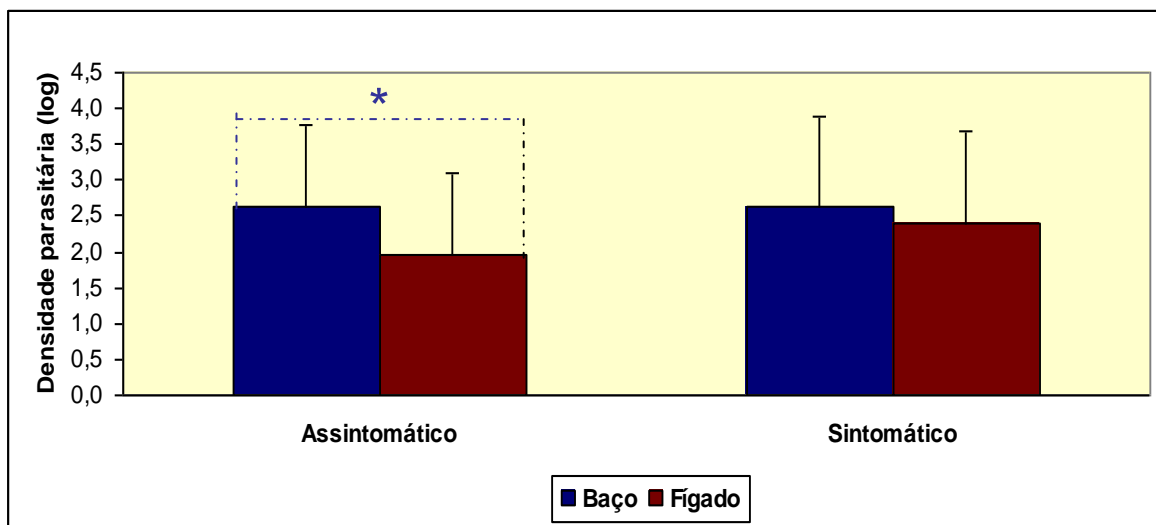


Figura 4. Densidade parasitária em DNA, através da PCR em tempo real, em fragmento de baço e fígado de cães assintomáticos (n=20) e sintomáticos (n=20) naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*. (\*  $p < 0,05$ , teste de Tukey).



### 5.5 Níveis de citocinas e densidade parasitária

Os níveis médios de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10) foram superiores no fígado, quando comparado com o baço, tanto no grupo de cães assintomáticos quanto no grupo de sintomáticos ( $p < 0,05$ ). No baço, os níveis médios destas citocinas não diferiram entre cães assintomáticos e sintomáticos, mas sim com os cães saudáveis. No fígado, foi verificada diferença entre os níveis médios de TNF- $\alpha$  produzidos pelos cães assintomáticos, sintomáticos e saudáveis ( $p < 0,05$ ). Para as demais citocinas, foi observada diferença apenas entre os cães infectados (assintomáticos e sintomáticos) e saudáveis ( $p < 0,05$ ). Os valores médios da densidade parasitária foram diferentes entre o baço e o fígado, tanto de cães assintomáticos como de sintomáticos ( $p < 0,05$ ). Também foi diferente entre o fígado de cães assintomáticos quando comparada com o dos sintomáticos ( $p < 0,05$ ). O fígado dos cães sintomáticos apresentou maior nível de TNF- $\alpha$  e também maior densidade parasitária, quando comparado com fígado dos cães assintomáticos ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1).

Tabela 1. Quantificação de TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10 em extrato de baço e fígado e densidade parasitária em DNA extraído desses órgãos de cães assintomáticos (n=20) e sintomáticos (n=20), naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* e de cães saudáveis (n=12).

Variável	Grupo	Órgão ( $\bar{x} \pm s$ )	
		Baço	Fígado
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	Assintomático	0,174 $\pm$ 0,073 aB	0,599 $\pm$ 0,237 bA
	Sintomático	0,183 $\pm$ 0,060 aB	0,763 $\pm$ 0,214 aA
	Controle	0,041 $\pm$ 0,013 bA	0,146 $\pm$ 0,040 cA
IL-4 (pg/ml)	Assintomático	21,014 $\pm$ 3,679 aB	69,769 $\pm$ 16,894 aA
	Sintomático	22,319 $\pm$ 6,009 aB	75,474 $\pm$ 23,283 aA
	Controle	8,811 $\pm$ 2,637 bB	23,851 $\pm$ 7,472 bA
IL-10 (pg/ml)	Assintomático	7,178 $\pm$ 5,897 aB	99,774 $\pm$ 39,336 aA
	Sintomático	9,584 $\pm$ 8,789 aB	107,532 $\pm$ 35,742 aA
	Controle	0,723 $\pm$ 0,488 bB	26,059 $\pm$ 9,152 bA
Dens. parasitas (log)	Assintomático	2,633 $\pm$ 1,138 aA	1,950 $\pm$ 1,150 bB
	Sintomático	2,644 $\pm$ 1,242 aA	2,383 $\pm$ 1,288 aB

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## 5.6 Correlação entre os níveis das citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10) e a densidade parasitária através da determinação do coeficiente de correlação linear de Pearson

A análise da correlação mostrou que nos cães sintomáticos houve uma correlação linear positiva fraca entre o nível médio de TNF- $\alpha$  no baço com o valor médio da densidade parasitária neste órgão. Para os cães assintomáticos também houve uma correlação linear positiva entre o nível médio de IL-10 no fígado e o valor médio da carga parasitária média nesse órgão ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1).

Tabela 2. Correlação entre a concentração de TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 e densidade parasitária obtida no baço e fígado em cães assintomáticos (n=20) e sintomáticos (n=20), naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*

Variável	Grupo	Órgão (R)	
		Baço	Fígado
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	Assintomático	-0,361	-0,075
	Sintomático	0,353	-0,231
IL-4 (pg/ml)	Assintomático	-0,188	0,098
	Sintomático	-0,090	-0,100
IL-10 (pg/ml)	Assintomático	0,204	0,448*
	Sintomático	0,011	0,091

\*  $p < 0,05$

### 5.7 Análise da densidade parasitária do baço e do fígado de cães assintomáticos, através da determinação do coeficiente de correlação linear de Pearson

A análise da densidade parasitária mostrou que existe uma forte correlação linear positiva entre o baço e o fígado no grupo dos cães assintomáticos ( $r=0,93553$ ). O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) mostrou que para cada unidade de parasita no baço tem-se o aumento de 0,8752 no fígado (Figura 5).

