

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DO FATOR DE TRANSFORMAÇÃO DO
CRESCIMENTO - β_1 , INTERLEUCINA-10 E INTERFERON- γ
EM CÃES MACHOS, ASSINTOMÁTICOS E
SINTOMÁTICOS, NATURALMENTE INFECTADOS POR
Leishmania (Leishmania) chagasi.**

Ana Paula Ferreira Lopes Corrêa

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Marçal Felix de Lima

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Campus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre
em Microbiologia (Microbiologia Agropecuária).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Julho de 2006

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANA PAULA FERREIRA LOPES CORRÊA - nascida na cidade de Três Lagoas, estado do Mato Grosso do Sul, no dia 26 de março de 1978. Filha de Jonas Antonio Corrêa e Glauce Ferreira Lopes Corrêa. Graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Odontologia, curso de Medicina Veterinária – UNESP – Campus de Araçatuba – SP, início em 1999 e término em 2003. Especialização na área de Sanidade Animal e Saúde Pública na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu – SP, início em abril de 2004 e término em junho de 2005. Curso de Pós-graduação em Microbiologia, nível de mestrado, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Campus de Jaboticabal – SP, início em março de 2004 e término em 2006.

Mais Uma Vez

Mas é claro que o sol
Vai voltar amanhã
Mais uma vez, eu sei
Escuridão já vi pior
Doidecer gente sã
Espera que o sol já vem
Tem gente que está do mesmo lado que você
Mas deveria estar do lado de lá
Tem gente que machuca os outros
Tem gente que não sabe amar
Tem gente enganando a gente
Veja nossa vida como está
Mas eu sei que um dia a gente aprende

Se você quiser alguém em quem confiar
Confie em si mesmo
Quem acredita sempre alcança

Flávio Venturini e Renato Russo

Aos meus pais, aos meus irmãos e ao Antonio, essenciais...

AGRADECIMENTOS

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

À FAPESP pelo financiamento do projeto e a CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À Profa. Dra. Valéria Marçal Felix de Lima pela orientação e idealização do projeto.

À Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, pelo apoio na realização deste trabalho.

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

Ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Araçatuba e aos funcionários que estiveram sempre dispostos a ajudar.

À Prefeitura de Lençóis Paulista- SP, em nome de Fábio Ferreira, pelos cães disponibilizados para utilização no experimento.

Ao Hospital Veterinário da UNESP, campus de Araçatuba, pelo uso dos canis para instalação dos animais do experimento e à funcionária Marina, pela ajuda e pelo cuidado com os cães.

Ao Laboratório Clínico pela realização dos hemogramas dos cães.

Aos meus pais que sempre apoiaram e aceitaram minhas escolhas, pelo amor e carinho incondicionais, deixando qualquer obstáculo mais fácil.

Aos meus irmãos, cunhado e sobrinho, madrinha e padrinho, pela torcida e por fazerem parte da minha vida.

Ao Antonio, pela orientação, dedicação, zelo, paciência, ajuda, amor e carinho, dia após dia.

À Suely , pelo apoio, amizade, conselhos e cuidado durante todo tempo.

À Ana Cláudia pela ajuda, companheirismo e amizade durante o mestrado.

À Juliana pela amizade, força, encorajamento, torcida, boa vontade e ajuda em todos os anos da graduação e mestrado.

Ao Maurício, pela ajuda, bom humor e amizade durante a faculdade e o mestrado.

À Cecília e ao Alexandre, pela amizade, conselhos e apoio.

À amiga Bel, que de longe, participou e torceu desde o início do mestrado.

À Maria Paula, Hilka e Paloma, pela amizade, bom humor e acolhimento em sua casa, durante o mestrado.

Às amigas Inah e Rita, pela força e amizade.

A tantos outros amigos que estiveram torcendo.

E a todos aqueles que passaram de alguma forma e por algum período ao meu lado, torcendo.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMO.....	vi
SUMMARY.....	vii
I. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Leishmaniose Visceral (LV).....	3
2.2. Imunidade na Leishmaniose Visceral (LV).....	5
2.3. Fator de Transformação do Crescimento- β (TGF- β) e Leishmaniose Visceral (LV).....	8
2.4. Interleucina-10 (IL-10) e Leishmaniose Visceral (LV).....	10
2.5. Interferon-gama (INF- γ) e Leishmaniose Visceral (LV).....	13
III. OBJETIVOS.....	17
3.1. Objetivo Geral.....	17
3.2. Objetivos Específicos.....	17
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1. Área de Estudo.....	18
4.2. Animais.....	18
4.3. Grupos Experimentais.....	18
4.4. Obtenção de Materiais.....	19
4.5. Sorologia para Leishmaniose.....	20
4.6. Cultura de Células Brancas Esplênicas.....	21
4.7. Extrato de Baço e de Fígado.....	22
4.8. Western Blot.....	23
4.9. Quantificação do TGF- β_1	23
4.10. Quantificação da IL-10 e do INF- γ	25
4.11. Análise Estatística.....	26
V. RESULTADOS.....	27
5.1. ELISA Indireto.....	27
5.2. Western Blot.....	27
5.3. Quantificação do TGF β_1	29
5.4. Quantificação da IL-10.....	35
5.5. Quantificação do INF- γ	38
VI. DISCUSSÃO.....	42
6.1. Considerações Gerais.....	42
6.2. TGF- β_1	42
6.3. IL-10.....	44
6.4. INF- γ	46
VII. CONCLUSÕES.....	48

VIII. REFERÊNCIAS.....	50
APÊNDICES.....	65
Apêndice A.....	66
Apêndice B.....	67
Apêndice C.....	69
Apêndice D.....	70
Apêndice E.....	72
Apêndice F.....	76
Apêndice G.....	77
Apêndice H.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APC	células apresentadoras de antígeno
BSA	albumina sérica bovina
CCZ	centro de controle de zoonoses
DAB	diaminobenzedina
DO	densidade óptica
ELISA	ensaio imunoenzimático em fase sólida
<i>g</i>	aceleração da gravidade (unidade de medida de aceleração)
IFI	imunofluorescência indireta
Ig	imunoglobulina
IgG	imunoglobulina G (subclasses 1 e 2)
IL	interleucina (1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12)
INF- γ	interferon gama
IFN- γ R1	receptor para IFN- γ
kDa	quilodalton (unidade de medida de massa)
LV	leishmaniose visceral
LVC	leishmaniose visceral canina
LVH	leishmaniose visceral humana
LVZ	leishmaniose visceral zoonótica
MHC	complexo de histocompatibilidade (classe I e classe II)
NK	células <i>natural killer</i>
mAb	anticorpo monoclonal
OPD	o- phenylenediamine dihydrochloride
<i>P</i>	probabilidade (nível de significância)
PBS	salina tamponada com fosfato
PBS T 20	PBS acrescido com 0,05% de Tween 20
PCR	reação em cadeia de polimerase (RT- transcriptase reversa)
RNI	intermediário reativo de nitrogênio
ROI	intermediário reativo de oxigênio
rpm	rotações por minuto (unidade de medida de velocidade angular)
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida para eletroforese com dodecil sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
Ta	linfócitos T auxiliares (tipo I e tipo 2)
TGF- β	fator de transformação do crescimento- β (isoformas 1, 2, 3)
TMB	3,3',5,5' - tetramethylbenzedina
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Quantificação do TGF- β_1 no extrato de baço e de fígado. Média e desvio-padrão do grupo de cães assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i> , obtidos no ensaio de ELISA de captura.	30
2	Quantificação do TGF- β_1 no sobrenadante de cultura de células brancas esplênicas. Média e desvio-padrão do grupo de cães assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i> , obtidos no ensaio de ELISA de captura.	33
3	Quantificação do IL-10 no extrato de baço e de fígado. Média e desvio-padrão do grupo de cães assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i> , obtidos no ensaio de ELISA de captura.	36
4	Quantificação do INF- γ no extrato de baço e de fígado. Média e desvio-padrão do grupo de cães assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i> , obtidos no ensaio de ELISA de captura.	39
1C	Densidade óptica dos cães que foram selecionados para o experimento, obtida pelo método de ELISA indireto.	69
1H	Número do animal, sexo, <i>status</i> (assintomático e assintomático) e médias obtidas nos teste realizados, para cada citocina em cada órgão ou cultura pesquisados	78

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Análise de Western Blot de amostras de soro das espécies humana e canina, separadas por SDS-PAGE 10%. Todas as amostras apresentaram bandas de peso molecular similar, indicando reatividade cruzada (1- amostra de soro humano; 2- amostra de soro canino fêmea; 3- amostra de soro canino macho).	28
2	Produção de TGF- β_1 , médias e desvios-padrão, no extrato de baço (A) e de fígado (B), de cães machos, assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i> , quantificada por ELISA de captura. O teste de análise de variância indicou diferença estatística entre os dois grupos de cães estudados ($P < 0,05$) (*).	31
3	Produção de TGF- β_1 , médias e desvios-padrão, no sobrenadante de cultura de células brancas esplênicas, de cães machos, assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i> , quantificada por ELISA de captura. O teste de análise de variância indicou diferença estatística entre os dois grupos de cães estudados ($P < 0,05$) (*).	34
4	Produção de IL-10, médias e desvios-padrão, no extrato de baço (A) e de fígado (B), de cães machos, assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i> , quantificada por ELISA de captura. O teste de análise de variância não indicou diferença estatística entre os dois grupos de cães estudados ($P < 0,05$).	37
5	Produção de INF- γ , médias e desvios-padrão, no extrato de baço (A) e de fígado (B), de cães machos, assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i> , quantificada por ELISA de captura. O teste de análise de variância indicou diferença estatística entre os dois grupos de cães estudados ($P < 0,05$) (*).	40

**AVALIAÇÃO DO FATOR DE TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO- β_1 ,
INTERLEUCINA-10 E INTERFERON- γ EM CÃES ASSINTOMÁTICOS E
SINTOMÁTICOS, NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania*
(*Leishmania*) *chagasi*.**

RESUMO- O objetivo do estudo foi avaliar o papel imunomodulatório das citocinas TGF- β_1 , IL-10 e INF- γ nos extratos de baço e de fígado e no sobrenadante de cultura de células brancas esplênicas, em cães machos assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. Trinta cães oriundos da cidade de Araçatuba, SP, área endêmica para leishmaniose visceral, selecionados por reação sorológica ELISA positiva para *Leishmania* sp. foram divididos em dois grupos: cães sem sintomas ($n=15$) que constituíram o grupo assintomático, e os cães com pelo menos três dos sinais clínicos característicos (febre, dermatites, linfadenopatias, onicogribose, perda de peso, caquexia, problemas de locomoção, conjuntivite, epistaxe, hepato-esplenomegalia, edema, apatia), que constituíram o grupo sintomático ($n=15$). Após a eutanásia, fragmentos de baço e de fígado foram coletados para quantificação de TGF- β_1 , IL-10 e INF- γ *ex vivo*. O TGF- β_1 ativo naturalmente produzido *in vitro* também foi avaliado no sobrenadante de cultura de células esplênicas. O extrato de baço e de fígado do grupo de cães assintomáticos apresentou níveis médios maiores de TGF- β_1 , quando comparado ao grupo de cães sintomáticos. A citocina IL-10 foi detectada em altas concentrações no extrato de baço e, principalmente, de fígado dos dois grupos de cães avaliados. O INF- γ foi encontrado no extrato de baço, do grupo de cães assintomáticos, e de fígado, do grupo de cães sintomáticos. Embora a citocina INF- γ tenha sido detectada na infecção canina, os níveis médios de TGF- β_1 e IL-10 no extrato de baço e de fígado foram mais elevados, sugerindo que tanto em cães assintomáticos quanto em sintomáticos a resposta imune predominante foi do tipo Ta2.

Palavras-chave: citocinas, cultura de células esplênicas, ELISA, leishmaniose visceral, resposta Ta2, zoonose

**EVALUATION OF TRANSFORMATION GROWTH FACTOR B_1 , INTERLEUKIN-10,
AND INTERFERON- γ IN ASYMPTOMATIC AND SYMPTOMATIC DOGS NATURALLY
INFECTED BY *Leishmania (Leishmania) chagasi*.**

SUMMARY - The aims of this study were to evaluate the immunomodulatory role of TGF- β_1 , IL-10, & INF- γ in spleen and liver extracts and supernatant cultures of white spleen cells from male symptomatic and asymptomatic dogs, naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Thirty dogs from Araçatuba, SP, an endemic leishmaniasis area, were selected by positive ELISA serological reaction for *Leishmania* sp. and divided into two groups: asymptomatic ($n=15$), and symptomatic ($n=15$) consisting of animals with at least three characteristic signs (fever, dermatitis, lymphadenopathy, onychogryphosis, weight loss, cachexia, locomotion problems, conjunctivitis, epistaxis, hepatosplenomegaly, edema, and apathy). After euthanasia, spleen and liver fragments were collected for *ex vivo* quantification of TGF- β_1 , IL-10, and INF- γ . Naturally active *in vitro* produced TGF- β_1 was also evaluated in spleen cell culture supernatant. Spleen and liver extract of asymptomatic dogs had higher mean TGF- β_1 levels than symptomatic dogs. High concentrations of IL-10 were found in spleen, and mainly in liver extract of both groups. Higher INF- γ concentrations were found in spleen extracts of asymptomatic dogs, and in liver extracts of symptomatic dogs. Although INF- γ is being produced in canine infection, mean levels of TGF- β_1 and IL-10 from spleen and liver extracts were much higher, suggesting that immune response in both asymptomatic and symptomatic dogs was predominantly type Th2.

Keywords: cytokines, ELISA, spleen cell culture, Th2 response, visceral leishmaniasis, zoonosis

I. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma das mais importantes zoonoses emergentes parasitárias, sendo a segunda maior enfermidade no mundo causada por protozoários, perdendo apenas para a Malária. A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma zoonose de canídeos, que constitui um grave problema de Saúde Pública, pois estes animais são as principais fontes de infecção da doença. Ao acometer o homem, torna-se uma antroponose, quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito. A Leishmaniose Visceral Humana (LVH) é uma infecção crônica, de alta incidência e letalidade, principalmente em crianças desnutridas e idosos.