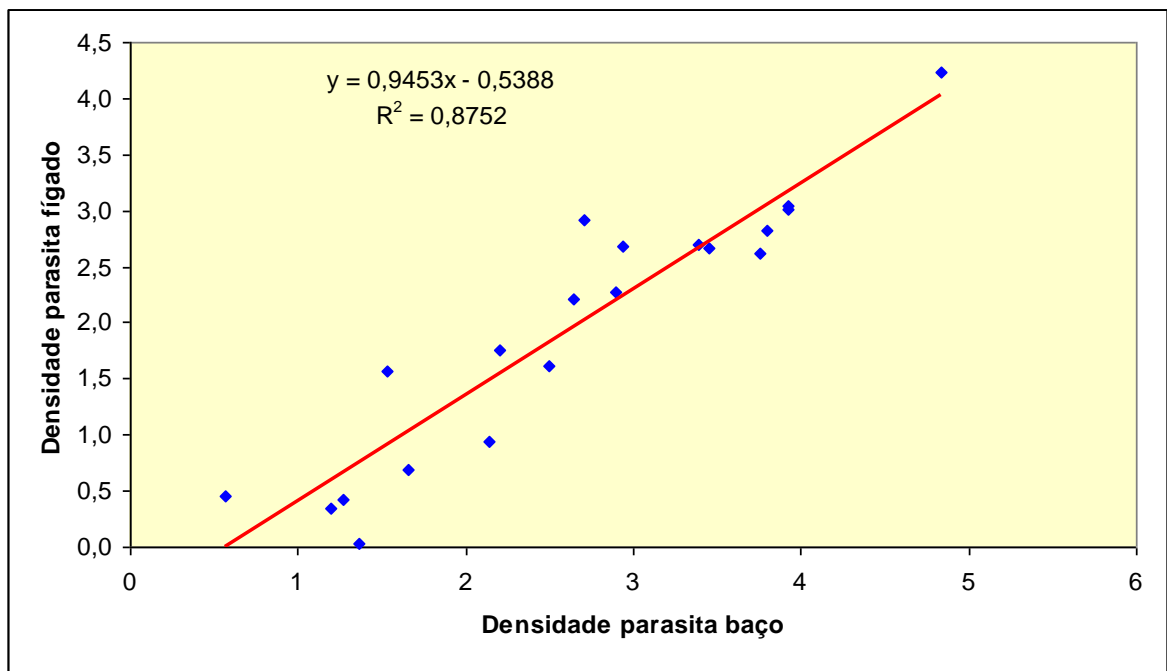


Figura 5. Correlação entre densidade parasitária em DNA extraído de fragmento do baço e do fígado de cães assintomáticos ( $n=20$ ), naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*. Forte correlação linear positiva ( $r=0,93$ ) e significativa entre baço e fígado ( $p<0,05$ )

## 5.8 Análise da densidade parasitária do baço e do fígado de cães sintomáticos, através da determinação do coeficiente de correlação linear de Pearson

A análise da densidade parasitária mostrou que existe uma forte correlação linear positiva entre o baço e o fígado no grupo dos cães sintomáticos ( $r=0,94686$ ). O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) mostrou que para cada unidade de parasita no baço tem-se o aumento de 0,8966 no fígado (Figura 6).

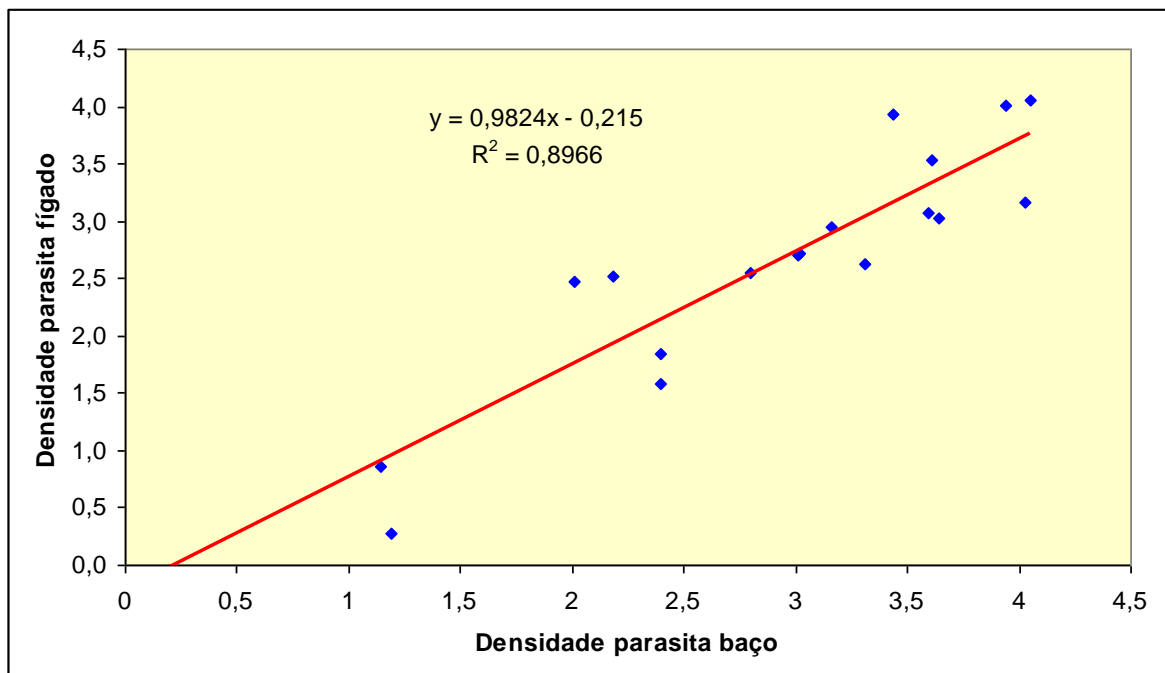


Figura 6. Correlação entre carga parasitária em DNA extraído de fragmento do baço e do fígado de cães sintomáticos ( $n=20$ ), naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*. Forte correlação linear positiva ( $r=0,95$ ) e significativa entre baço e fígado ( $p<0,05$ )

## VI DISCUSSÃO

Os estudos das infecções por *Leishmania* spp. colocam em destaque o importante papel regulatório desempenhado pelo sistema imune do hospedeiro, tanto no estabelecimento do processo infeccioso, como no desenvolvimento do quadro clínico. Contudo, não estão claramente definidos quais e como os mediadores químicos, em especial as citocinas, participam deste processo em cães. Até o presente momento, tem-se verificado que os estudos relativos à leishmaniose visceral (LV) são desenvolvidos principalmente em humanos e em alguns modelos animais, sendo o modelo canino pouco utilizado. O presente estudo, realizado em área endêmica para leishmaniose visceral canina (LVC), investigou a produção de citocinas no baço e fígado de cães naturalmente infectados, considerando a importância desses órgãos nesse processo infeccioso e patológico, como também na resposta imune do hospedeiro.

Os níveis de TNF- $\alpha$  no baço e no fígado foram superiores no grupo dos cães infectados, quando comparado com o grupo de cães saudáveis. Os níveis mais expressivos nos cães infectados denotam que a presença de *L. (L.) chagasi* induz resposta imune com produção expressiva de TNF- $\alpha$ . A produção de TNF- $\alpha$  por células T específicas para *L. (L.) infantum* é capaz de estimular a atividade leishmanicida de macrófagos caninos infectados (PINELLI et al., 1994; PINELLI, 2000). Ratificando que o TNF- $\alpha$  é produzido na presença desse protozoário, Carrillo et al. (2007) mostraram que, em leucócitos mononucleares de sangue periférico de cães assintomáticos infectados por *L. (L.) chagasi* e estimulados com antígeno solúvel de leishmania (SLA), houve aumento na expressão gênica de TNF- $\alpha$  e de IFN- $\gamma$ . Nos cães infectados, tanto assintomáticos como sintomáticos, os teores de TNF- $\alpha$  verificados no fígado foram superiores, quando comparado com o baço desses mesmos animais. Este resultado é semelhante àquele obtido em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) donovani* em que o nível de TNF- $\alpha$  hepático também foi superior ao esplênico (MUKHERJEE et al., 2003).