As estratégias empregadas no controle são baseadas no diagnóstico e tratamento adequados dos casos humanos registrados, no controle do reservatório canino (inquérito sorológico e eutanásia de cães soropositivos) e no controle químico do vetor (aplicação de inseticida).

No Brasil, a LV apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados, em função de sua ampla distribuição geográfica, envolvendo as regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste.

O primeiro relato da ocorrência de LVC no Estado de São Paulo foi de 1998, na cidade de Araçatuba, sendo diagnosticada pelo Serviço de Patologia do Hospital Veterinário da UNESP. Desde então, a doença tem se disseminado, totalizando 40 municípios com transmissão canina nesta região. A notificação do primeiro caso de LVH, em Araçatuba, data de abril de 1999, com 187 casos confirmados na região e destes, 19 óbitos ocorreram até o mês de fevereiro de 2003.

O cão tem importante papel na LV do ponto de vista epidemiológico, pois a infecção em cães tem sido mais prevalente que no homem. O índice de cães assintomáticos, que albergam o parasito na derme, no Brasil é de 40 a 60% dos animais infectados. Ainda não foram verificadas as predisposições raciais, sexuais ou etárias relacionadas à infecção no animal.

A infecção por *Leishmania* sp. em cães susceptíveis, após a infecção da pele, ocorre à disseminação do parasito, preferencialmente, para o baço, o fígado, os linfonodos e a medula óssea, onde se multiplica e desenvolve os sintomas. Cães assintomáticos apresentam resposta celular bem preservada e poucos anticorpos circulantes, por outro lado, cães sintomáticos apresentam uma progressiva perda da capacidade de proliferação dos linfócitos T e altos níveis de anticorpos.

A *Leishmania* sp. é um parasito intracelular obrigatório, por isso, as defesas do hospedeiro são dependentes da atividade dos linfócitos T do tipo Ta1, responsáveis pela resposta imune celular. Em modelos experimentais, foi relatado que as citocinas estimuladoras desta resposta são fundamentais para a resolução da infecção, mas sabe-se que estas células encontram-se reduzidas no curso da enfermidade. A atividade dos linfócitos T do tipo Ta2, produzindo citocinas responsáveis pela resposta imune humoral (proliferação de linfócitos B e a produção de anticorpos), em contrapartida, é abundante, mas sua ação é deletéria e não protetora.

Outro estudo em modelos experimentais demonstrou que as citocinas fator de transformação do crescimento- β (TGF- β) e a interleucina-10 (IL-10) estão envolvidas na supressão da resposta imune celular, ajudando na progressão da infecção. A citocina INF- γ , por outro lado, foi responsável pela limitação do crescimento do parasito nos macrófagos e pelo auxílio na resolução da infecção.

Apesar de inúmeros estudos mostrarem a função das citocinas na progressão da infecção em modelos experimentais, são raros os relatos avaliando o papel modulatório das citocinas em cães naturalmente infectados. Este estudo poderá trazer informações importantes para o entendimento da imunidade no cão naturalmente infectado por *L. (L.) chagasi* e as citocinas associadas com a progressão da infecção, podendo ser útil para a implementação de novas estratégias de controle da enfermidade e o desenvolvimento de vacinas.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leishmaniose Visceral

As leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias que afetam 88 países e são causadas por 24 espécies de protozoários *Leishmania* sp. (HERWALDT, 1999). Dependendo da espécie do parasito e da resposta imune do hospedeiro, as manifestações clínicas apresentam-se como: cutânea, mucocutânea, cutânea difusa ou visceral (PINELLI et al., 1994; HERWALDT, 1999). Atualmente, encontra-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (WHO, 2003).

A leishmaniose visceral zoonótica (LVZ) é causada pela *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (HERWALDT, 1999) no Novo Mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990), incluindo o Brasil (BADARÓ et al., 1986). As leishmanias são parasitos intracelulares de monócitos e macrófagos de órgãos linfóides como o baço, os linfonodos, a medula óssea e o fígado. Seus ciclos biológicos alternam entre a forma amastigota, em hospedeiros vertebrados, e a forma promastigota, no sistema digestório do vetor (WHO, 1990).

É endêmica na América, Europa e países da Ásia (PEARSON & SOUSA, 1996; HERWALDT, 1999) com novas áreas de disseminação da enfermidade sendo identificadas, como por exemplo a América do Norte (ENSERINK, 2000; SILVA et al., 2001). Na América Latina, a enfermidade foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorreram no Brasil, especialmente na Região Nordeste. No Brasil, a leishmaniose visceral (LV) apresentava caráter eminente rural (WHO, 1990) e recentemente, expandiu-se para as áreas urbanas (MARZOCHI; MARZOCHI; CARVALHO, 1994) de médio e grande porte (SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997). Atualmente, a LV está registrada em 19 das 27 Unidades da Federação, com aproximadamente 1.600 municípios apresentando transmissão autóctone (SVS, 2003).

Os cães (*Canis familiares*) foram considerados os reservatórios urbanos mais importantes da *L. (L.) chagasi* (COSTA & VIEIRA, 2001; MORENO & ALVAR, 2002) e

apresentam maior prevalência à infecção (PARANHOS-SILVA et al., 1996), pois é a partir dele que ocorre a transmissão ao homem (ABRANCHES et al., 1991; SVS, 2003). A transmissão entre hospedeiros vertebrados ocorre pela picada da fêmea do flebotomíneo hematófago *Lutzomyia longipalpis* (ALENCAR; NEVES; DIETZE, 1991; FERRER, 1992). Não ocorre transmissão direta da LV de pessoa a pessoa. Outros mecanismos de transmissão incomuns são a auto-inoculação por material perfurocortante, a transfusão sangüínea, o compartilhamento de seringas e agulhas no uso de drogas injetáveis, a transmissão congênita pelas células do sistema fagocitário mononuclear infectadas por formas amastigotas que atravessam a placenta e o contato do sangue materno com o feto no momento do parto (GENARO et al., 2003).

Após a transmissão, o parasito multiplica-se, inicialmente, na pele do sítio de infecção e, na falta de resposta imune que proteja o hospedeiro, dissemina-se para a pele e espalhando-se pelas vísceras e multiplicando-se em especial na medula óssea, no baço e no fígado, eventualmente causando os sintomas da enfermidade (OLIVEIRA; SANTORO; SADEGURSKY, 1993).

Os sinais clínicos da LV mais comuns no cão são: linfadenomegalia, alterações dermatológicas (queda de pêlos, lesões ulcerativas, prurido intenso, pelame opaco e dermatite seborréica), hiporexia, onicogrifose e emaciação. Outros achados importantes são: anemia, uveíte, hipertermia, êmese, diarreia, melena, pneumonia, epistaxe, comprometimento do sistema urinário e alterações hepáticas. As alterações neurológicas são menos freqüentes (FERRER, 1999; FEITOSA et al., 2000).

O diagnóstico clínico da LVC é difícil de ser determinado devido a grande percentagem de cães assintomáticos e oligossintomáticos existentes e também por apresentar semelhança com outras doenças infecto-contagiosas que acometem cães. O diagnóstico laboratorial pode ser baseado no exame sorológico e parasitológico, sabendo-se que os métodos recomendados pelo Ministério da Saúde para avaliação da soroprevalência canina, são o ensaio imunoenzimático em fase sólida (ELISA), para triagem de cães sorologicamente positivos para *Leishmania* sp., e a imunofluorescência indireta (IFI), para a confirmação dos cães sororreagentes ao teste ELISA. O método parasitológico, por outro lado, apesar de ser o método diagnóstico de certeza, pois o

seu laudo é confirmado pela observação direta do parasito, é impraticável nos programas de saúde pública, pela grande demanda de cães a ser investigada em pouco espaço de tempo (SVS, 2003).

O tratamento da LVC não é recomendado, pois não diminui a importância dos cães como reservatórios da enfermidade. O tratamento com fármacos tradicionalmente empregados no LV humana apresenta baixa eficácia e o seu uso rotineiro em cães, apesar de induzir a remissão temporária dos sintomas, não previne recidivas, tem efeito limitado na infectividade de flebotomínios e há o risco de seleção dos parasitos resistentes aos fármacos utilizados para o tratamento humano (SVS, 2003).

Atualmente, o que se faz para controlar a LV, é a eutanásia dos cães que apresentem sintomatologia e exame sorológico positivo para *Leishmania* sp., mas estudos têm demonstrado que este não tem sido o melhor método para a redução da transmissão.

2.2. Imunidade na Leishmaniose Visceral (LV)

De maneira geral, a população de linfócitos TCD4⁺ auxiliares divide-se em duas subpopulações: linfócitos TCD4⁺ auxiliares tipo1 (Ta1) e linfócitos TCD4⁺ auxiliares tipo 2 (Ta2), as quais são definidas com base no seu padrão de citocinas (MOSMANN et al., 1986).

As células Ta1 secretam, principalmente, interferon- γ (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2) induzindo a ativação de macrófagos e a resposta mediada por células (CHER & MOSMANN, 1987), associada a resistência (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002), enquanto que as células Ta2 secretam, interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10) e fator de transformação do crescimento- β (TGF- β) fornecendo maior ajuda à resposta mediada por anticorpos (COFFMAN et al., 1988; BACELLAR et al., 2000), associada a susceptibilidade (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002).

A LVH é caracterizada por uma deficiência na síntese de INF- γ e pela expressão aumentada de IL-10, a citocina associada às células Ta2 que suprime a proliferação e a função das células Ta1 (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1997).

O controle de algumas infecções por *Leishmania* sp. está associado ao desenvolvimento da resposta imune adaptativa a antígenos específicos, a produção de INF- γ pelos linfócitos Ta1 e a subsequente ativação de macrófagos que leva a morte intracelular de amastigotas, onde justamente estas são capazes de interferir, retardando ou até mesmo bloqueando o desenvolvimento de uma resposta imune protetora (BOGDAN & RÖLLINGHOFF, 1998).

Na LVC a resposta imune se caracteriza pelo desenvolvimento da resposta humoral pela ativação de células B e pela intensa hipergamaglobulinemia (QUINNELL et al., 2001), além da produção do anticorpo imunoglobulina-E (IgE) antileishmania (ALMEIDA et al., 2005). Cães infectados assintomáticos, têm sido associados com uma resposta proliferativa específica, com produção de IFN- γ , IL-2 e TNF- α e baixos títulos de anticorpos antileishmania, e cães sintomáticos apresentam a depressão das funções das células T e níveis altos de anticorpos específicos (CABRAL; O'GRADY; ALEXANDER, 1992).

A caracterização do tipo de resposta imune que está associada a LVC ou a assintomatologia, foi investigada através da correlação entre as classes e subclasses de imunoglobulina (Ig) (CHATTERJEE et al., 1998; ANAM et al., 1999). O aparecimento de anticorpo específico IgG2 contra *Leishmania* sp. foi correlacionado a cães assintomáticos, embora a preponderância de IgG1 tenha sido correlacionada com a progressão da enfermidade (DEPLAZES et al., 1995). Foi observada ainda uma correlação entre a secreção de IgG1 e o desenvolvimento da LVC (NIETO et al., 1999).

Outros estudos discordaram dos anteriores. BOURDOISEAU et al. (1997b) verificaram níveis altos de IgG2 em cães infectados e LEANDRO et al. (2001) confirmaram a ausência de relação entre o nível de IgG2 e a resistência à infecção. Por fim, SOLANO-GALLEGO et al. (2001) em um estudo com 280 animais em diferentes estágios da infecção, não encontraram correlação entre o *status* clínico do animal e a secreção das subclasses de IgG. Além disso, em um estudo longitudinal realizado por

QUINNELL et al. (2003) foi demonstrado que as subclasses de IgG não são marcadores úteis do estabelecimento de resistência ou de susceptibilidade para LVC.

A LVC pode ser considerada uma doença imunomediada devido à capacidade do parasito em modificar o sistema imunológico do hospedeiro (SLAPPENDEL & FERRER, 1990), inabilitando seus macrófagos a eliminar amastigotas intracelulares (MURRAY; RUBIN; ROTHERMEL, 1983; CARVALHO et al., 1985). A incompetência das células TCD4+ em secretar quantias significantes de citocinas ativadoras de macrófagos, tais como INF- γ , em resposta aos antígenos de *Leishmania* sp., tem importante papel na imunopatologia da enfermidade (MURRAY; RUBIN; ROTHERMEL, 1983; CARVALHO et al., 1985).

Em cães assintomáticos, a infecção por *L. (L.) chagasi* usualmente promove a doença sistêmica crônica. No entanto, a evolução pode ser aguda e grave, levando o animal a óbito em poucas semanas, ou a doença pode tornar-se latente e evoluir inclusive, para a cura clínica espontânea (GENARO, 1993). Nos cães sintomáticos, observa-se uma redução no número de linfócitos TCD4+ concomitante a proliferação do parasito nos macrófagos, o que sugere a ausência de resposta imune efetiva no sentido de eliminar o parasito (BOURDOISEAU et al., 1997a).

A predominância da resposta do tipo Ta1 (com simultânea expressão de INF- γ , IL-2 e IL-12) por um curto período de tempo, evidenciou que o perfil de citocinas é necessário para o controle da infecção, retardando a progressão da enfermidade, em cães experimentalmente infectados por *L. (L.) infantum*, mas foi incapaz de controlar a infecção (SANTOS-GOMES et al., 2002).

Os fatores iniciais que contribuem para a inibição ou proliferação dos parasitos nas células do hospedeiro são pouco compreendidos, mas citocinas tais como IFN- γ , interleucina-12 (IL-12), IL-10 e TGF- β são conhecidas por influenciar na sua replicação nos macrófagos (MURRAY et al., 1995; WILSON et al., 1998; WALKER et al., 1999).

2.3. Fator de Transformação do Crescimento- β (TGF- β) e Leishmaniose Visceral (LV)

O TGF- β é uma proteína de 25-kDa produzida por variedades amplas de células, incluindo a macrófagos ativados, células T, células B e células NK (KEHRL et al., 1986; WAHL, 1994). Pode ocorrer em três isoformas, TGF- β (1, 2 e 3), descritas em mamíferos (MASSAGUE, 1990) e são usualmente secretadas na forma de precursores latentes que necessitam de clivagem por enzimas para tornarem-se homodímeros biologicamente ativos (MASSAGUE, 1990; BARRAL-NETO et al., 1992). O TGF- β realiza seus efeitos biológicos pelo encadeamento dos receptores da superfície das células (MASSAGUE, 1990).