Em nosso estudo foi verificado que o nível de TNF- $\alpha$  foi maior no fígado dos cães sintomáticos do que no dos assintomáticos. O aumento de TNF- $\alpha$  hepático pode estar associado com o aumento da densidade de parasitas observada neste órgão. Considera-se que os sintomas clínicos decorrentes de danos hepáticos guardam uma associação com a frequência do parasitismo neste órgão, em cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* (GIUNCHETTI et al., 2008). Desta forma, os efeitos citotóxicos desencadeados pelos macrófagos, para a destruição dos parasitas intracelulares, podem estar diretamente associados com o dano no fígado, conforme observado em co-cultura de hepatócitos e macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados por *L. (L.) chagasi* (DIAS COSTA et al., 2007). Durante a infecção por *Leishmania*, o TNF- $\alpha$  produzido por macrófagos é capaz de induzir a produção de compostos intermediários do oxigênio e do nitrogênio (MURRAY; NATHAN, 1999). O óxido nítrico (NO) atua como uma molécula regulatória, desencadeando não apenas uma atividade microbicida (BRUNET, 2001), mas também é capaz de mediar danos teciduais, pois está correlacionado com a produção de transaminases e lactato desidrogenase, enzimas indicadoras de disfunção hepática (DIAS COSTA et al., 2007).

A ocorrência de menor nível de TNF- $\alpha$  no fígado de cães assintomáticos está, possivelmente, relacionada com o papel protetor desta citocina uma vez que estes cães também apresentaram menor carga parasitária no fígado, quando comparado com o baço. Também, deve-se considerar que no início do processo infeccioso TNF- $\alpha$  induz a ativação dos macrófagos, que controlam o crescimento dos parasitas (DIAS COSTA et al., 2007).

Não foi observada diferença nos níveis de TNF- $\alpha$ , quando foi comparado o baço dos cães assintomáticos com o dos sintomáticos. Esse fato deve-se, possivelmente, à capacidade que o baço apresenta de expressar altos níveis desta citocina, decorrentes da remodelação do tecido esplênico mediada pelo próprio TNF- $\alpha$ , quando há persistência do parasita neste órgão, conforme

observado em camundongos infectados por *L. (L.) donovani* (ENGWERDA et al., 1998). Estes resultados são semelhantes aos observados por Lage et al. (2007), que não verificaram diferenças ao analisar os níveis de TNF- $\alpha$  em células esplênicas de cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*.

Também, foi verificado neste estudo que o nível de TNF- $\alpha$ , no baço nos cães sintomáticos, apresentou uma fraca correlação linear positiva com o valor da carga parasitária neste órgão, enquanto que uma fraca correlação linear negativa foi observada nos cães assintomáticos. Isto sugere que a produção de TNF- $\alpha$  deve acompanhar a elevação do número de parasitas no baço dos animais sintomáticos, enquanto que nos assintomáticos ocorre o inverso. Portanto, o nível desta citocina no baço pode estar participando do processo regulatório da carga parasitária e conseqüentemente da evolução clínica da infecção.

De maneira semelhante ao TNF- $\alpha$ , o presente estudo mostrou maiores níveis de IL-4 no baço e no fígado dos cães infectados quando comparado com os cães não infectados. Resultados semelhantes foram observados em cães experimentalmente infectados com *L. (L.) infantum* e oligoassintomáticos, quando comparado com os cães não infectados (STRAUSS-AYALI et al., 2007). Também, Lage et al. (2007) encontraram maiores níveis de expressão de IL-4 em esplenócitos de cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, quando comparado com os não infectados.

O elevado nível de IL-4 observado no baço dos cães infectados, quando comparado com o grupo de cães saudáveis, mostra que esta citocina exerce importante papel nesse processo infeccioso. A persistência do parasita no baço de cães infectados por *L. (L.) infantum* pode estar relacionada à presença de altos níveis de IL-4 (STRAUSS-AYALI et al., 2007). Um recente estudo, desenvolvido com células mononucleares do sangue periférico de cães experimentalmente infectados por *L. (L.) infantum*, sugere que a ausência de expressão de IL-4, conjuntamente com IL-13, no início do processo infeccioso, pode contribuir para retardar a multiplicação do parasita (SANCHEZ-ROBERT et al., 2008).



O nível de IL-4, de maneira semelhante ao TNF- $\alpha$ , foi superior no fígado quando comparado com o baço, em ambos os grupos de cães infectados. Este resultado, contudo difere de outros presentes na literatura. Estudos realizados com camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) donovani* (MUKHERJEE et al., 2003; ROLÃO et al., 2007), mostraram que o nível de IL-4 esplênico foi superior ao hepático durante o curso da infecção. A discordância entre os resultados pode ser atribuída à diferença de modelo animal estudado e ao fato dos cães do presente estudo serem naturalmente infectados e, portanto se desconhecer o período da infecção.

Na avaliação dos teores de IL-4, no baço e no fígado de cães infectados, assintomáticos e sintomáticos, não foi possível estabelecer diferença entre esses dois grupos. Resultados semelhantes foram observados no baço por LAGE et al. (2007). Ainda, o estudo dessa citocina no sangue periférico, não mostrou diferença entre cães assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*, (MANNA et al., 2006).

A ausência de associação entre o teor de IL-4 no baço e o *status* clínico dos cães sugere que esta citocina tem papel relevante na instalação da infecção e não propriamente com o desenvolvimento clínico da LVC (STRAUSS-AYALI et al., 2007).

Semelhante ao TNF- $\alpha$  e IL-4, o presente estudo mostrou que foram obtidos maiores níveis de IL-10 no baço e no fígado dos cães infectados, quando comparado com o dos cães não infectados. Estes resultados são semelhantes aos observados por ALVES et al., (2008) em estudo realizado com cães infectados naturalmente por *L. (L.) chagasi*. Estudos em humanos e camundongos tem associado a suscetibilidade à infecção com a elevação dos níveis de IL-10 e TGF- $\beta$  (KANE; MOSSER, 2001; TRINCHIERI, 2007).

Os níveis de IL-10 foram superiores no fígado, quando comparados com o baço, em ambos os grupos de cães infectados estudados, apresentando uma fraca correlação linear positiva com a densidade parasitária do fígado em cães assintomáticos.

Estudos realizados com camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) donovani* (MUKHERJEE et al., 2003; ROLÃO et al., 2007) mostraram que o nível de IL-10 no fígado também foi superior ao baço durante o curso da infecção. Elevada produção de IL-10 e TGF- $\beta$  também foi observada no fígado e baço de cães, sintomáticos e assintomáticos, infectados por *L. (L.) chagasi* (CORREA et al., 2007).

O baço e o fígado são importantes sítios de persistência do parasita em cães infectados, assintomáticos e sintomáticos. Contudo, o baço apresentou uma densidade parasitária mais elevada, quando comparada com o fígado, mostrando que o baço, juntamente com a pele, é um dos sítios com maior densidade parasitária durante o curso da doença (REIS et al., 2009). Também, pode-se verificar neste estudo uma forte correlação positiva entre a carga parasitária presente no baço e no fígado, para esses dois grupos de cães. De maneira semelhante, uma correlação linear positiva entre a carga parasitária do baço e do fígado foi observada em camundongos experimentalmente infectados por *L. (L.) donovani* (MUKHERJEE et al., 2003) e por *L. (L.) infantum* (ROLÃO et al., 2007).