Esta citocina pertence a uma grande família de moléculas reguladoras do crescimento, são multifuncionais com importantes propriedades pró e antiinflamatórias, dependendo do ambiente em que estão inseridas e também da concentração em que se encontram (WAHL, 1994). Suas importantes propriedades proinflamatórias incluem a capacidade de recrutar monócitos, células T e neutrófilos para os locais de inflamação, no início da infecção, através da modulação da expressão de moléculas de adesão das células endoteliais (OMER; KURTZHALS; RILEY, 2000; LING & ROBINSON, 2002), no entanto, são capazes de suprimir a expressão da produção de algumas citocinas pró-inflamatórias por vários tipos celulares (ESPEVIK et al., 1987).

TGF- β_1 é responsável por regular a proliferação e a diferenciação de células (KEHRL et al., 1986; LING & ROBINSON, 2002), estimular a síntese da matriz extracelular, a angiogênese, a imunomodulação (LING & ROBINSON, 2002) e a indução da arginase I, juntamente com outras citocinas do tipo Ta2, que em macrófagos murinos levam ao aumento proporcional no número de amastigotas intracelulares (INIESTA et al., 2002).

É um dos estimuladores mais potentes da fibrose (WAHL, 1994) por fibroblastos, controlando a expressão de muitas proteínas da matriz extracelular (colágeno do tipo I, III e IV, fibronectina, trombospondina, tenascina, osteopontina, osteonectina e proteoglicanos) (BRANTON & KOPP, 1999). Por outro lado, inibe a expressão de

algumas proteases (colagenase, estromelisina e ativador de plasminogênio) e induz a síntese de enzimas que degradam a matriz extracelular (inibidor-1 ativador de plasminogênio e inibidor tecidual de metaloprotease) (EDWARDS et al., 1987; ROBERTS; MCCUNE; SPORN, 1992).

Entre outros efeitos inibitórios do TGF- β , no sistema imune estão: a redução da indução de receptores de IL-2 (KEHRL, 1986), a redução da produção de INF- γ que acarreta na diminuição da resposta oxidativa (CZARNIECKI et al., 1988; DING et al., 1990; NANDAN & REINER, 1997) e da produção de óxido nítrico por macrófagos (ESPEVIK et al., 1987); a redução da produção de IL-1 (MULE et al., 1988), a redução da produção de INF- α e TNF- α pelas células NK (BELLONE et al., 1995), a redução da citotoxicidade e da produção de linfocinas que ativam a morte celular (MULE et al., 1988) e a redução do sinal Jak-STAT levando a inibição de IL-12, resultando na baixa proliferação das células T e produção de IFN- γ e no aumento da morte celular por apoptose (BARRAL-NETO et al., 1992; BRIGHT & SRIRAM, 1998).

Estudos sugeriram que esta citocina, na LV, esteja relacionada à manutenção ou exacerbação da imunossupressão característica da enfermidade (RODRIGUES; SILVA; CAMPOS-NETO, 1998). A infecção por *Leishmania* sp., em modelos murinos, induziu a produção de TGF- β ativo, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sendo importante na sua regulação. Supõe-se que induza citocinas que desativem macrófagos, tais como IL-4 e IL-10 e a produção destas resulte no aumento da infecção intracelular, levando ao desenvolvimento de uma resposta do tipo Th2, sem importância na resolução da infecção (BARRAL-NETO et al., 1992; BARRAL et al., 1993). Algumas espécies de *Leishmania* sp. induzem a produção de TGF- β por macrófagos (BARRAL-NETO et al., 1992), assim, a presença do parasito talvez seja responsável pelo início ou causa da expressão de TGF- β ou mesmo ainda, este gere sua própria expressão (SEDER et al., 1998). Acredita-se também que a produção do TGF- β seja promovida por componentes da saliva do vetor (BARRAL-NETO et al., 1992).

WILSON et al. (1998) acreditam que o TGF- β seja um grande determinante da progressão da enfermidade causada pela *L. (L.) chagasi* em camundongos susceptíveis, promovendo a susceptibilidade. Foram encontrados níveis altos desta

citocina no fígado destes animais e quando foi promovida a sua neutralização, aumentaram os níveis de INF- γ neste local, sugerindo que o TGF- β limite a produção de INF- γ durante a infecção primária e que, níveis baixos de TGF- β talvez sejam importantes para o desenvolvimento da imunidade após a imunização.

RODRIGUES; SILVA; CAMPOS-NETO (1998), mostraram que células aderentes do baço de hamsters infectados por *L. (L.) donovani* produziram níveis altos da citocina inibitória TGF- β . Pela técnica de imunohistoquímicas, com o uso do anticorpo monoclonal anti-TGF- β foi demonstrado que esta citocina foi produzida abundantemente *in vivo* pelas células esplênicas de animais infectados e em adição, níveis altos de TGF- β foram produzidos *in vitro* por células de hamsters infectados, espontaneamente ou após estímulo de antígeno (parasito) ou lipopolissacarídeo.

MELBY et al. (2001) em um estudo com camundongos BALB/c experimentalmente infectados com *L. (L.) donovani* demonstraram o grande aumento da produção esplênica de TGF- β , principalmente na polpa vermelha, no curso agudo da infecção.

2.4. Interleucina-10 (IL-10) e Leishmaniose Visceral (LV)

A IL-10 é produzida por macrófagos, células T e B (HOWARD & O'GARRA, 1992; GASIM et al., 1998) e também por monócitos humanos ativados por lipopolissacarídeos (LPS) (DE WAAL MALEFYT et al., 1991a). Apresenta efeito pleiotrófico em várias células. É um potente supressor dos mecanismos efetores microbicidas conhecidos da ativação de macrófagos, incluindo a regulação negativa das células apresentadoras de antígenos (APC) (FIORENTINO et al., 1991; DE WAAL MALEFYT et al., 1991a), a produção de citocinas (INF- γ , TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, entre outras) (BOGDAN; VODOVOTZ; NATHAN, 1991; DE WAAL MALEFYT et al., 1991b; RALPH et al., 1992) e os eventos metabólicos associados à ativação de macrófagos,

como a produção de intermediários reativos de oxigênio (ROI) e nitrogênio (RNI) (BOGDAN; VODOVOTZ; NATHAN, 1991).

É uma citocina antagônica ao INF- γ (MURRAY; RUBIN; ROTHERMEL, 1983), influenciando na resolução da infecção, parcialmente, pelo bloqueio da sua produção (FIORENTINO; BOND; MOSMANN, 1989; MOORE et al., 1990). Portanto, sua importância nas doenças parasitárias se deve ao bloqueio do INF- γ que ativa macrófagos, levando a morte intracelular dos protozoários (SILVA et al., 1992). Um estudo realizado em camundongos BALB/c infectados com a forma promastigota da *L. (L.) chagasi*, mostrou na cultura de esplenócitos níveis elevados de IL-10 e de INF- γ , sugerindo que outra citocina além de IL-10 seja responsável pela inibição de INF- γ . (WILSON et al., 1998).

A citocina IL-10, como o TGF- β , foi produzida na infecção por *Leishmania* sp. (HOLADAY, 1999; MOSSER & KARP, 1999) e foi responsável pela indução de arginase I, resultando na proliferação do parasito na célula, levando a progressão da doença (INIESTA et al., 2002).

A IL-10 na infecção humana ou experimental tem ampla ação nas APCs e nos mecanismos coestimulatórios das células T, na proliferação de células T e na secreção de citocinas que inativam células Ta1 (BOGDAN; VODOVOTZ; NATHAN, 1991; KARP et al., 1993; WILSON et al., 1998; BACELLAR et al., 2000). É a principal citocina que pode regular negativamente a resposta imune em humanos com LV e modelos murinos (BARRAL et al., 1993; BACELLAR et al., 2000).

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

A IL-10 está relacionada à patogênese da infecção em humanos (KARP et al., 1993). Estudos mostraram que na LVH há níveis significativamente altos de IL-10 e também de INF- γ , comprovando a existência dos dois tipos de resposta imune Ta1 e Ta2 (KARP et al., 1993; KENNEY et al., 1998). Outro estudo sugeriu que a IL-10 atuou

como um fator regulatório que permitiu o balanceamento entre os dois tipos de respostas (KEMP et al., 1999). A neutralização de IL-10, restabeleceu a proliferação de linfócitos e a produção de INF- γ pelas células mononucleares do sangue periférico, de pacientes com LV ativa (CARVALHO et al., 1994; GHALIB et al., 1995).

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

GASIM et al. (1998) estudaram o plasma e os queratinócitos de pacientes tratados para LV que desenvolveram leishmaniose dermal pós-calazar e HOLADAY (2000) estudou as células do sangue periférico, também de pacientes em tratamento para LV e sugeriram que níveis altos de secreção de IL-10 endógeno foram relacionados com a esplenomegalia, hepatomegalia e a progressão da LV após a infecção da derme. A observação da variabilidade dos níveis desta citocina talvez explique a variabilidade da resposta imune celular obtida pelos pacientes com LV.

QUINNELL et al. (2001), em um estudo semi-quantitativo do aspirado de medula óssea, em cães naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi*, sugeriram que ao contrário do que ocorre para a LVH, a citocina IL-10, talvez não represente o papel chave na imunossupressão em cães, pois foram encontrados níveis baixos de IL-10.

Em estudo com células mononucleares do sangue periférico de cães experimentalmente infectados com amastigotas de *L. (L.) infantum*, foi observado a baixa proporção de animais que expressaram IL-10, sugerindo que esta citocina talvez não tenha efeito inibitório direto sobre INF- γ e IL-2 e que esta observação talvez não tenha relação com a imunossupressão da resposta mediada por células nestes animais ou com a doença severa, associada à expressão da IL-10, pois alguns animais não conseguiram controlar a infecção (SANTOS-GOMES et al., 2002).

É importante destacar que há diferença entre a progressão da enfermidade na infecção experimental e na natural, já que a saliva do vetor tem função

imunomodulatória. PARANHOS et al. (1993) em um estudo com cães, observaram que estes quando inoculados com lisado de glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis* simultânea a inoculação de promastigotas de *L. (L.) chagasi*, ambos pela via intradérmica, foi induzida uma eosinofilia significativa, sem evidências de infecção, diferente daqueles cães inoculados com promastigotas de *L. (L.) chagasi*, pela via intravenosa, ou com o lisado de glândula salivar.

2.5. Interferon-gama (INF- γ) e Leishmaniose Visceral (LV)

O INF- γ é produzido pelas células T e células NK, estimuladas pela IL-12 (TRINCHIERI, 1993). Em pacientes com LV a maior fonte de INF- γ são as células TCD4+ (BACELLAR et al., 2002). A citocina INF- γ induz a síntese de óxido nítrico sintase (iNOS) (REINER & LOCKSLEY, 1995) que produz óxido nítrico e leva a morte intracelular de amastigotas por apoptose, em modelos murinos (EVANS et al., 1993) e ativa funções microbidas (REINER & LOCKSLEY, 1995). Regula positivamente a produção de TNF- α , uma citocina proinflamatória (STEIN & GORDON, 1991) envolvida na patogênese da LV e de outras doenças parasitárias e bacterianas (GRAU et al., 1989; SARNO et al., 1991).

Esta citocina junto com a IL-2 tem sido mostrada como importante para a resposta imune e para a morte das leishmanias e a sua ausência representa o defeito chave na resposta imune a LV (CARVALHO et al., 1985). A produção de INF- γ no período inicial da infecção humana por *L. (L.) chagasi*, foi associada à capacidade do hospedeiro em prevenir a progressão da doença (CARVALHO et al., 1992), pois esta citocina é crítica para a proteção inata ou adquirida (CARVALHO et al., 1992; MURRAY et al., 1992). Estudos mostraram que a inabilidade para o controle da replicação de *L. (L.) donovani*, no início da infecção em camundongos, foi associada à baixa capacidade das células esplênicas em produzir *in vitro* INF- γ (KAYE; CURRY; BLACKWELL, 1991).

CARVALHO et al. (1994) demonstraram *in vitro* que a restauração da resposta linfoproliferativa para o antígeno de *Leishmania* sp. ocorreu pela adição de IL-2 e INF- γ nas culturas de linfócitos. Os possíveis papéis destas citocinas na restauração da resposta pelas células T, incluem: o aumento da expressão das moléculas de MHC de classe II nas APCs (REINER et al., 1988), a regulação negativa da produção de IL-4 e IL-10 (MOSMANN & COFFMAN, 1987) e o aumento da ativação de macrófagos (LIEW et al., 1989).

O INF- γ desenvolveu um papel central na limitação do crescimento de *Leishmania* sp. em macrófagos murinos e humanos e foi limitante da progressão das leishmanioses (CARVALHO et al., 1992; MURRAY et al., 1992). Assim, a modulação sistêmica ou localizada dos níveis de INF- γ pode ser um determinante crítico da resolução da enfermidade (MURRAY et al., 1992). Apesar de sua importância no controle da enfermidade, somente INF- γ não foi suficiente para eliminar o parasito, pois houve necessidade também da produção de IL-12, migração de células T e células dendríticas para os sítios de parasitismo crônico (MELBY et al., 2001).

A apoptose de células T foi mostrada na LV experimental, em uma porcentagem de 40% de células TCD4+ de camundongos susceptíveis, concomitante a significativa queda na secreção de IL-2 e INF- γ durante a infecção por *L. (L.) donovani*, estando estes eventos relacionados à imunossupressão (DAS et al., 1999).

O nível de INF- γ quando analisado isoladamente, não foi um bom indicador de resistência à enfermidade ou da eventual cura (KARP et al., 1993; CHAMIZO; MORENO; ALVAR, 2005), porque cães infectados com *L. (L.) chagasi*, apresentando ou não sintomatologia manifesta, acumularam níveis similares de INF- γ no soro e na medula óssea (QUINNELL et al., 2001). A produção de INF- γ foi fortemente associada à produção de anticorpos, o que sugeriu uma grande regulação positiva de resposta imune antileishmania no hospedeiro infectado (QUINNELL et al., 2001).