O fígado de cães sintomáticos apresentou maior densidade parasitária, quando comparado com o dos cães assintomáticos. Tal diferença pode estar relacionada não só com o nível de TNF- $\alpha$ , mas também com as características fisiopatológicas deste órgão. A ocorrência de fibrose intralobular no fígado de animais sintomáticos pode contribuir para a elevação da carga parasitária, conforme verificado através da marcação do parasita em análise imunohistoquímica, associada a análise histomorfométrica (MELO et al., 2008). O fígado pode ser um dos órgãos que reflete uma relação positiva entre a densidade de *L. (L.) chagasi* e as manifestações clínicas em cães (GIUNCHETTI et al., 2008). Além do fígado, os linfonodos, em cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*, podem ter uma relação positiva entre a densidade de parasita e as manifestações clínicas mais severas (MANNA et al., 2009).

Os resultados obtidos indicam que o TNF- $\alpha$  desempenha um importante papel na patogênese da LVC, especialmente no fígado. A associação entre o nível

de TNF- $\alpha$ , em conjunto com o aumento da densidade parasitária é um importante indicador da evolução clínica dessa doença em cães, e aponta o fígado como um dos sítios que apresenta relação positiva entre a densidade parasitária e a doença. Também, o aumento do nível de TNF- $\alpha$  IL-4 e IL-10 em cães infectados atribuem a estas citocinas um importante papel na patogênese da LV.

Ademais, os resultados indicam a ocorrência de compartimentalização tanto da resposta imune, como dos parasitas em cães infectados por *L. (L.) chagasi*.

Tais resultados podem contribuir para um melhor entendimento da resposta imune em cães infectados por *L. (L.) chagasi*, o que pode auxiliar no desenvolvimento de medidas profiláticas e/ou curativas para estes animais. Desta forma, acredita-se que o benefício a ser proporcionado à população canina terá reflexos positivos para a população humana, uma vez que no ambiente doméstico o cão é o principal reservatório para esse parasita.

## VII CONCLUSÕES

A partir da análise dos teores das citocinas, TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10, em extratos de baço e de fígado de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* e da densidade parasitária nestes órgãos pode-se concluir que:

Essas citocinas são importantes mediadores na resposta imune dos cães infectados por *L. (L.) chagasi*, sendo que IL-4 e IL-10 parecem não ter relação com as manifestações clínicas da leishmaniose visceral canina.

O baço e o fígado são sítios de permanência do parasita na leishmaniose visceral canina, sendo que o fígado apresenta relação positiva entre densidade parasitária e manifestações clínicas.

Outrossim, tanto a produção dessas citocinas como a presença do parasita no cão se mostram compartimentalizadas.

## VIII REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; MURPHY, K.M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v. 383, n. 6603, p. 787-793, 1996.

ABRANCHES, P.; SANTOS-GOMES, G.; RACHAMIM, N.; CAMPINO, L.; SCHNUR, L.F.; JAFFE, C.L. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 13, n. 5, p. 537-550, 1991.

ACEDO-SÁNCHEZ, C.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F.; SANCHÍZ-MARÍN, M.C.; MATÍN-SANCHEZ, J. Changes in antibody titres against *Leishmania infantum* in naturally infected dogs in southern Spain. **Vet. Parasitol.**, v. 75, n. 1, p. 1-8, 1998.

AKIRA, S. The role of IL-18 in innate immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 12, n. 1, p. 59-63, 2000.

ALEXANDER, J.; CARTER, K.C.; AL-FASI, N.; SATOSKAR, A.; BROMBACHER, F. Endogenous IL-4 is necessary for effective drug therapy against visceral leishmaniasis. **Eur. J. Immunol.**, v. 30, n. 10, p. 2935-2943, 2000.

ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunol. Letters**, v. 99, n. 1, p. 17-23, 2005

ALEXANDER, J.; MCFARLANE, E. Can type-1 responses against intracellular pathogens be T helper 2 cytokine dependent? **Microbes Infect.**, v. 10, n. 9, p. 953-959, 2008.

ALMEIDA, M.A.O.; JESUS, E.E.V.; SOUSA-ATTA, M.L.B.; ALVES, L.C.; BERNE, M.E.A.; ATTA, A.M. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with

*Leishmania chagasi*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 106, n. 1-2, p. 151-158, 2005.

ALVAR, J.; CAÑAVETE, C.; MOLINA, R.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 57, p. 1-88, 2004.

ALVES, C.F.; AMORIM, I.F.G.; MOURA, E.P.; RIBEIRO, R.R.; ALVES, C.F.; MICHALICK, M.S.; KALAPOTHAKIS, E.; BRUNA-ROMERO, O.; TAFURI, W.L.; TEIXEIRA, M.M.; MELO, M.N. Expression of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 and TGF- $\beta$  in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet. Immun. Immunopathol.**, v. 128, n. 4, p. 349-358, 2008.

AMELA, C.; MENDEZ, I.; TORCAL, J.M.; MEDINA, G.; PACHÓN, I.; CANAVATE, C.; ALVAR, J. Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 11, n. 2, p. 157-161, 1995.

ANDRADE, H.M.; DE TOLEDO, V.P.; MARQUES, M.J.; FRANÇA SILVA, J.C.; TAFURI, W.L.; MAYRINK, W.; GENARO, O. *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 103, n. 1-2, p. 71-81, 2002.

ANSARI, N.A.; SALUJA, S.; SALOTRA, P. Elevated levels of interferon- $\gamma$ , interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. **Clin. Immunol.**, v. 119, n. 3, p. 339-345, 2006.

ARGYLE, D.J.; MCGILLIVERY, C.; NICOLSON, L., ONIONS, D.E. Cloning, sequencing and characterization of dog Interleukin-18. **Immunogenetics**, v. 49, n. 6, p. 541-543, 1999.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, n. 12-30, p. 1269-1281, 2000.

ATTA, A.M.; D'OLIVEIRA JR, A.; CORREA, J.; ATTA, M.L.B.; ALMEIDA, R.P.; CARVALHO, E.M. Anti-leishmanial IgE antibodies: a marker of active disease in visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, n. 3, p. 426-430, 1998.

BACELLAR, O.; BRODSKY, C.; GUERREIRO, J.; BARRAL-NETO, M.; COSTA, C.H.; COFFMAN, R.L.; JOHNSON, W.D.; CARVALHO, E.M. Interleukin-12 restores interferon-gamma production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 173, n. 6, p. 1515-1518, 1996.

BACELLAR, O.; D'OLIVEIRA JR, A.; JERÔNIMO, S.; CARVALHO, E.M. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 12, n. 8, p. 1228-1231, 2000.

BADARÓ, R.; JONES, T.C.; CARVALHO, E.M.; SAMPAIO, D.; REED, S.G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W.D.JR. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 154, n. 6, p. 1003-1011, 1986.

BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; YONG, E.C.; BROWNELL, C.E.; TWARDZIK, D.R.; Reed, S.G., Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 90, n. 8, p. 3442-3446, 1993.

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; SANTOS, S.B.; CARVALHO, E.M.; BADARO, R.; ROCHA, H.; REED, S.G.; JOHNSON, W.D.JR. Soluble IL12 receptor as an agent of serum-mediated suppression in human visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 147, n. 1, p. 281-284, 1991.

BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin--tumour necrosis factor: a cytokine that mediates injury initiated by invasive parasites. **Parasitol Today**, v. 3, n. 11, p. 345-346, 1987.