WILSON et al. (1996) observaram que a carga parasitária no início da infecção apresentou-se elevada no fígado, diminuindo espontaneamente, ao passo que no baço a multiplicação se manteve baixa, indicando que a *L. (L.) chagasi* promoveu replicação

eficiente no fígado, dos camundongos infectados, sugerindo que a ausência de INF- γ no fígado e presença no baço foi o que permitiu ou inibiu respectivamente a sobrevivência do parasito, nestes diferentes órgãos.

SANTOS-GOMES et al. (2002), observaram em células mononucleares do sangue periférico, de cães inoculados com formas amastigotas de *L. (L.) infantum*, uma baixa proporção destes cães infectados, não estimulados ou especificamente estimulados, que mostraram a expressão de IL-12, IL-2 e INF- γ e este resultado quando associado à baixa detecção de IL-10, foi sugerido como ocorrência de um “estabelecimento de silêncio” do parasito. Assim, a produção de INF- γ esteve elevada por um breve período durante a fase prepatente na infecção experimental e foi ausente durante a fase sintomática. Foi observada também produção de INF- γ em cães não infectados, mas somente na cultura de células estimuladas pela concanavalina A.

No estudo realizado por MELBY et al. (2001) em camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) donovani* foi observado o aumento na produção de INF- γ e IL-12, várias semana após a infecção, ao mesmo tempo em que a carga parasitária do baço e do fígado declinou.

HOLZMULLER et al. (2005) mostraram que cães imunizados com antígeno purificado de promastigotas de *L. (L.) infantum* exibiram uma eficiente resposta imune celular *in vitro* contra a infecção, caracterizada pelo aumento da atividade leishmanicida do INF- γ , que ativou macrófagos, induzindo a produção de grandes quantias de óxido nítrico, um potente leishmanicida, com atividade tanto *in vitro* como *in vivo*.

STRAUSS-AYALI et al. (2005) verificaram que as células mononucleares do sangue periférico de cães experimentalmente infectados por *L. (L.) infantum* proliferaram e produziram INF- γ . Em cães naturalmente infectados proliferaram, mas não produziram INF- γ , entretanto, em cães controle, não proliferaram nem produziram INF- γ . Quando foi realizado o estímulo destas células com IL-12 exógeno, houve uma tendência no aumento da proliferação e considerável aumento na expressão e produção de INF- γ em todos os cães infectados, pois a IL-12 favorece a resposta imune

do tipo Th1, como a ativação de macrófagos e células NK, além de induzir a produção de $\text{INF-}\gamma$ (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1997).

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar citocinas, pertencentes ao padrão Ta1 e Ta2, em cães machos, assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*; e observar a modulação da resposta imunológica.

3.2. Objetivos Específicos

- Quantificar a produção de TGF- β_1 no sobrenadante de células esplênicas e no sobrenadante do extrato de baço e de fígado, de cães machos, assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*.
- Quantificar a produção das citocinas IL-10 e IFN- γ , no extrato de baço e de fígado, de cães machos, assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de Estudo

O estudo foi conduzido na cidade de Araçatuba, oeste do estado de São Paulo, local endêmico da enfermidade Leishmaniose Visceral Canina (LVC).

4.2. Animais

Foram utilizados 30 cães (*Canis familiares*) machos, adultos (idade variando de 2 a 5 anos), de várias raças ou sem raça definida, de vários pesos, estado nutricional variando de caquético a sadio, provenientes do canil do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Araçatuba.

4.3. Grupos Experimentais

Os cães passaram por uma triagem pelo método de ELISA indireto de acordo com LIMA et al. (2003), e apenas aqueles que se apresentaram soropositivos na reação utilizando antígeno para *L. (L.) chagasi* foram subdivididos em dois grupos de 15 cães cada um, de acordo com a avaliação prévia baseada no exame físico e clínico (Apêndice A). Os grupos foram classificados como:

Grupo de cães assintomáticos – grupo de cães que não apresentaram sintomatologia manifesta.

Grupo de cães sintomáticos – grupo de cães que apresentaram pelo menos três sinais clínicos característicos da LVC, tais como: perda de peso, caquexia, apatia, linfadenomegalia, hepato-esplenomegalia, alterações dermatológicas (queda de pêlos, lesões ulcerativas, prurido intenso, pelame opaco e dermatite seborréica), conjuntivite, uveíte, hipertermia, onicogrifose, emaciação, êmese e diarreia.

4.4. Obtenção de Materiais

A obtenção dos materiais foi precedida do procedimento de eutanásia, segundo o seguinte protocolo:

- tranquilização prévia com maleato de acepromazina¹, administrado na dose de 0,05 mg/kg, pela via intramuscular;
- intervalo de 15 minutos;
- indução anestésica pela administração de tiopental sódico², na dose de 15 mg/kg, pela via intravenosa (injeção rápida – 20 segundos);
- administração do cloreto de potássio³, uma ampola de 10 ml, pela mesma via.

Foram obtidas amostras de sangue total, pela punção venosa cefálica ou pela punção cardíaca direta, que foram acondicionadas sob refrigeração e centrifugadas para separação do soro, utilizado para a triagem dos cães positivos para LVC. Um fragmento de baço foi separado em um tubo com solução de PBS e antibióticos

¹ Acepran ® 0,2% - Univet S/A

² Thiopentax ® 0,5 g/1 g – Lab. Cristália

³ Cloreto de Potássio 10 ml – 19,1% - Darrow

(Penicilina e Estreptomicina⁴ - 0,1 ml/l), sendo colocado sob refrigeração, para realizar o cultivo de células brancas e avaliação do TGF- β_1 *in vitro*. Outro fragmento de baço e um fragmento de fígado foram congelados imediatamente após a colheita, em nitrogênio líquido para avaliação das citocinas *ex vivo*, IL-10 e INF- γ . Todo material foi obtido de forma asséptica, de acordo com as condições oferecidas no local da coleta.

No Brasil, o Ministério da Saúde adota como medida de controle e prevenção da LVC a eutanásia de todos cães infectados.

4.5. Sorologia para Leishmaniose

O teste de ELISA indireto foi realizado com o objetivo de selecionar os cães utilizados no experimento, identificando os que apresentavam título de anticorpos para *L. (L.) chagasi*. Os cães que apresentaram títulos baixos foram excluídos do experimento. O ponto de corte, cut-off considerado para o ensaio foi de 0,270 determinado pela média mais três vezes o desvio-padrão. Este foi obtido das amostras de soro, do grupo de cães saudáveis, de áreas não endêmicas (VOLLER; BIDWELL; BUREK, 1980).~~um grupo de cão soro positivo de área endêmica, a média + 3 desvio padrão (Rhalem et al, 1999).~~

As microplacas de poliestireno de 96 poços (Costar, EUA) foram sensibilizadas com 50 μ l por poço, da solução de 20 μ g/ml de proteína de lisado total de promastigotas de *L. (L.) chagasi* em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6) (Apêndice B), incubadas a 4 °C por toda à noite.

Após a sensibilização as placas foram lavadas por três vezes com PBS acrescido de 0,05% de Tween 20, pH 7,2 (PBS T 20) (Apêndice B) e bloqueadas com 150 μ l por poço, de PBS acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) (Apêndice B), por

⁴ Penicilina – 10000 UI/ml e Estreptomicina – 10 mg/ml - CULTILAB

1 hora, à temperatura ambiente. Em seguida as placas foram lavadas como descrito anteriormente.

As amostras foram diluídas em PBS T 20 acrescido de 10% de SFB, na diluição de 1:400. A mesma diluição foi realizada para os controles positivos e negativos. Foram adicionados 100 µl de amostras e padrões, por poço, em triplicata. Esta etapa do ensaio foi incubada durante três horas, à temperatura ambiente e em seguida a placa foi lavada como já descrito.

Posteriormente, foram adicionados 100 µl, por poço, de anticorpo anti-IgG de cão conjugado à peroxidase [\(Sigma, EUA\)](#) diluído em PBS T 20 (1:1000). A incubação foi realizada por 1 hora, à temperatura ambiente e em seguida a placa foi lavada novamente. As placas foram cobertas com 100 µl, por poço, da solução reveladora composta pelo substrato o-[phenylenediamine](#) dihydrochloride [\(OPD\) \(Sigma, EUA\)](#) ~~PD (0,4 mg/ml,)~~ água oxigenada (H₂O₂), ácido cítrico (0,1 M) e fosfato de sódio dibásico (0,2 M) (Apêndice B), e permaneceram à temperatura ambiente até a revelação e o momento de leitura.

A reação ocorreu em cinco minutos, em ambiente escuro e foi interrompida pela adição de 50 µl, por poço, de ácido clorídrico 1 N. A leitura foi realizada em espectrofotômetro para microplacas de 96 poços, Spectra Count TM (Packard Bio Science Company, [EUA](#)), utilizando-se filtro para comprimento de onda de 492 nm.

4.6. Cultura de Células Brancas Esplênicas

A cultura de células brancas esplênicas foi realizada para a obtenção do sobrenadante de 24 horas, para quantificação do TGF-β₁ ativo naturalmente produzido *in vitro*. O material coletado foi imediatamente processado em fluxo laminar estéril. Os fragmentos de baço (3 cm x 3 cm) foram macerados em meio RPMI-1640 completo (Sigma, EUA) (Apêndice D), ~~(Gibco, Paisley, UK) Meio para Cultura Celular~~ pH 7,2, em uma placa de Petri, em seguida centrifugados a 4 °C, 3000 rpm, por 10 minutos. O

sobrenadante foi desprezado e o sedimento lisado por 5 minutos com tampão de lise gelado (Apêndice D), alternando-se entre o agitador de tubos (Phoenix – Brasil) e o recipiente contendo gelo, para que ocorresse a lise das hemácias. Para algumas amostras o procedimento de lise foi repetido, para que se obtivesse um sedimento homogêneo.

Após a lise o sedimento foi lavado, por três vezes, com PBS estéril, centrifugando a 4 °C, 3000 rpm, por 10 minutos a cada vez e suspenso em 1 ml de meio RPMI-1640 completo. Para a contagem em câmara de Neubauer (Loptik Labor, Alemanha), foi realizada a diluição de 1:1000. As células brancas foram plaqueadas na quantidade de 5×10^6 células/poço, em placas de 24 poços (TPP-92024, Suíça) e incubadas por 24 horas a 37 °C em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO₂. Após o término da incubação o sobrenadante foi coletado, centrifugado e armazenado a -80 °C (Revco, USA).

4.7. Extrato de Baço e de Fígado

A obtenção dos extratos foi necessária para que se pudesse posteriormente quantificar as citocinas, *ex vivo*, ~~citocinas como~~ IFN- γ , IL-10 e TGF- β_1 , pela técnica de ELISA de captura. Para tal foi pesado 1 g dos fragmentos dos órgãos (baço e fígado), que estavam congelados em nitrogênio líquido e adicionados ~~descongelados~~ para obtenção do eluato do órgão 2 ml de meio RPMI-1640 completo (Sigma, EUA) ~~(Gibco, Paisley, UK) Meio para Cultura Celular,~~ pH 7,2. O material foi ~~ram~~ triturado em homogeneizador de tecidos (Ultraturrax T8, Alemanha), na velocidade máxima do aparelho, por aproximadamente 5 minutos ~~mantidos em gelo~~ ou até que se obtivesse um material homogêneo, e mantido em gelo, para a preservação das citocinas. Posteriormente, o homogeneizado eluato do órgão foi centrifugado à 10.000 g, por 15 minutos a 4 °C, e o sobrenadante ~~do eluato~~ imediatamente armazenado ~~aa~~ a -80 °C (Revco, USA).

4.8. Western Blot

A técnica foi utilizada para validar o uso do kit comercial humano de ELISA que quantifica TGF- β_1 ativo (Promega Corporation, EUA) para realização do ensaio em cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*. Como o TGF- β_1 ativo é encontrado no soro, foram obtidas amostras de soro humano e canino (macho e fêmea) e suas proteínas separadas por SDS-PAGE 10% e eletrotransferidas (Biorad, EUA) para uma membrana de nitrocelulose (Apêndice E).

A membrana foi bloqueada com PBS (0,01 M, pH 7,2), acrescido de 5% de leite desnatado, incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Após cinco lavagens com PBS (0,01 M, pH 7,2), a membrana foi incubada por 2 horas com anticorpo monoclonal anti-TGF- β_1 em solução bloqueadora (1:1000)

. Após outras cinco lavagens de 10 minutos cada, foi realizada nova incubação por 2 horas com anti-IgG de rato policlonal conjugado à biotina (PharMigen, EUA), diluído 1:500. A reação foi amplificada por uma solução de estreptavidina-biotina peroxidase (DAKO Corporation, Dinamarca), preparada em uma diluição de 1:150, 30 minutos antes de ser utilizada, de acordo com as recomendações do fabricante, sendo incubada por 45 minutos. Após as últimas cinco lavagens, a membrana foi revelada com solução de PBS (0,01 M, pH 7,2) contendo 1 mg/ml de diaminobenzedina (DAB) (Vector Laboratories, EUA) e 30 μ l de água oxigenada (H₂O₂).

4.9. Quantificação do TGF- β_1

A quantificação do TGF- β_1 ativo foi realizada a partir do extrato de baço e de fígado e também a partir do sobrenadante de 24 horas, de células brancas esplênicas cultivadas. Para avaliação do TGF- β_1 ativo, foi realizado o ensaio ELISA de captura, utilizando-se o kit comercial humano para detecção de TGF- β_1 (Promega Corporation, EUA). O ensaio foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante.

A sensibilização das placas (Nalgene Nunc Internacional, EUA), foi realizada com 50 μ l da solução, por poço, de anticorpo monoclonal anti-TGF- β_1 em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6) (Apêndice F), incubadas a 4 °C por toda a noite.

Após a sensibilização as placas foram lavadas por três vezes, com tampão de lavagem de TGF- β_1 (Apêndice F), em seguida foi realizado o bloqueio pela adição de tampão bloqueio de TGF- β_1 , sendo 135 μ l, por poço. A incubação foi realizada por 35 minutos, a 37 °C. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes, do modo já descrito.

As amostras foram adicionadas na placa (50 μ l/poço), sem diluição, em triplicata. A curva-padrão do ensaio, foi preparada com o padrão de TGF- β_1 em tampão de diluição de amostra de TGF- β_1 , diluído 1:1000. A concentração de TGF- β_1 para elaboração da curva-padrão foi de 2000 pg/ml. Esta etapa do ensaio foi incubada por 90 minutos, a 37 °C e posteriormente lavada, por cinco vezes, como a anterior.

Foi adicionada à placa 50 μ l da solução, por poço, de anticorpo policlonal anti-TGF- β_1 em tampão de diluição de amostra de TGF- β_1 , diluído 1:1000. A incubação foi realizada por duas horas, à temperatura ambiente e a placa foi novamente lavada como descrito anteriormente.

Foi adicionada a placa 50 μ l da solução, por poço, de conjugado de TGF- β_1 ligado a peroxidase em tampão de diluição de amostra de TGF- β_1 , diluído 1:100. A incubação e a lavagem seguiram a etapa anterior.

As placas foram cobertas com 50 μ l, por poço, de solução reveladora composta pelo substrato 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (TMB), incubadas por 15 minutos, à temperatura ambiente. A solução de HCl 1 N foi utilizada para interromper a reação.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro para microplacas de 96 poços, Spectra Count TM - (Packard Bio Science Company, EUA), utilizando ~~com~~ filtro para o comprimento de onda de 450 nm. A sensibilidade mínima do ensaio foi de 580 pg/ml.

4.10. Quantificação da IL-10 e do INF- γ

A quantificação do IL-10 e do INF- γ foi realizada a partir do extrato de baço e de fígado, pelo ensaio ELISA de captura, utilizando anticorpos comerciais monoclonais e anticorpos policlonais biotinilados (R&D Systems, EUA), seguindo as recomendações do fabricante (Apêndice G).

A sensibilização da placa (Maxisorb, Nunc Internacional, EUA), foi realizada com 50 μ l da solução, por poço, de anticorpo de captura para IL-10 (0,5 μ g/ml) e para INF- γ (0,5 μ g/ml) em PBS (pH 7,4), incubadas à temperatura ambiente por toda noite.

Após a sensibilização as placas foram lavadas, por três vezes, com PBS (pH 7,4) acrescido de 0,05% de Tween 20 (PBS T 20) e bloqueadas pela adição de 200 μ l, por poço, de PBS (pH 7,4), 1% de albumina sérica bovina (BSA), 5% de sucrose e 0,05% azida sódica (NaN_3), por 1 hora, em temperatura ambiente. Em seguida as placas foram lavadas como descrito anteriormente.

As amostras foram adicionadas à placa 100 μ l, por poço, sem diluição, em triplicata. A curva-padrão do ensaio foi preparada com citocina recombinante: IL-10 ou INF- γ do mesmo fabricante dos anticorpos (R&D Systems, EUA) em tampão de PBS (pH 7,4) acrescido de 1% de BSA, diluído 1:10. A curva-padrão foi iniciada em 10000 pg/ml para IL-10 e em 7500 pg/ml para INF- γ . Esta etapa do ensaio foi incubada por 2 horas, à temperatura ambiente e lavada como na etapa anterior.

Para detecção das citocinas foram adicionados à placa 100 μ l da solução, por poço, de anticorpo de detecção biotinilado anti-IL-10 (0,125 μ g/ml) ou anti-INF- γ (0,125 μ g/ml) em PBS (pH 7,4) acrescido de 1% de BSA. ~~(Sigma, USA)~~ A incubação e a lavagem seguiram as condições da etapa anterior.

Para a amplificação da reação foi adicionado de 100 µl, por poço, da solução de estreptavidina-biotina peroxidase (DAKO Corporation, Dinamarca) em tampão de PBS (pH 7,4) acrescido de 1% de BSA, diluída 1:500 e incubado 30 minutos, à temperatura ambiente e em seguida lavada como na etapa anterior.

Em seguida as placas foram cobertas com 100 µl, por poço, de solução reveladora composta pelo substrato 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (TMB) (Promega Corporation, EUA), incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. A solução de ácido clorídrico 1 N foi utilizada para interromper a reação.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro, Spectra Count TM - (Packard Bio Science Company, EUA), utilizando-se ~~com~~ filtro para o comprimento de onda de 490 nm. A sensibilidade mínima no ensaio de IL-10 foi de 380 pg/ml e no de INF-γ foi de 9,6 pg/ml.

4.11. Análise Estatística

As médias obtidas em cada grupo de cães (assintomático e sintomático), para cada variável (quantificação de TGF-β₁ no baço, no fígado e na cultura; quantificação de IL-10 no baço e no fígado e quantificação de INF-γ no baço e no fígado) são advindas da média da tréplica de cada animal componente do mesmo. Essas médias, foram submetidas à análise de variância, considerando que o modelo linear geral proposto incluiu o efeito fixo de status, em dois níveis (assintomático e sintomático). Para atender as pressuposições básicas para a realização do teste (normalidade dos resíduos e homocedasticidade), valores menores que zero foram desconsiderados (para TGF-β₁ da cultura, INF-γ no baço e no fígado) e as variáveis TGF-β₁ do baço e do fígado, IL-10 do baço e do fígado e INF-γ do baço foram submetidas à transformação logarítmica, e a variável INF-γ do fígado em raiz quadrada. O nível de significância considerado foi de 5%.

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

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

V. RESULTADOS

5.1. ELISA INDIRETO

A realização do ensaio de ELISA indireto das amostras de soro de cães machos provenientes do CCZ, permitiu a seleção desses animais, inicialmente pela presença ou ausência de títulos de anticorpos para [L. \(L.\) chagasi](#). Os cães que apresentaram a densidade óptica (DO) maior que o ponto de corte de 0,270, foram considerados positivos e aqueles que apresentaram DO menor, foram considerados negativos.

Os cães negativos foram excluídos do experimento e os cães positivos participaram de nova seleção com base na presença ou não de sintomatologia manifesta, observada no momento de obtenção do material, pelo exame físico e clínico do mesmo, sendo divididos em dois grupos assintomáticos e sintomáticos, já descritos anteriormente (Apêndice C).

5.2. Western Blot

A análise do kit comercial humano de ELISA para TGF- β_1 ativo (Promega Corporation, EUA) pela reação de Western Blot contra amostras de soro canino, de ambos os sexos, possibilitou a observação de que o anticorpo anti-TGF- β_1 humano, apresentou reatividade cruzada com o anticorpo anti-TGF- β_1 canino (Fig.1). Isto permitiu, por sua vez, a utilização do kit comercial humano para análise do TGF- β_1 canino, nas amostras de soro de cães machos, assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por [L. \(L.\) chagasi](#).

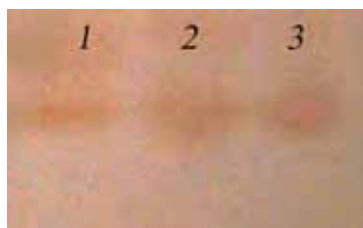


Figura 1. Análise de Western Blot de amostras de soro das espécies humana e canina, separadas por SDS-PAGE 10%. Todas as amostras apresentaram bandas de peso molecular similar, indicando reatividade cruzada (1- amostra de soro humano; 2- amostra de soro canino fêmea; 3- amostra de soro canino macho).

5.3. Quantificação do TGF- β_1

Após verificada a reatividade cruzada entre os anticorpos anti-TGF- β_1 humano e canino, foi realizada a quantificação de TGF- β_1 no extrato de baço e de fígado, nos dois grupos de cães estudados. Foram encontradas diferenças significantes entre os cães assintomáticos e os sintomáticos, nos dois extratos de órgãos avaliados ($P < 0,05$). O grupo de cães assintomáticos apresentou quantidades médias superiores de TGF- β_1 , em uma proporção 1,5 vezes maior, tanto no extrato de baço quanto no extrato de fígado, quando comparado ao grupo de cães sintomáticos (Tab.1 e Fig 2.).

Tabela 1. Quantificação do TGF- β_1 no extrato de baço e de fígado. Média e desvio-padrão do grupo de cães assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, obtidos no ensaio de ELISA de captura.

Grupo de cães	TGF- β_1 no extrato de baço (pg/ml)	TGF- β_1 no extrato de fígado (pg/ml)
assintomáticos	15335,32 $\pm$ 5052,11 ^a	5934,88 $\pm$ 2566,03 ^A
sintomáticos	11789,23 $\pm$ 2745,57 ^b	3671,05 $\pm$ 1122,49 ^B

a, b / A, B médias seguidas de letras distintas diferem significativamente entre si ($P < 0,05$) pela análise de variância.

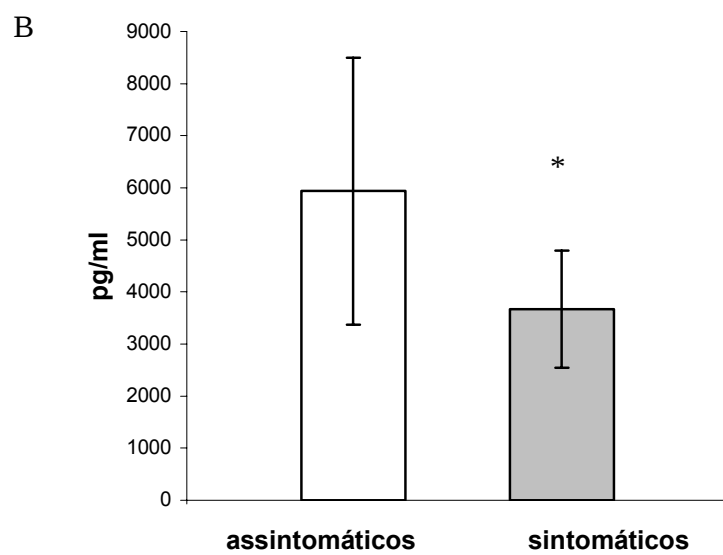
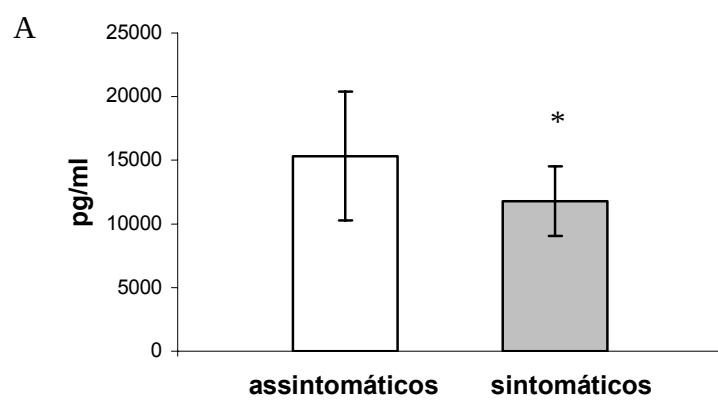


Figura 2. Produção de TGF- β_1 , médias e desvios-padrão, no extrato de baço (A) e de fígado (B), de cães machos, assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, quantificada por ELISA de captura. O teste de análise de variância indicou diferença estatística entre os dois grupos de cães estudados ($P < 0,05$) (*).

Ao se analisar a produção média de TGF- β_1 no extrato de baço e no extrato de fígado dos cães assintomáticos, foi detectada no extrato de baço uma concentração média desta citocina, três vezes superior ao extrato de fígado. A mesma análise foi realizada para os cães sintomáticos e também foi detectada uma produção três vezes maior desta citocina no extrato de baço em relação ao extrato de fígado. Em resumo, o extrato de baço mostrou produção média mais elevada de TGF- β_1 , nos dois grupos estudados.

A produção de TGF- β_1 foi detectada no sobrenadante de cultura de células brancas esplênicas, tendo sido observada diferença significativa entre as médias de produção nos dois grupos de cães estudados ($P < 0,05$). O grupo de cães sintomáticos apresentou o dobro da produção média deste citocina, em relação ao outro grupo de estudo (Tab.2 e Fig. 3).

Tabela 2. Quantificação do TGF- β_1 no sobrenadante de cultura de células brancas esplênicas. Média e desvio-padrão do grupo de cães assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, obtidos no ensaio de ELISA de captura.

Grupo de cães	TGF- β_1 no sobrenadante de cultura de células brancas esplênicas (pg/ml)
assintomáticos	5334,88 $\pm$ 3434,89 ^a
sintomáticos	9872,34 $\pm$ 4889,68 ^b

^{a, b} médias seguidas de letras distintas diferem significativamente entre si ($P < 0,05$) pela análise de variância.

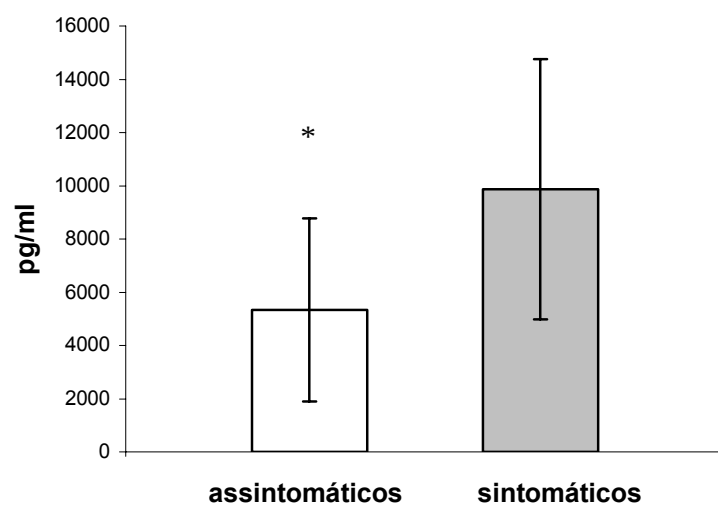


Figura 3. Produção de TGF- β_1 , médias e desvios-padrão, no sobrenadante de cultura de células brancas esplênicas, de cães machos, assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, quantificada por ELISA de captura. O teste de análise de variância indicou diferença estatística entre os dois grupos de cães estudados ($P < 0,05$) (*).

Os resultados *ex vivo* apontaram para uma produção média de TGF- β_1 superior no grupo de cães assintomáticos e o resultado *in vitro*, por outro lado, apontou para uma produção média maior no grupo de cães sintomático.

5.4. Quantificação da IL-10

Foi detectada a presença da citocina IL-10 nos extratos de baço e de fígado obtidos dos dois grupos estudados (Tab.3 e Fig.3) e, embora os níveis detectados desta citocina não tenham apresentado diferenças estatísticas significantes ($P < 0,05$), níveis de produção altos foram registrados.