BEUTLER, B.; GRAU, G.E. Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. **Crit. Care Med.**, v. 21, n. 10, p. 423-425, 1993.

BEVILACQUA, P.D.; PAIXÃO, H.H.; MODENA, C.M.; CASTRO, M.C.P.S. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 53, n. 1, p. 1-8, 2001.

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; MAGNOL, J.P.; SAINT-ANDRE, I.; CHABANNE, L. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 56, n. 3-4, p. 345-351, 1997.

BRANDONISIO, O.; CARELLI, G.; CECI, L.; CONSENTI, B.; FASANELLA, A.; PUCCINI, V. Canine leishmaniasis in the Gargano promontory (Apulia, South Italy). **Eur. J. Epidemiol.**, v. 8, n. 2, p. 273-276, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2004. 120p.

BRETAGNE, S.; DURAND, R.; OLIVI, M.; GARIN, J-F.; SULAHIAN, A.; RIVOLLET, D.; VIDAUD, M.; DENIAU, M. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. **Clin. Diag. Labor. Immunol.**, v. 8, n.4, p. 828-831, 2001



BRODSKYN, C.; DE OLIVEIRA, C.I.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Vaccines in leishmaniasis : advances in the last five years. **Expert. Rev. Vaccines**. v. 2, n. 5, p. 705-717, 2003.

BRUNET, L.R. Nitric oxide in parasitic infections. **Int. Immunopharmacol.**, v. 1, n. 8, p. 1457-1467, 2001.

CAMARGO-NEVES. A leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo: situação atual. **Bol. Epidem. Paul.**, v. 4, n. 48, p. 12-14, 2007.

CARDOSO, L.; NETO, F.; SOUSA, J.C.; RODRIGUES, M.; CABRAL, M. Use of leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. **Vet. Parasitol.**, v. 79, n. 3, p. 213-220, 1998.

CARRILLO, E.; AHMED, S.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; NIETO, J.; OSORIO, Y.; TRAVI, B.; MORENO, J.; MCMAHON-PRATT, D. Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 25, n. 8, p. 1534-1543, 2007.

CARSON, W.E.; ROSS, M.E.; BAIOCCHI, R.A.; MARIEN, M.J.; BOANI, N.; GRABSTEIN, K.; CALIGIURU, M.A. Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro. **J. Clin. Invest.**, v. 96, n. 6, p. 2578-2582, 1995.

CARVALHO, E.M.; BADARÓ, R.; REED, S.G.; JONES, T.C.; JOHNSON, W.D. JR. Absence of gamma interferon and interleucina-2 production during active visceral leishmaniasis. **J. Clin. Invest.**, v. 76, n.6, p. 2066-2069, 1985.

CARVALHO, E.M.; SAMPAIO, D.; BACELLAR, O.; BARRAL, A.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M. Immunoregulation in American visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 1, p. 368-371, 1988.

CHAGAS, E.; CUNHA, A.M.; FERREIRA, L.C.; DEANE, L.; DEANE, G.; GUIMARÃES, F.N.; PAUMGARTTEN, M.J.; SÁ, B. Leishmaniose visceral americana (relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da leishmaniose visceral americana em 1937). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 33, p. 189-229, 1938.

CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 103, n. 1-2, p. 67-75, 2005.

CHANNON, J.Y.; ROBERTS, M.B.; BLACKWELL, J.M. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. **Immunology**, v. 53, n. 2, p. 345-355, 1984.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R.D.; GRANDONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Rec.**, v. 141, n. 21, p. 539-543, 1997.

CILLARI, E.; VITALE, G.; ARCOLEO, F.; D'AGOSTINO, P.; MOCCIARO, C.; GAMBINO, G.; MALTA, R.; STASSI, G.; GIORDANO C.; MILANO, S.; MANSUETO, S. In vivo and in vitro cytokine profiles and mononuclear cell subsets in Sicilian patients with active visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 7, n. 7, p. 740-745, 1995.

COBBOLD, S.; METCALFE, S. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW). **Tissue Antigens**, v. 43, n. 3, p. 137-154, 1994.

CORRÊA, A.P.F.L.; DOSSI, A.C.S.; VASCONCELOS, R.O.; MUNARI, D.P.; LIMA, V.M.F. Evaluation of transformation growth factor  $\beta$ 1, interleukin-10, and interferon- $\gamma$  in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet. Parasitol.**, v. 143, n. 3-4, p. 267-274, 2007.

COSTA, C.H.; PEREIRA, H.F.; ARAÚJO, M.V. Visceral leishmaniasis epidemic in the State of Piauí, Brazil, 1980-1986. **Rev. Saúde Pública**, v. 24, n. 5, p. 361-372, 1990.

COUTINHO, M.T.; BUENO, L.L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R.T.; BOTELHO, J.R.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 128, n. 1-2, p. 149-155, 2005.

COUTINHO, M.T.; LINARDI, P.M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Vet. Parasitol.** v. 147, n. 3-4, p. 320-325, 2007.

DAHER, E.F.; FONSECA, P.P.; GERHARD, E.S.; SILVA LEITÃO, T.M.; SILVA JÚNIOR, G.B. Clinical and epidemiological features of visceral leishmaniasis and HIV co-infection in fifteen patients from Brazil. **J. Parasitol.**, v. 95, n. 3, p. 652-655, 2009.

DANTAS-TORRES, F. Current epidemiological status of visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil. **Rev. Saude Publica**, v. 40, n. 3, p. 537-541, 2006.

DE LUNA, R.; VUOTTO, M.L.; IELPO, M.T.; AMBROSIO, R.; PIANTEDOSI, D.; MOSCATIELLO, V.; CIARAMELLA, P.; SCALONE, A.; GRADONI, L.; MANCINO, D. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 70, n. 1-2, p. 95-103, 1999.

DEROUICH-GUERGOUR, D.; PELLOUX, H.; ADELBERT, D.; DEMENGE, P.; AMBROISE-THOMAS, P. Evidence for tumor necrosis factor receptors (TNFRs) in human MRC5 fibroblast cells. *Eur. Cytokine Netw.*, v. 12, n. 1, p. 147-153, 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DEVOS, K.; DUERINCK, E.; VAN AUDENHOVE, K.; FIERS, W. Cloning and expression of the canine interferon-gamma gene. **J. Interferon Res.**, v. 12, n. 2, p. 95-101, 1992.

DIAS COSTA, J.D.; MEIRELLES, M.N.; VELLOSO, C.E.P.; PORROZZI, R. *Leishmania chagasi* : cytotoxic effect of infected macrophages on parenchymal liver cells. **Exp. Parasitol.**, v. 117, n. 4, p. 390-398, 2007.

EIGLER, A.; MOELLER, J.; ENDRES, S. Exogenous and endogenous nitric oxide attenuates tumor necrosis factor synthesis in the murine macrophage cell line RAW 264-7. **J. Immunol.**, v. 154, n. 8, p. 4048-4054, 1995.

ENGWERDA, C.R.; SMELT, S.C.; KAYE, P.M. An in vivo analysis of cytokine production during *Leishmania donovani* infection in scid mice. *Exp. Parasitol.*, v. 84, n. 2, p. 195-202, 1996.

ENGWERDA, C.R.; MURPHY, M.L.; COTTERELL, S.E., SMELT, S.C., KAYE, P.M. Neutralization of IL-12 demonstrates the existence of discrete organ-specific phases in the control of *Leishmania donovani*. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, n. 2, p. 669-680, 1998.

ENGWERDA, C., KAYE, P.M. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. **Immunol. Today**, v. 21, n. 2, p. 73-78, 2000.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clin. Vet.**, v. V, n. 28, p. 36-44, 2000.

FERREIRA, M.G.; FATTORI, K.R.; SOUZA, F.; LIMA, V.M. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Vet. Parasitol.**, v. [Epub ahead of print], 2009.

FERRER, L.; RABANAL, R.; FONDEVILA, D.; RAMOS, J.A.; DOMINGO, M. Skin lesions in canine leishmaniasis. **J. Small Anim. Pract.**, v. 29, p. 381-388, 1988.

FERRER, L. Canine leishmaniasis in Spain: data for the clinician. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 7, n. 6, p. 293-295, 1989.

FISA, R.; GÁLLEGO, M.; CASTILLEJO, S.; AISA, M.J.; SERRA, T.; RIERA, C.; CARRIÓ, J.; GÁLLEGO, J.; PORTÚS, M. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example the Priorat focus. **Vet. Parasitol.**, v. 83, n. 2, p. 87-97, 1999.

FRANCINO, O.; ALTET, L., SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, A.; ROURA, X.

Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v.137, n. 3-4, p. 214-221, 2006.

GAMA, M.E.A.; COSTA, J.M.L.; PEREIRA, J.C.R.; GOMES, C.M.C.; CORBETT, C.E.P. Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n. 1, p. 129-136, 2004.

GANGNEUX, J.P.; SULAHIAN, A.; HONORÉ, S.; MENECEUR, P., DEROUIN, F.; GARIN, Y.J. Evidence for determining parasitic factors in addition to host genetics and immune status in the outcome of murine *Leishmania infantum* visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 22, n. 10, p. 515-519, 2000.

GHOSH, A.K.; DASGUPTA, S.; GHOSE, A.C. Immunoglobulin G subclass-specific antileishmanial antibody responses in Indian kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 2, n. 3, p. 291-296, 1995.

GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; CARNEIRO, C.M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; REIS, A.B. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. **Res. Vet. Sci.**, v. 84, n. 2, p. 269-277, 2008.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GRADONI, L.; POZIO, E.; BETTINI, S.; GRAMICCIA, M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy). (III) The prevalence of canine leishmaniasis in two foci of Grosseto Province. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 74, n. 3, p. 421-422, 1980.

HAILU, A.; VAN DER POLL, T.; BERHE, N.; KAGER, P.A. Elevated plasma levels of interferon (IFN)- $\gamma$ , IFN- $\gamma$  inducing cytokines, and IFN- $\gamma$  inducible CXC chemokines in visceral leishmaniasis. **Am J. Trop. Med. Hyg.**, v. 71, n. 5, p. 561-567, 2004

HAILU, A.; VAN BAARLE, D.; KNOL, G.J.; BERHE, N.; MIEDEMA, F.; KAGER, P.A. T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. **Clin. Immunol.** v. 117, n. 2, p. 182-191, 2005.

HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. **Genome Res.**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ, S.R.; GÓMEZ-NIETO, C.; MARTINEZ-GÓMEZ, F.; GUTIÉRREZ-PALOMINO, P. Aspectos clínicos de la leishmaniasis canina. **Rev. Ibérica Parasitol.**, v. extraordinario, p. 61-66, 1987.

HOLLAND, P.M.; ABRAMSON, R.D.; WATSON, R.; GELFAND, D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, n. 16, 7276-7280, 1991.

HOLZMULLER, P.; CAVALEYRA, M.; MOREAUX, J.; KOVACIC, R.; VINCENDEAU, P.; PAPIEROK, G.; LEMESRE, J.L. Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. **Vet. Immunol. Immunophatol.**, v. 106, n. 3-4, p. 247-257, 2005.

HOMMEL, M.; JAFFE, C.L.; TRAVI, B.; MILON, G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 89, n. 1, p. 55-73, 1995.

HONORÉ, S.; GARIN, Y.J.; SULAHIAN, A.; GANGNEUX, J.P.; DEROUIN, F. Influence of the host and parasite strain in a mouse model of visceral *Leishmania infantum* infection. **FEMS Immunol. Med. Parasitol.**, v. 21, n. 3, p. 231-239, 1998.

IKONOMOPOULOS, J.; KOKOTAS, S.; GAZOULI, M.; ZAVRAS, A.; STOITSIOU, M.; GORGOULIS, V.G. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Vet. Parasitol.**, v. 113, n. 2, p. 99-113, 2003.

ÍÑIGUEZ, S.R.; DEA-AYUELA, M.A.; SANCHEZ-BRUNETE, J.A.; TORRADO, J.J.; ALUNDA, J.M.; BOLAS-FERNÁNDEZ, F. Real-time reverse transcription-PCR quantification of cytokine mRNA expression in golden Syrian hamster infected with *Leishmania infantum* and treated with a new amphotericin B formulation. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 4, p. 1195-1201, 2006.

KANE, M.M.; MOSSER, D.M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 166, n. 2, p. 1141-1147, 2001.

KATAKURA, K.; KAWAZU, S.I.; SANIYOBANAYA, C.; NAYA, T.; MATSUMOTO, Y.; ITO, M.; NAGAKURA, K.; AIKAWA, M.; HASHIGUCHI, Y. *Leishmania* mini-exon genes for molecular epidemiology of leishmaniasis in China and Ecuador. **Tokai J. Exp. Clin. Med.**, v. 23, n. 6, p. 393-399, 1998.

KAUSALYA, S.; MALLA, N.; GANGULY, N.K.; MAHAJAN, R.C. *Leishmania donovani*: in vitro evidence of hepatocyte damage by Kupffer cells and immigrant macrophages in a murine model. **Exp. Parasitol.**, v. 77, n. 3, p. 326-333, 1993.



KEENAN, C.M.; HENDRICKS, L.D.; LIGHTNER, L.; WEBSTER, H.K.; JOHNSON, A.J. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. infection, clinical disease, and clinical pathology. **Vet. Pathol.**, v. 21, n. 1, p. 24-29, 1984.

KNAPP, D.W.; WILLIAMS, J.S.; ANDRISANI, O.M. Cloning of the canine interleukin-2-encoding cDNA. **Gene**, v. 159, n. 2, p. 281-282, 1995.

LACHAUD, L.; MARCHERQUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DEREURE, J.; DEDET, J.P.; BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002.

LAGE, R.S.; OLIVEIRA, G.C.; BUSEK, S.U.; GUERRA, L.L.; GIUNCHETTI, R.C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A.B. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Vet. Immunol. Immunophatol.**, v. 115, n.1-2, p. 135-145, 2007.

LAGLER, H.; WILLHEIM, M.; TRAUNMÜLLER, F.; WAHL, K.; WINKLER, H.; RAMHARTER, M.; GRANINGER, W.; WINKLER, S. Cellular profile of cytokine production in a patient with visceral leishmaniasis:  $\gamma\delta^+$  T cells express both type 1 cytokines and Interleukin-10. **Scand. J. Immunol.** v. 57, n. 3, p. 291-295, 2003.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution: In: Peter, W E Killick-Kendrick R. (eds). The leishmaniasis in biology and medicine, vol.1, London, Academia Press, 1987.

LIMA, V.M.F.; GONÇALVES, M.E.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; FEITOSA, M.M. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, n. 4, p. 485-489, 2003.