Tabela 3. Quantificação do IL-10 no extrato de baço e de fígado. Média e desvio-padrão do grupo de cães assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, obtidos no ensaio de ELISA de captura.

Grupo de cães	IL-10 no extrato de baço (pg/ml)	IL-10 no extrato de fígado (pg/ml)
assintomáticos	10782,73 ± 10482,10 ^a	61112,72 ± 35040,97 ^A
sintomáticos	12612,58 ± 6063,86 ^a	62749,23 ± 18943,00 ^A

a, a / A, A médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente entre si ($P < 0,05$) pela análise de variância.

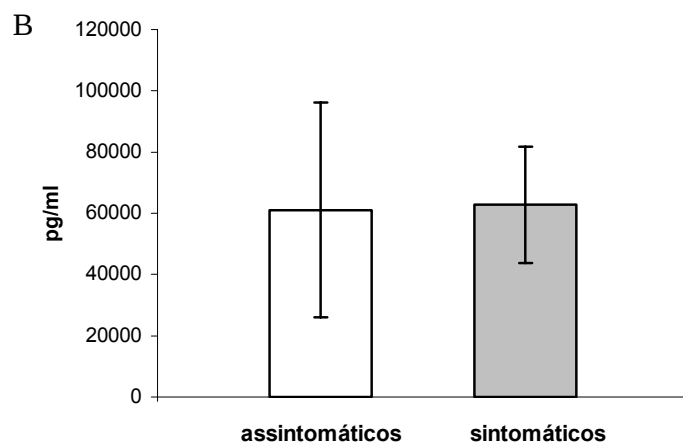
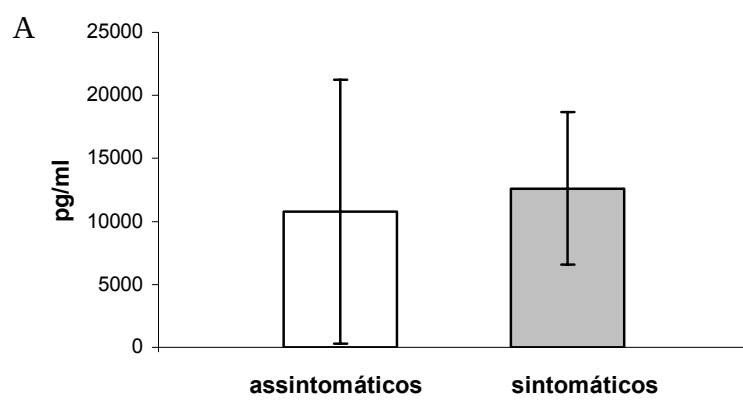


Figura 4. Produção de IL-10, médias e desvios-padrão, no extrato de baço (A) e de fígado (B), de cães machos, assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, quantificada por ELISA de captura. O teste de análise de variância não indicou diferença estatística entre os dois grupos de cães estudados ($P < 0,05$).

Ao se analisar a produção média de IL-10 no extrato de baço e no extrato de fígado, em cães assintomáticos, foi observada uma concentração média desta citocina, cinco vezes maior no extrato de fígado. A mesma análise foi feita no grupo sintomático e obteve-se resultado similar ao anterior.

5.5. Quantificação do INF- γ

A presença da citocina INF- γ foi observada no extrato de baço e de fígado, tendo sido registradas diferenças significantes entre os dois grupos de cães estudados, nos extratos dos dois órgãos avaliados ($P < 0,05$). A avaliação do extrato de baço mostrou que os cães do grupo sintomático produziram valores médios superiores de INF- γ , em uma proporção de 5,5 vezes maior, quando comparado ao grupo de cães assintomáticos. A avaliação do extrato de fígado, por sua vez, mostrou valores médios superiores no grupo de cães assintomáticos, em uma proporção de 2,4 vezes maior em relação aos cães do outro grupo (Tab.4 e Fig.5)

Tabela 4. Quantificação do INF- γ no extrato de baço e de fígado. Média e desvio-padrão do grupo de cães assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, obtidos no ensaio de ELISA de captura.

Grupo de cães	INF- γ no extrato de baço (pg/ml)	INF- γ no extrato de fígado (pg/ml)
assintomáticos	52.70 $\pm$ 43.30 ^a	12135.41 $\pm$ 7933.02 ^A
sintomáticos	286.04 $\pm$ 226.90 ^b	5057.57 $\pm$ 4046.38 ^B

^{a,b} / ^{A, B} médias seguidas de letras distintas diferem significativamente entre si ($P < 0,05$) pela análise de variância.

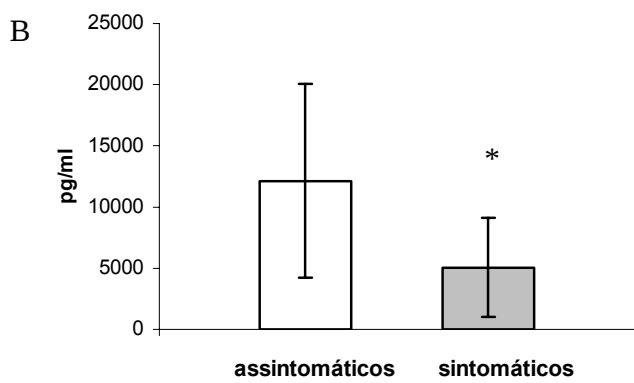
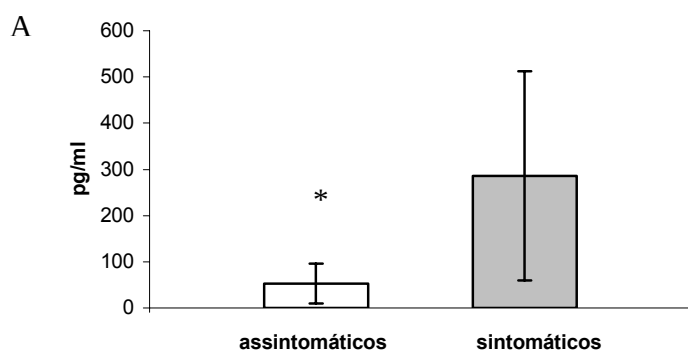


Figura 5. Produção de INF- γ , médias e desvios-padrão, no extrato de baço (A) e de fígado (B), de cães machos, assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, quantificada por ELISA de captura. O teste de análise de variância indicou diferença estatística entre os dois grupos de cães estudados ($P < 0,05$) (*).

Ao se comparar a produção média de INF- γ no extrato de baço e no extrato de fígado nos cães assintomáticos, foi observada uma concentração média desta citocina 230 vezes maior no extrato de fígado, e quando a mesma análise foi feita nos cães sintomáticos, a concentração média observada foi 18 vezes maior no mesmo tipo de amostra. Em resumo, observou-se maior produção média de INF- γ no extrato de fígado.

VI. DISCUSSÃO

6.1. Considerações Gerais

Foram estudados 30 cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, provenientes da cidade de Araçatuba, SP, divididos em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de sintomatologia. O estudo das citocinas tem sido realizado com frequência, por serem consideradas importantes para o diagnóstico de enfermidades, na investigação da imunidade protetora, na modulação da resposta imune a vacinas e no desenvolvimento de modelos pré-clínicos para as doenças humanas (SCHEERLINCK & YEN, 2005).

Neste trabalho, pretendeu-se quantificar as citocinas TGF- β_1 , IL-10 e INF- γ na LVC. A principal razão que levou à realização deste estudo foi à inexistência de citações na literatura de experimentos quantitativos destas citocinas na enfermidade e espécie em questão.

6.2. TGF- β_1

Os resultados do Western Blot confirmaram a reatividade cruzada entre o anticorpo monoclonal anti-TGF- β_1 ativo humano e o anti-TGF- β_1 ativo canino, como observado

por VERCELLI et al. (2003). Tal fato possibilitou avaliar a produção média de TGF- β_1 nos grupos de cães deste estudo.

A citocina TGF- β_1 é uma citocina regulatória importante na LVC. Foi associada à susceptibilidade (WILSON et al., 1998) e à progressão da doença em modelos murinos (BACELLAR et al., 2000). Em cães com LV, não há relatos sobre o seu papel imunorregulatório na enfermidade. Os nossos resultados mostraram que os grupos de cães estudados (assintomáticos e sintomáticos) produziram esta citocina e a sua produção foi observada *ex vivo* (Fig.2) e *in vitro* (Fig.3), o que levou a sugerir que a infecção por *Leishmania* sp. induz, por si própria, a produção desta citocina em cães, como afirmaram BARRAL-NETO et al. (1992) e BARRAL et al. (1993) ambos estudando a infecção em camundongos com *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) braziliensis*, respectivamente.

BARRAL-NETO et al. (1992), BRIGHT E SRIRAM (1998) e WILSON et al. (1998), observaram que a citocina TGF- β_1 foi capaz de inibir, entre outras coisas, o sinal que desencadeava a produção de INF- γ . Para complementar RODRIGUES; SILVA; CAMPOS-NETO (1998) em um estudo com hamsters inoculados com *L. (L.) donovani*, observaram níveis altos de TGF- β_1 produzidos pelo baço, *in vitro* e *ex vivo*. Nossos resultados demonstraram que a citocina TGF- β_1 teve sua produção média elevada no extrato de baço e neste mesmo local, foi observada uma produção baixa de INF- γ , o que nos faz sugerir que o TGF- β_1 inibiu a produção de INF- γ e também que o baço foi um grande produtor de TGF- β_1 . Tal fato pode estar associado à resposta imunológica não protetora observada em cães após a infecção.

Os níveis elevados de TGF- β_1 encontrados no baço dos cães deste trabalho explicam os achados de SANCHEZ et al. (2004) que em um estudo histopatológico de cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, assintomáticos e sintomáticos, sugeriram que há uma resposta imune órgão-específica em cães com LV, pois observaram no fígado de cães assintomáticos a presença de granuloma bem formado e infiltrado de células T efectoras e de memória, o que não foi observado no baço. É importante observar que o TGF- β_1 afeta a diferenciação das células T efectoras e de

memória (GOMES & DOS REIS, 2001), dificultando portanto, a formação de uma resposta imune adequada contra o parasito no baço.

BARRAL et al. (1993) observaram que a administração de TGF- β_1 exógeno em camundongos infectados experimentalmente por *L. (L.) braziliensis*, exacerbou a infecção e levou a produção de IL-10. Os nossos resultados estão de acordo, pois foram obtidos níveis altos das duas citocinas (TGF- β_1 e IL-10) que promovem o tipo de resposta imune humoral e que não está ligada a resolução da doença.

Por outro lado, a produção média elevada de TGF- β_1 *ex vivo* no grupo de cães assintomáticos, contrariando as expectativas, leva-nos a sugerir que exista a ação de algumas substâncias inibidoras de TGF- β_1 , ou mesmo a de fatores que levem ao consumo elevado desta no grupo de cães sintomáticos, em que detectamos sua baixa expressão. *In vitro*, a produção média foi elevada em sintomáticos, como prevíamos, talvez devido às condições “adequadas” de assepsia, atmosfera e temperatura, em que foi realizada a cultura.

6.3. IL-10

A produção das citocinas IL-10, *ex vivo*, foi encontrada no extrato de baço e de fígado (Fig.4), de cães assintomáticos e sintomáticos para LVC. A citocina IL-10 é a principal citocina que suprimiu a resposta imune protetora, em modelos murinos e humanos com leishmaniose visceral (LV) (BARRAL et al., 1993; BACELLAR et al., 2000), levando à progressão da doença com o aumento da expressão do parasito na célula (INIELTA et al., 2002).

Foi observada uma elevada produção média desta citocina em relação às outras estudadas, principalmente no extrato de fígado. BOGDAN; VODOVOTZ; NATHAN (1991), KARP et al. (1993), WILSON et al. (1998) e BACELLAR et al. (2000), afirmaram que esta citocina apresenta ação ampla em alguns dos mecanismos das células T, e além disso, é capaz de inibir a secreção de citocinas que ativam células Ta1. Os nossos

resultados apontaram uma produção média de INF- γ elevada no extrato de fígado, nos dois grupos de cães (assintomático e sintomático), mas em uma proporção cinco vezes menor da que foi encontrada para a IL-10 neste local. Isto indicaria que a produção de IL-10 no extrato de fígado talvez esteja inibindo a produção de INF- γ . Uma vez que o fígado foi o principal produtor de IL-10, é possível sugerir que esta seja a principal citocina regulatória na LVC.

A produção elevada de IL-10 relatada em cães assintomáticos e sintomáticos, condiz com o que observaram GHALIB et al. (1993) em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LV aguda. Isto nos faz sugerir que a resposta imune em cães seja semelhante à observada em pacientes humanos com a doença aguda. A produção alta de IL-10 observada talvez indique que os macrófagos e as células T, dos cães infectados, estejam produzindo IL-10 em resposta ao antígeno de leishmania e tal produção talvez seja importante para que o parasito persista nas células do hospedeiro.

A observação dos valores brutos de IL-10 indicou uma produção média maior pelo grupo de cães sintomáticos, semelhante a estudos em humanos, em que a severidade da doença e a lesão tecidual estão associadas aos níveis séricos altos de IL-10 (GHALIB et al., 1993; GASIM et al., 1998). De fato, as semelhanças observadas no desenvolvimento da resposta imunológica, entre os cães naturalmente infectados e pacientes com o quadro de LV aguda, sugerem o cão como modelo excelente para o estudo de novas terapias.

SANTOS-GOMES et al. (2002) observaram, em sangue periférico de cães inoculados com amastigotas de *L. (L.) infantum*, uma proporção baixa de cães que expressaram IL-10 e sugeriram que esta talvez não tenha efeito inibitório direto sobre o INF- γ . Os nossos resultados divergiram destes, pois foi observada em todos os cães estudados, assintomáticos e sintomáticos, a produção de IL-10. No entanto, é importante ressaltar que a infecção natural difere da experimental e que possivelmente o papel imunomodulatório inicial da saliva do flebotomíneo possa ser fundamental no desenvolvimento da resposta adaptativa subsequente (PARANHOS et al., 1993).