LIMA, V.M.F.; PEIRO, J.R.; VACONCELOS, R.O. IL-6 and TNF- $\alpha$  production during active canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunophatol.**, v. 115, n. 1-2, p. 189-193, 2007.

LOCKSLEY, R.M.; SCOTT, P. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. **Immunol. Today**, v. 12, n. 3, p. 58-61, 1991

MAIA-ELKHOURY. N.; ALVES, W.A.; SOUSA-GOMES, M.L.; SENA, J.M.; LUNA, E.A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad. Saúde Pública*, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.

MALLA, N.; MAHAJAN, R.C. Pathophysiology of visceral leishmaniasis – some recent concepts. **Indian J. Med. Res.**, v. 123, n. 3, p. 267-274, 2006.

MANCIANTI, F.; MECIANI, N. Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis. **Am. J. Vet. Res.**, v. 49, n. 8, 1409-1411, 1986.

MANNA, L.; REALE, S.; VIOLA, E.; VITALE, F.; MANZILLO, V.F.; MICHELE, P.L.; CARACAPPA, S.; GRAVINO, A.E. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 142, n. 3-4, p. 271-280, 2006.

MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F.; GRAVINO, A.E. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Res. Vet. Sci.**, v. 87, n. 1, p. 76-78, 2009.

MARTÍNEZ-MORENO, A.; MORENO, T.; MARTÍNEZ-MORENO, F.J.; ACOSTA, I.; HERNÁNDEZ, S. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.** V. 46, n. 3-4, p. 209-220, 1995.

MARY, C.; FARAUT, F.; LASCOMBE, L.; DUMON, H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 11, p. 5249-5255, 2004

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Leishmanioses tegumentar e visceral no Brasil: antroponozoonoses emergentes e perspectivas de controle. **Cad. Saúde Pública**, v. 10, n. 2, p. 359-375, 1994.

MARZOCKI, M.C.; COUTINHO, S.G.; DE SOUSA, W.J.; DE TOLEDO, L.M.; GRIMALDI JÚNIOR, G.; MOMEM, H.; PACHECO, R.S.; SABROZA, P.C.; DE SOUZA, M.A.; RANGEL JÚNIOR, F.B.; TRAMONTANO, N.C. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 80, n. 3, p. 349-357, 1985.

MCFARLANE, E.; PEREZ, C.; CHARMOY, M.; ALLENBACH, C.; CARTER, K.C.; ALEXANDER, J.; TACCHINI-COTTIER, F. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 2, p. 532-541, 2008.

MELBY, P.C.; TRYON, V.V.; CHANDRASEKAR, B.; FREEMAN, G.L. Cloning of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) cytokine cDNAs and analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 5, p. 2135-2142, 1998.

MELO, F.; AMARAL, M.; OLIVEIRA, P.; LIMA, W.; ANDRADE, M.; MICHALICK, M.; RASO, P.; TAFURI, W.; TAFURI, W. Diffuse intralobular liver fibrosis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Am. J. Trop. Med Hyg.**, v. 79, n. 2, p. 198-204, 2008.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRÉS, M.; GONZÁLES, F.; CASTILHO, J.A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hvg.**, v. 88, n. 4, p. 491-493, 1994.

MOLYNEUX, D.H.; ASHFORD, R.W., 1983. The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, parasites of man and animals. London : Taylor & Francis.

MOORE, K.J.; MATIASHEWSKI, G. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. **J. Immunol.** , v. 152,n. 6, p. 2930-2937, 1994.

MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; GARCIA, J.F.; CORBETT, C.E.P.; LAURENTI, M.D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Vet. Parasitol.** v. 145, n. 3-4, p. 245-252, 2007.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **TRENDS Parasitol.**, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.

MORILLAS, F.; SANCHEZ RABASCO, F.; OCANÑA, J.; MARTIN-SANCHEZ, J.; OCANÑA-WIHELMI, J.; ACEDO, C.; SANCHIZ-MARIN, M.C. Leishmaniosis in the focus of the Axarquía region, Malaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector. **Parasitol. Res.**, v. 82, n. 6, p. 569-570, 1996.

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. **Immunol. Lett.**, v.86, n. 2, p.131-138, 2003.

MURRAY, H.W.; NATHAN, C.F. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. **J. Exp. Med.**, v. 189, n. 4, p. 741-746, 1999.

MURRAY, H.W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **Int. J. Exp. Path.**, v. 82, n. 5, p. 249-267, 2001.

MURRAY, H.W.; LU, C.M.; MAUZE, S.; FREEMAN, S.; MOREIRA, A.L.; KAPLAN, G.; COFFMAN, R.L. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. **Infec. Immun.**, v. 70, n. 11, p. 6284-6293, 2002.

NICOLAS, L., PRINA, E., LANG, T., MILON, G. Real-time PCR for detection and quantification of *Leishmania* in mouse tissues, **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 5, p. 1666-1669, 2002.

NOBLE, A., MACARY, P.A., KEMENY, D.M. IFN- $\gamma$  and IL-4 regulate the growth and differentiation of CD8<sup>+</sup> T cells into subpopulations with distinct cytokine profiles. **J. Immunol.**, v. 155, n. 6, p. 2928-2937, 1995.

OLIVEIRA, T.M.; MINEO, T.W.; BASON, M.; DAY, M.J.; MACHADO, R.Z. IgG subclass profile of serum antibodies to *Leishmania chagasi* in naturally infected and vaccinated dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 162, n. 1-2, p. 16-22, 2009.

OWENS, S.D.; OAKLEY, D.A.; MARRYOTT, K.; HATCHETT, W.; WALTON, R.; NOLAN, T.J.; NEWTON, A.; STEURER, F.; SCHANTZ, P.; GIGER, U.

Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 219, n. 8, p. 1076-1083, 2001.

PANARO, M.A.; ACQUAFREDDA, A.; LISI, A.; LOFRUMENTO, D.D.; MITOLO, V.; SISTO, M.; FASANELLA, A.; TROTTA, T.; BERTANI, F.; CONSENTI, B.; BRANDONÍSIO, O. Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 24, n. 3, p. 187-195, 2001.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V., MARTINS-FILHO, O.A., PRATA, A., SILVA, L.A., RABELLO, A., TEIXEIRA-CARVALHO, A., FIGUEIREDO, R.M., GUIMARÃES-CARVALHO, S.F., FERRARI, T.C.A., CORREA-OLIVEIRA, R. Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. **Scand. J. Immunol.**, v. 62, n. 5, p. 487-495, 2005.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V., MARTINS-FILHO, O.A., PRATA, A., SILVA, L.A., RABELLO, A., TEIXEIRA-CARVALHO, A., FIGUEIREDO, R.M., GUIMARÃES-CARVALHO, S.F., FERRARI, T.C.A., VAN WEYENBERGH, J., CORREA-OLIVEIRA, R. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon- $\gamma$  and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor- $\alpha^+$  monocytes are hallmarks of active human visceral leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 146, n. 1, p. 124-132, 2006.

PINELLI, E., KILLICK-KENDRICK, R., WAGENAAR, J., BERNARDINA, W., DEL REAL, G., RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994.

PINELLI, E.; GONZALO, R.M.; BOOG, C.J., RUTTEN, V.P.; GEBHARD, D.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, E.J. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, n. 6, p. 1594-1600, 1995.

PINELLI, E.; GEBHARD, D.; MOMMAAS, A.M.; VAN HOEIJ, M.; LANGERMANS, J.A.; RUITENBERG, E.J.; RUTTEN, V.P. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. **Vet. Parasitol.**, v. 92, n. 3, p. 181-189, 2000.

QUARESMA, P.F.; MURTA, S.M.; FERREIRA, E.C.; DA ROCHA LIMA, A.C.; XAVIER, A.A.; GONTIJO, C.M. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Trop.**, v. 111, n. 3, p. 289-294, 2009.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; SHAW, M.A.; DAY, M.J.; GARCEZ, L.M.; DYE, C.; KAYE, P.M. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 183, n. 9, p. 1421-1424, 2001.

RABANAL, R.M.; FERRER, L.; ELSE, R.W. Immunohistochemical detection of canine leucocyte antigens by specific monoclonal antibodies in canine normal tissues. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 47, n. 1-2, p. 13-23, 1995.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W.L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 128, n. 1-3, p. 87-95, 2009.

ROLÃO, N.; CORTES, S.; RODRIGUES, O.R.; CAMPINO, L.. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Parasitol.**, v. 90, n. 5, p. 1150-1154, 2004.

ROLÃO, N.; CORTES, S.; GOMES-PEREIRA, S.; CAMPINO, L. *Leishmania infantum*: mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. **Exp. Parasitol.**, v. 115, n. 3, p. 270-276, 2007.

ROSA, R.; RODRIGUES, O.R.; MARQUES, C.; SANTOS-GOMES, G.M. *Leishmania infantum*: soluble proteins released by the parasite exert differential effects on host immune response. **Exp. Parasitol.**, v. 109, n. 2, p. 106-114, 2005.

ROSA, R.; MARQUES, C.; RODRIGUES, O.R.; SANTOS-GOMES, G.M. *Leishmania infantum* released proteins specifically regulate cytokine expression and production patterns by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. **Acta Tropica**, v. 97, n. 3, p. 309-317, 2006.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nat. Immunol.**, v. 3, n. 11, p. 1041-1047, 2002.

SANCHEZ-ROBERT, E.; ALTET, L.; ALBEROLA, J.; RODRIGUEZ-CORTÉS, A.; OJEDA, A.; LÓPEZ-FUERTE, L.; TIMON, M.; SANCHEZ, A.; FRANCINO, O. LONGITUDINAL ANALYSIS OF CYTOKINE GENE EXPRESSION AND PARASITE LOAD IN PBMC IN *LEISHMANIA INFANTUM* EXPERIMENTALLY INFECTED DOGS. **Vet. Immunol. Immunophatol.**, V. 125, N. 1-2, P. 168-175, 2008.



SANTIAGO, M.E.B.; VASCONCELOS, R.O.; FATTORI, K.R.; MUNARI, D.P.; MICHELIN, A.F.; LIMA, V.M.F. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Vet. Parasitol.**, v. 150, n. 4, p. 283-290, 2007.

SANTOS-GOMES, G.M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMÃO, P.; SILVEIRA, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 88, n. 1-2, p. 21-30, 2002.

SCOTT, P.; PEARCE, E.; CHEEVER, A.W.; COFFMAN, R.L.; SHER, A. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. **Immunol. Rev.**, v. 112, p. 161-182, 1989.

SLAPPENDEL, R.J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. **Vet. Q.**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 1988.

SMELT, S.C.; ENGWERDA, C.R.; MCCROSSEN, M.; KAYE, P.M. Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 158, n. 8, p. 3813-3821, 1997.

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Vet. Parasitol.**, v. 90, n. 1-2, p. 37-45, 2000.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in a area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 2, p. 560-563, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L.; RODRIGUEZ-CORTES, A.; TROTTA, M.; ZAMPIERON, C.; RAZIA, L.; FURLANELLO, T.; CALDIN, M.; ROURA, X.; ALBEROLA, J. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 147, n. 3-4, p. 315-319, 2007.

SOLBACH, W.; LASKAY, T. The host response to *Leishmania* infection. **Adv. Immunol.**, v. 74, p. 275-317, 2000.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G.; JAFFE, C.L. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. **Vet. Res.**, v. 38, n. 4, p. 547-564, 2007.

SWENSON, C.L.; SILVERMAN, J.; STROMBERG, P.C.; JOHNSON, S.E.; WILKIE, D.A.; EATON, K.A.; KOCIBA, G.J. Visceral leishmaniasis in an English foxhound from an Ohio research colony. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 193, n. 9, p. 1089-1092, 1988.

THEODOS, C.M.; POVINELLI, L.; MOLINA, R.; SHERRY, B.; TITUS, R.G. Role of tumor necrosis factor in macrophage leishmanicidal activity in vitro and resistance to cutaneous leishmaniasis in vivo. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 8, p. 2839-2842, 1991.

TRAVI, B.L.; TABARES, C.J.; CADENA, H.; FERRO, C.; OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 64, n. 3-4, p. 119-124, 2001.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. **Adv. Immunol.**, v. 70, p. 83-243, 1998.

TRINCHIERI, G. Regulatory role of T cells producing both interferon  $\gamma$  and interleukin 10 in persistent infection. **J. Exp. Med.**, v. 194, n. 10, p. 53-57, 2001.

TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **J. Exp. Med.**, v. 204, n. 2, p. 239-243, 2007.

TUMANG, M.C.T.; KEOGH, C.; MOLDAWER, L.L.; HELFGOTT, D.C.; TEITELBAUM, R.; HARIPRASHAD, J.; MURRAY, H.W. Role and effect of TNF- $\alpha$  in experimental visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 153, n. 2, p. 768-775, 1994.

TSAGOZIS, P.; KARAGOUNI, E.; DOTSIKA, E. CD8<sup>+</sup> T cells with parasite-specific cytotoxic activity and a Tc 1 profile of cytokine and chemokine secretion develop in experimental visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 25, n. 11-12, p. 569-579, 2003.

VAN DER KAAIJ, S.Y.; PINELLI, E.; BROEREN, C.P.; SCHETTERS, T.P.; HAGHPARAST, A.; RUITENBERG, E.J.; RUTTEN, V.P. Molecular cloning and sequencing of the cDNA for dog interleukin-4. **Immunogenetics**, v. 49, n. 2, p. 142-143, 1999.

VASSALLI, P.; GRAU, G.E.; PIQUET, P.F. TNF in autoimmune diseases, graft-versus-host reactions, and pulmonary fibrosis. **Immunol. Ser.**, v. 56, p. 409-430, 1992

VOULDOUKIS, I.; DRAPIER, J.C.; NÜSSLER, A.K.; TSELENTIS, Y.; SILVA, O.A.; GENTILINI, M.; MOSSALAYI, D.M.; MONJOUR, L.; DUGAS, B. Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 40, n. 1, p. 253-256, 1996.

WORTMANN, G.W.; ROMERO, L.I.; PAZ, H.M.; ORTEGA-BARRIA, E.; BAYARD, V.; HOCHBERG, L.P.; RYAN, J.R. Real-time polymerase chain reaction diagnosis of leishmaniasis in Panama from both fresh and frozen tissue. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 98, n. 3, p. 148-151, 2004.

WORTMANN, G., HOCHBERG, L., HOUNG, H-H, SWEENEY, C., ZAPOR, M., ARONSON, N., WEINA, P., OCKENHOUSE, C.F. Rapid identification of *Leishmania* complexes by a real-time PCR assay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 73, n. 6, p. 999-1004, 2005.