Nossos resultados indicaram a co-existência das citocinas IL-10 e INF- γ , nos dois grupos de cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, semelhante ao que foi observado na LVH (ANSARI; SALUJA; SALOTRA, 2006). A produção elevada de IL-10 poderia causar uma alteração na ativação dos macrófagos, o que levaria a um aumento na parasitemia e a progressão da doença.

6.4. INF- γ

A INF- γ é a citocina relacionada à resolução da enfermidade em humanos e em modelos murinos (WILSON et al., 1998), sendo importante na resposta imune e na morte das leishmanias (CARVALHO et al., 1985). Foi notada uma produção média inferior em relação às outras citocinas estudadas (Fig.5). A avaliação da produção média, obtida no extrato de baço, indicou que os cães do grupo sintomático produziram maior quantidade desta citocina, do que os do grupo assintomático. A cronicidade da doença no cão talvez esteja associada ao aumento do IFN- γ no baço.

A observação de que níveis altos de IFN- γ possam estar associados a um prognóstico desfavorável da doença no cão, indica uma falha na resposta à citocina, e tal fato é semelhante ao observado no homem, que apresentam nível elevado de INF- γ , nos casos em que a doença se prolonga pela ausência de resposta à terapia (ANSARI; SALUJA; SALOTRA, 2006). É interessante observar que, em humanos com LV, a baixa expressão do receptor para IFN- γ R1 já foi relatada (DASGUPTA et al., 2003) e em cães nenhum estudo foi ainda realizado.

QUINNELL et al. (2001) utilizando PCR–transcriptase reversa (RT-PCR), consideraram que os níveis de INF- γ , quando analisados isoladamente, não foram bons indicadores de resistência à doença, pois foram encontrados níveis similares de INF- γ em tecidos de cães assintomáticos e sintomáticos. Os nossos resultados foram semelhantes aos deste estudo, pois foi observada produção de INF- γ nos dois grupos

de cães estudados. A avaliação da produção média obtida no extrato de baço indicou que os cães do grupo sintomático produziram quantidade maior desta citocina. Os cães do grupo assintomático, por outro lado, produziram quantidade maior no extrato de fígado, o que nos faz sugerir que a análise do INF- γ , não seria um bom indicador do status da LVC ou de sua cura eventual, assim como demonstraram KARP et al. (1993) e CHAMIZO; MORENO; ALVAR (2005).

O fato dos cães assintomáticos deste estudo apresentarem níveis médios de INF- γ mais elevados no fígado sugere que estes estão respondendo de forma a resolver a infecção, como foi observado por WILSON et al. (1998) e SANCHEZ et al. (2004).

Poucos estudos demonstraram o perfil das citocinas em cães infectados por *L. (L.) chagasi*. Neste estudo quantitativo, foi observado que, de modo geral, os cães do grupo assintomático produziram quantidades médias de citocinas inferiores aos cães do grupo sintomático, evidenciando-se uma produção média maior de TGF- β_1 e IL-10. Caracterizando a predominância de uma resposta imune do tipo Ta2, semelhante ao sugerido por SANTOS-GOMES et al. (2002).

SANTOS-GOMES et al. (2002) observaram que, a resposta Ta1 foi capaz de retardar o início da doença, mas incapaz de controlá-la e CHAMIZO; MORENO; ALVAR (2005) também observaram que, embora ambos padrões de citocinas sejam produzidos em cães assintomáticos infectados por *Leishmania (L.) infantum*, a resposta Ta1 foi a que conferiu a imunidade ao parasito. Os resultados presentes demonstraram que tanto em cães do grupo assintomático quanto em cães do grupo sintomático, foi observada a produção da citocina Ta1 (INF- γ), em ambos os órgãos, mas houve predomínio das citocinas Ta2 (TGF- β_1 e IL-10), implicando, como mostraram QUINNELL et al (2001), que estas determinem a progressão da infecção e o aparecimento da sintomatologia.

Em suma, foi observada uma produção média maior de TGF- β_1 no baço e uma produção média maior de IL-10 e INF- γ no fígado. De modo geral, foram observadas produções baixas de INF- γ em ambos os órgãos avaliados, tal fato sugerindo, que as citocinas relacionadas ao padrão Ta2, IL-10 e TGF- β_1 , possam ter inibido a sua produção. Os cães assintomáticos e sintomáticos produzem citocinas pertencentes aos

dois padrões, Ta1 e Ta2 e, estando estas co-existindo na Leishmaniose Visceral Canina.

VII. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos da avaliação das citocinas TGF- β_1 , IL-10 e INF- γ no extrato de baço e de fígado e no sobrenadante de cultura de células brancas do baço, em cães machos assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, pelo método quantitativo, ELISA, permitiu-nos concluir que:

- As citocinas Ta1 (INF- γ) e Ta2 (TGF- β_1 , IL-10) estão sendo produzidas no baço, no fígado e também no sobrenadante de células brancas esplênicas, caracterizando portanto sua produção *ex vivo* e *in vitro*.
- Os cães assintomáticos apresentaram produção média maior de TGF- β_1 *ex vivo* e os cães sintomáticos *in vitro*.
- O baço apresentou produção média maior de TGF- β_1 *ex vivo*.
- O fígado apresentou produção média maior de IL-10 e INF- γ *ex vivo*.
- A imunidade adaptativa na LVC é órgão-específica.
- Níveis altos de IL-10 estão sendo produzidos por cães assintomáticos e sintomáticos na LVC.
- Os cães sintomáticos apresentaram produção média maior de INF- γ no baço e os assintomáticos, por outro lado, no fígado.

- As citocinas relacionadas aos dois padrões Ta1 e Ta2 co-existem na LVC.
- Os cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* tem maior habilidade em produzir resposta imune do tipo Ta2.

VIII. REFERÊNCIAS *

ABRANCHES, P. et al. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **J. Parasitol.**, United States, v.77, p.557-561, 1991.

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

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

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

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.**, Orlando, v.119, p.339-345, 2006.

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

BACELLAR, O. et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal Leishmaniasis patients. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 70, p.6734-6740, 2002.

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

BADARÓ, R. et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.154, p.1003-1011, 1986.

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

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

BELLONE, G. et al. Regulation of NK cell functions by TGF- β 1. **J. Immunol.**, Baltimore, v.155, p.1066-1073, 1995.

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

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

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

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

BRANTON, M.H., KOPP, J.B. TGF- β and fibrosis. **Microbes Infect.**, Paris, v.1, p.1349-1365, 1999.

BRASÍLIA (DF). Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (LV)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 122p.

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

CABRAL, M., O'GRADY, J., ALEXANDER, J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. **Parasite Immunol.**, Oxford, v.14, p.531-539, 1992.

CARVALHO, E.M. et al. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.76, p.2066-2069, 1985.

CARVALHO, E.M. et al. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani* chagasi. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.165, p.535-540, 1992.

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

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

CHATTERJEE, M et al. Distribution of IgG subclasses in antimonial unresponsive Indian kala-zar patients. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v.114, p.408-413, 1998.

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

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

COSTA, C.H., VIEIRA, J.B. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v.34, p. 223-228, 2001.

CZARNIECKI, C.W. et al. Transforming growth factor-beta 1 modulates the expression of class II histocompatibility antigens on human cells. **J. Immunol.**, Baltimore, v.140, p.4217-4223, 1988.

DAS, G. et al. *Leishmania donovani* infection of a susceptible host results in CD4+ T-cell apoptosis and decreased Th1 cytokine production. **Scand. J. Immunol.**, Oxford, v.49, p.307-310, 1999.

DASGUPTA, B. et al. Antileishmanial drugs cause up-regulation of interferon-gamma receptor 1, not only in the monocytes of visceral leishmaniasis cases but also in cultured THP1 cells. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, Liverpool, v.97, p.245-257, 2003.

DE WAAL MALEFYT, R. et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. **J. Exp. Med.**, New York, v.174, p.915-924, 1991a.

DE WAAL MALEFYT, R. et al. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J. Exp. Med.**, New York, v.174, p.1209-1220, 1991b.

DEPLAZES, P. et al. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite Immunol.**, Oxford, v.17, p.451-458, 1995.

DING, A. et al. Macrophages deactivating factor and transforming growth factors- β 1, - β 2, and - β 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by INF- γ . **J. Immunol.**, Baltimore, v.145, p.940-944, 1990.

EDWARDS, D.R. et al. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. **EMBO J.**, Oxford, v.6, p.1899-1904, 1987.

ENSERINK, M. Infectious diseases. Has leishmaniasis become endemic in the U.S.? **Science**, Washington, v.290, p.1881-1883, 2000.

ESPEVIK, T. et al. Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth factor beta. **J. Exp. Med.**, New York, v.166, p.571-576, 1987.

EVANS, T.G. et al. Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. **J. Immunol.**, Baltimore, v.151, p.907-915, 1993.

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

FERRER, L.M. Leishmaniasis. In: Kirk, R.W., Bonagura, J.D. **Kirk's Current Veterinary Therapy XI**. Philadelphia: W.B. Saunders, p.266-270, 1992.

FERRER, L.M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: Canine leishmaniasis: an update. Proceedings of International Canine Leishmaniasis Forum. 1999. Barcelona, Spain. Wiesbaden: Hoechst Roussel Vet 1999, Barcelona, p.6-10.

FIORENTINO, D.F., BOND, M.W., MOSMANN, T.R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J. Exp. Med.**, New York, v.170, p.2081-2095, 1989.

FIORENTINO, D.F. et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **J. Immunol.**, Baltimore, v.146, p.3444-3451, 1991.

GASIM, S. et al. High levels of plasma IL-10 and expression of IL-10 by keratinocytes during visceral leishmaniasis predict subsequent development of post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v.112, p.547, 1998.

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

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

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

GENARO, O. et al. *Leishmania visceral americana*. In: Neves, D.P. **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, 2003, p.37-53.

GENEVA (Switzerland). World Health Organization (WHO). **Control of Leishmaniasis**. Geneva: WHO, 1990. 102p.

GOMES, N.A., DOS REIS, G.A. The dual role of CTLA-4 in *Leishmania* infection. **Trends in Parasitol.**, Oxford, v.17, p.487-491, 2001.

GRAU, G.E. et al. tumor necrosis factor and other cytokines in cerebral malaria: experimental and clinical data. **Immunol. Rev.**, Copenhagen, v.112, p.49-70, 1989.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **Lancet.**, London, v.354, p.1191-1199, 1999.

HOLADAY, B.J. Immunotherapy for visceral leishmaniasis: ability of factors produced during anti-leishmania responses of skin test positive adults to inhibit peripheral blood mononuclear cell activities associated with visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, p.55-66, 1999.

HOLADAY, B.J. Role of CD8+ T cells in endogenous interleukin-10 secretion associated with visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.95, p.217-220, 2000.

HOLZMULLER, P. et al. Lymphocytes of dog immunized with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce INF-gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v.106, p.247-257, 2005.

HOWARD, M., O'GARRA, A. Biological properties of interleukin 10. **Immunol Today**, Amsterdam, v.13, p.198-200, 1992.

INIESTA, V. et al. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. **Parasite Immunol.**, Oxford, v.24, p.113-118, 2002.

IRAQ. World Health Organization (WHO). **Communicable Disease Profile**. Iraq: WHO, 2003. 105p.

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

KAYE, P.M., CURRY, A.J., BLACKWELL, J.M. Differential production of Th1- and Th2-derived cytokines does not determine the genetically controlled or vaccine-induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, Baltimore, v.146, p.2763-2770, 1991.

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

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

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

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

LEANDRO, C. et al. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v.79, p.273-284, 2001.

LIEW, F.Y. et al. Macrophage activation by interferon-gamma from host-protective T cells is inhibited by interleukin (IL)-3 and IL-4 produced by disease-promoting T cells in leishmaniasis. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, v.19, p.1227-1232, 1989.

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

LING, E.M., ROBINSON, D.S. Transforming growth factor-beta1: its anti-inflammatory and pro-fibrotic effects. **Clin. Exp. Allergy**, Oxford, v.32, p.175-178, 2002.

MARZOCHI, M.C.A., MARZOCHI, K.B.F., CARVALHO, R.W. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. **Parasitol. Today**, Amsterdam, v.10, p.37-40, 1994.

MASSAGUE, J. The transforming growth factor-beta family. **Annu. Rev. Cell Biol.**, Palo Alto, v.6, p.597-641, 1990.

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

MOORE, K.W. et al. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. **Science**, Washington, v.248, p.1230-1234, 1990.

MORENO, J., ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitol.**, Oxford, v.18, p.399-405, 2002.

MOSMANN, T.R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles the lymphokines activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, Baltimore, v.136, p.2348-57, 1986.

MOSMANN, T.R., COFFMAN, R.L. Two types of mouse helper T cell: implications for immune regulation. **Immunol. Today**, Amsterdam, v.8, p.223, 1987.

MOSSER, D.L., KARP, C.L. Receptor mediated subversion of macrophage cytokine production by intracellular pathogens. **Curr. Opin. Immunol.**, Philadelphia, v.11, p.406-411, 1999.

MULE, J.J. et al. Transforming growth factor-beta inhibits the in vitro generation of lymphokine-activated killer cells and cytotoxic T cells. **Cancer Immunol. Immunother.**, Berlin, v.26, p. 95-100, 1988.

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

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

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

MURRAY, H.W. et al. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. **Infect. Immun.**, Bethesda, v.70, p.6284-6293, 2002.

NANDAN, D., REINER, N.E. TGF-beta attenuates the class II transactivator and reveals an accessory pathway of IFN-gamma action. **J. Immunol.**, Baltimore, v.158, p.1095-1101, 1997.

NIETO, C.E. et al. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v.67, p.117-130, 1999.

OLIVEIRA, G.G.S., SANTORO, F., SADEGURSKY, M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.88, p.243-248, 1993.

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

PARANHOS, M. et al. Development of eosinophilia in dogs intradermally inoculated with sand fly saliva and *Leishmania (Leishmania) chagasi* stationary-phase promastigotes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.88, p.249-251, 1993.

PARANHOS-SILVA, M. et al. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.55, p.39-44, 1996.

PEARSON, R.D., SOUSA, A.Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.22, p.1-13, 1996.

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

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

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

RALPH, P. et al. IL-10, T lymphocyte inhibitor of human blood cell production of IL-1 and tumor necrosis factor. **J. Immunol.**, Baltimore, v.148, p.808-814, 1992.

REINER, N.E. et al. Kinetics of gamma interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in *Leishmania*-infected macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Washington, v.85, p.4330-4334, 1988.

REINER, S.L., LOCKSLEY, R.M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Annu. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v.13, p.151-177, 1995.

ROBERTS, A.B., MCCUNE, B.K., SPORN, M.B. TGF-beta: regulation of extracellular matrix. **Kidney Int.**, New York, v.41, p.557-559, 1992.

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

ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. Imunidade aos protozoários e vermes. In:_. 4.ed. **Imunologia**. São Paulo: Manole, 1997. p.18.1-18.19.

SACKS, D., NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in the mice. **Nat. Rev. Immunol.**, London, v. 11, p.845-858, 2002.

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

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

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

SARNO, E.N. et al. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v.84, p.103-108, 1991.

SCHEERLINCK, J.P.Y., YEN, H.H. Veterinary applications of cytokine. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v.108, p.17-22, 2005.

SEDER, R.A. et al. Factors involved in the differentiation of TGF-beta-producing cells from naive CD4+ T cells: IL-4 and IFN-gamma have opposing effects, while TGF-beta positively regulates its own production. **J. Immunol.**, Baltimore, v.160, p.5719-5728, 1998.

SILVA, J.S. et al. IL-10 and INF- γ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med.**, New York, v.175, p.169-174, 1992.

SILVA, E.S. et al. Visceral leishmaniasis in Metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, p.285-291, 2001.

SLAPPENDEL, R.J., FERRER, L. Leishmaniasis. In: Greene, C.E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1990. p.450-458.

SOLANO-GALLEG0, L. et al. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.96, p.265-276, 2001.

STEIN, M., GORDON, S. Regulation of tumor necrosis factor (TNF) release by murine peritoneal macrophages: role of cell stimulation and specific phagocytic plasma membrane receptors. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, v.21, p.431-437, 1991.

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

TRICHIERI, G. et al. Producer cells of interleukin-12. **Immunol. Today**, Amsterdam, v.14, p.237-238, 1993.

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

VOLLER, A., BIDWELL, D.E., BUREK, C.L. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to thyroglobulin. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, Malden, v.163, p.402-405, 1980.

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

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

WILSON, M.E. et al. Local suppression of IFN- γ in hepatic granulomas correlates with tissue-specific replication of *Leishmania chagasi*. **J. Immunol.**, Baltimore, v.156, p.2231-2239, 1996.

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

APÊNDICES

Apêndice A

Exemplo de Ficha Cadastral dos cães que foram selecionados para o experimento.

Número do cão : _____

DATA: __/__/__

Identificação: _____

Sexo: _____

Idade: _____

() assintomático

() sintomático

Sinais Clínicos observados:

() hepatomegalia

() esplenomegalia

() onicogrifose

() linfadenomegalia

() dermatites

() diarreia

() ulcerações

() febre _____

() emagrecimento

() prostração

() alopecia

() nódulos subcutâneos

() conjuntivites

() sinais neurológicos

() hemorragias.

Outros: _____

Resultado do exame sorológico: () positivo () negativo

DO: _____.

Observações: _____

Apêndice B

Soluções utilizadas para a realização da sorologia para Leishmaniose - teste de ELISA indireto:

Tampão Carbonato-bicarbonato

- 0,29% de NaHCO_3
- 0,15% de Na_2CO_3 em H_2O destilada

Ajustar o pH 9,6 com ácido cítrico.

Solução de PBS

- 0,8 % de NaCl
- 0,11% de Na_2HPO_4
- 0,02% de KH_2PO_4
- 0,02% de KCl em H_2O

Ajustar o pH 7,0.

Solução de PBS-Tween 20

- 0,05% de Tween-20 em PBS.

Tampão Bloqueio

- 1% (m/v) de BSA em PBS ou 10% SBF em PBS.

Tampão Bloqueio-Tween 20

- 0,05% de Tween-20 em tampão bloqueio.

Solução de Ácido Cítrico 0,1 M

- 1,92 g de ácido cítrico
- 100 ml de água destilada

Solução de Fosfato de Sódio dibásico 0,2 M

- 2,84 g de fosfato de sódio dibásico
- 100 ml de água destilada.

Solução de OPD

- 6,075 ml da solução de ácido cítrico 0,1 M
- 6,425 ml de solução de fosfato de sódio dibásico 0,2M
- 12,5 ml de água destilada
- 37,5 µl de H₂O₂ (20 volumes)
- 0,4 mg/ml de substrato OPD.

Apêndice C

Tabela 1C. Densidade óptica dos cães que foram selecionados para o experimento, obtida pelo método de ELISA indireto.

animal	sexo	status	DO-ELISA
1	M	S	27,620
2	M	S	62,800
3	M	S	17,580
4	M	S	22,780
5	M	S	14,280
6	M	S	10,380
7	M	S	8,000
8	M	S	37,300
9	M	S	18,220
10	M	S	25,980
11	M	S	36,860
12	M	S	30,500
13	M	S	32,480
14	M	S	34,940
15	M	S	38,440
16	M	A	19,020
17	M	A	31,960
18	M	A	30,120
19	M	A	32,260
20	M	A	36,580
21	M	A	41,180
22	M	A	18,300
23	M	A	6,540
24	M	A	12,220
25	M	A	15,640
26	M	A	25,340
27	M	A	35,380
28	M	A	34,400
29	M	A	15,780
30	M	A	17,120

M: macho, A: assintomático, S: sintomático, DO: densidade óptica

Apêndice D

Soluções para a realização da Cultura de Células Brancas Esplênicas.

Solução de PBS-estéril e Antibiótico (meio de transporte para o fragmento de baço)

- 0,8 % de NaCl
- 0,11% de Na_2HPO_4
- 0,02% de KH_2PO_4
- 0,02% de KCl em H_2O , pH 7,0
- 10 ml de Penicilina/ Estreptomicina.

Esterilização em autoclave e filtração membrana de 0,22 μm , vedação e conservação a 4 °C.

Meio RPMI-1640 Completo para Cultura Celular

- 10,39 g RPMI-1640
- 2 g de bicarbonato de sódio
- 2,38 g de HEPES

Em 1 l de H_2O Milliq.

Após homogeneização:

- 10% SBF,
- 100 μl / ml Penicilina/ Estreptomicina.

Correção pH para 7,2, filtração em membrana de 0,22 μm , vedação e conservação a 4 °C .

Solução A

- 3,75 g de NH_4Cl 0,16 M
- 450 ml de água Milliq

Solução B

- 1,03 Tris base 0,17 M
- 50 ml de água Milliq

Ajustar o pH 7,65 com HCl –1 N

Tampão de Lise de Hemácias

- 450 ml da solução A
- 50 ml da solução B.

Filtração em membrana de 0,22 μm , vedação e conservação a 4 °C .

Apêndice E

Soluções para a realização da reação de Western Blot - validação do kit comercial humano para detecção de TGF- β_1 .

Preparação de reagente para eletroforese

Acrilamida 30%

- 29,2 g de acrilamida;
- 0,8 g de metileno bis acrilamida;
- 100 ml de água deionizada qsp.

Tampão Laemmli 10 x (pH 8,3)

- 30,3 g tris base
- 144,2 g de glicina
- 10 g de SDS
- 1000 ml de água deionizada qsp

Tampão Tris 1,5 M (pH 8,8)

- 18,15 g de tris base;
- 100 ml de água destilada qsp.

Ajustar o pH para 8,8. Estocar em frasco escuro a 4 °C.

Tampão Tris 1 M (pH 6,8)

- 12,1 g de tris base
- 100 ml de água destilada qsp.

Ajustar o pH para 6,8. Estocar em frasco escuro a 4 °C.

Sodium-Dodecil-Sulfato 10% (SDS)

- 10 g SDS;
- 100 ml de água deionizada.

Persulfato de Amônio 10% (APS)

0,05 g APS;

500 µl de água deionizada.

Tampão de Amostra

- 4 ml de SDS 10%
- 2 ml de glicerol
- 1,2 ml de Tris 1 M pH 6,8
- 2,8 ml de água deionizada
- 0,01% de azul de bromofenol
- 100 µl de 2-mercaptoetanol.

Estocar a -20 °C.

Solução Descorante

- 70 ml de ácido acético;
- 100 ml de metanol;
- 1000ml de água deionizada qsp.

Eletroforese vertical**Gel de Corrida (10%)**

- 3,3 ml de água deionizada
- 2,8 ml de acrilamida
- 2,1 ml de tris pH 8,8
- 83,3 µl de SDS 10%
- 86 µl de APS 10%
- 6 µl de TEMED.

Esperar o gel polimerizar (30 minutos) e colocar o gel de empilhamento.

Gel de Empilhamento (5%)

- 1,4 ml de água deionizada
- 325 µl de acrilamida
- 250 µl de tris pH 6,8
- 20 µl de SDS 10%
- 25 µl de APS 10%
- 3 µl de TEMED.

Corrida foi realizada com 80 volts. Em seguida o gel foi colocado na solução Tampão de Transferência e montado na placa de transferência.

Solução de Transferência para Membrana de Nitrocelulose

- 2,93 g de glicina
- 5,81 g de tris base
- 0,375 g de SDS
- 200 ml de metanol
- 1000 ml de água deionizada qsp.

Solução Corante Ponceau

- 2 g Ponceau S;
- 30 g de ácido tricloroacético
- 30 g de ácido sulfosalicílico
- 100 ml de água deionizada qsp

Solução Corante para o Gel

- 0,63 g de comassie blue brilhante
- 17,5 ml ácido acético
- 125 ml metanol
- 250 ml de água deionizada qsp

Solução de Bloqueio da Membrana

- 1,211 g de tris base
- 8,766 g de cloreto de sódio
- 500 µl de Tween-20
- 50 g de leite desnatado
- 1000 ml de água deionizada qsp

Solução Reveladora - Substrato DAB

- 60 mg de DAB
- 60 ml de PBS - pH 7,4
- 20 µl de peróxido de hidrogênio.

Apêndice F

Soluções utilizadas no ELISA de captura - detecção de TGF- β_1

Solução Tampão Carbonato-Bicarbonato

- 0,025 M de NaHCO_3
- 0,025 M de Na_2CO_3 em H_2O destilada

Ajustar o pH para 9,6.

Solução para Lavagem

- 20 mM de Tris-HCl (pH 7.6);
- 150 mM de NaCl;
- 0,05% (v/v) de Tween-20

Apêndice G

Soluções utilizadas no ELISA de captura - detecção de IL-10 e de INF γ .

Tampão de Lavagem

- PBS pH 7,4
- 0,05% Tween-20

Tampão Bloqueio

- PBS pH 7,4
- 1% BSA
- 5% sucrose
- 0,05% NaN₃

Tampão de Diluição

- PBS pH 7,4
- 1% de BSA.

Estreptavidina Biotina

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

Solução Substrato

3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (TMB) (Promega Corporation, EUA)

Apêndice H

Tabela 1H. Número do animal, sexo, *status* (assintomático e assintomático) e médias obtidas nos teste realizados, para cada citocina em cada órgão ou cultura pesquisados.

animal	sexo	status	TGF- cultura	TGF- Baço	TGF- Fígado	IL-10 - Baço	IL-10 -Fígado	INF- Baço	INF- Fígado
1	M	S	7097,666	14851,390	2340,560	14576,260	82236,480	292,779	2235,760
2	M	S	2925,404	8064,454	5633,456	9456,704	77621,360	116,763	8655,740
3	M	S	14381,446	12306,290	2780,502	2680,822	82749,260	104,191	13530,168
4	M	S	17139,382	10488,360	3287,102	23309,620	60528,360	908,834	1403,540
5	M	S	11623,510	7822,062	3793,700	16985,462	55913,240	192,198	-617,565
6	M	S	7380,532	11519,120	4526,936	14275,110	48734,180	-71,825	630,764
7	M	S	-963,994	15760,356	2527,202	9908,430	54374,880	657,383	1522,428
8	M	S	14805,744	14366,608	3020,470	9607,280	38649,320	198,485	-1984,783
9	M	S	11574,958	10185,372	5353,494	8854,404	51981,860	242,489	2711,314
10	M	S	1793,942	15214,976	2967,144	14877,410	51640,000	242,489	-2460,338
11	M	S	7521,964	7822,062	2953,812	16383,162	59160,920	267,634	9012,404
12	M	S	3774,000	14003,022	5086,862	6373,840	114285,400	217,344	4312,006
13	M	S	9926,318	9700,590	3420,418	24348,860	55356,900	53,900	6984,180
14	M	S	14805,744	11336,726	2527,202	6528,796	55993,980	242,489	4635,016
15	M	S	13462,134	13397,048	4846,894	11022,552	52012,320	267,634	-1296,619
16	M	A	1440,361	9034,016	2273,902	6746,352	48734,180	110,477	14899,360
17	M	A	8370,560	15093,780	2807,166	2680,822	42238,840	-84,398	24271,980
18	M	A	9431,304	7579,674	2913,818	40776,340	81713,900	-27,821	17508,234
19	M	A	1924,565	28831,760	10181,724	11505,038	34842,960	24,341	-3652,646
20	M	A	8354,594	12220,402	6091,270	6918,740	13808,192	19,928	6492,982
21	M	A	-2482,540	20901,180	7206,848	16274,784	25926,040	15,515	8522,108
22	M	A	-1543,314	18114,758	9097,132	3249,704	30270,180	5,218	3400,982
23	M	A	-1832,304	17364,566	3519,242	3616,608	31642,020	21,399	8425,482
24	M	A	-1904,552	14899,656	4355,926	17008,592	62508,240	2,276	11227,608
25	M	A	-1976,799	13292,104	6896,966	6373,840	90714,000	80,238	19247,486
26	M	A	-387,354	14578,144	9716,898	24348,860	59338,560	36,109	23595,620
27	M	A	5464,692	14363,804	5316,564	6528,796	134193,660	59,645	21276,620
28	M	A	-3132,758	17900,416	4851,738	11022,552	65868,480	128,781	4723,110
29	M	A	-2627,026	12863,422	8167,486	2035,040	71124,260	77,296	259,701
30	M	A	2358,050	13292,104	5626,446	2654,868	123767,340	103,774	6044,514

M: macho, A: assintomático, S: sintomático.