

Ana Paula Ferreira Lopes Corrêa

**“Resposta humoral, carga parasitária e avaliação  
histopatológica na infecção experimental por  
*Leishmania (Leishmania) chagasi* em camundongos  
BALB/c imunossuprimidos”**

Botucatu/SP

2011

**Ana Paula Ferreira Lopes Corrêa**

**“Resposta humoral, carga parasitária e avaliação  
histopatológica na infecção experimental por *Leishmania*  
*(Leishmania) chagasi* em camundongos BALB/c  
imunossuprimidos”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para a obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Titular Helio Langoni

Co-orientador: Prof. Ass. Dr. Silvio Luis de Oliveira

Botucatu/SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Corrêa, Ana Paula Ferreira Lopes.

Resposta humoral, carga parasitária e avaliação histopatológica na infecção experimental por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em camundongos BALB/c imunossuprimidos / Ana Paula Ferreira Lopes Corrêa. - Botucatu, 2011

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Helio Langoni

Capes: 40101096

1. Leishmaniose. 2. Imunossupressão. 3. Doenças transmissíveis.

Palavras-chave: BALB/c; Carga parasitária; Imunossupressão; Leishmaniose visceral; Resposta humoral.

Dedicat6ria

Dedico...

Aos meus pais queridos e amados **Glauce Ferreira Lopes Corrêa** e **Jonas Antonio Corrêa**, pelo amor desmedido e sem limites, pela força enorme, respeito, dedicação, carinho, zelo e por terem me acolhido em seus braços, como quando criança, fazendo-me sentir super-poderosa e encorajando-me diante das fases mais difíceis que enfrentei até hoje.

Aos meus irmãos **Luciana Ferreira Lopes Corrêa** e **Rafael Ferreira Lopes Corrêa**, pela força, pela crença, cumplicidade, amor, carinho e apoio, que fazem com que estejamos sempre juntos, para tudo. Ao meu cunhado, **Vasco Monteiro Martins Junior**, que além da força e carinho, junto com a minha irmã, proporcionou que o meu mundo mudasse de cor, ganhasse sentido e fosse muito mais feliz com o nascimento dos meus sobrinhos **Dimitri Corrêa Martins** e **Henrique Corrêa Martins**, que amo incondicionalmente e são razão da minha grande vontade de continuar seguindo...

Agradecimientos

## Agradeço...

A Deus primeiro e sobre todas as coisas, porque desde o início, do meu nascimento até hoje, todas as lutas e as conquistas só foram possíveis, porque eram da vontade Dele.

Ao meu orientador e amigo, **Prof. Titular Helio Langoni**, primeiramente por ter me dado a oportunidade de ser orientada por ele, pelos conhecimentos transmitidos, por me ensinar a amadurecer cientificamente, pelas cobranças e suporte, pelos conselhos, pela dedicação e carinho com que nos trata e principalmente pelo lado pessoal, por compreender, apoiar, guiar e encorajar a minha luta, em um momento de grande angústia e dificuldade e mais, por acreditar junto comigo, que tínhamos força e condição de terminar este trabalho. Vencemos!

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Silvio Luis de Oliveira**, pela prontidão em sanar minhas dúvidas, pela atenção e carinho.

À **Profa. Dra. Maria Cecília Rui Luvizoto**, acima de tudo, pela amizade de todas as horas, apoio e conselhos, pela dedicação e disponibilidade em realizar grande parte deste estudo. Deixo aqui minha grande admiração desde a graduação e o desejo de que nossa amizade perdure por muitos anos.

À **Profa. Adjunto Alexandrina Sartori**, por ceder seu laboratório, material e o tempo e a pós-graduanda, **Larissa Lumí W. Ishikawa** que me ajudou com boa vontade e dedicação em parte do meu experimento. Muito obrigada!

À **Profa. Adjunto Maria Terezinha Serrão Peraçoli**, por toda disponibilidade desde do início do projeto, pelo carinho e acolhimento, pelos ensinamentos em aula e pelas sugestões brilhantes na banca de qualificação.

Ao **Prof. Adjunto Marcelo Vasconcelos Meireles**, por disponibilizar da sua sala e do microscópio para realização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Renée Laufer Amorim**, pela colaboração no início deste trabalho.

À Pós-doutoranda **Virgínia Richini Bodelão**, pela amizade, cuidado e grande contribuição na banca de qualificação.

Ao mestrando **Diego Borin Nóbrega**, pela cuidadosa análise estatística e auxílio na descrição dos resultados e principalmente pela amizade, conversas, conselhos, respeito e carinho que sempre me tratou.

À **Faculdade de Medicina**, UNESP, campus de Botucatu pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado em Doenças Tropicais.

Ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, em nome do coordenador **Prof. Paulo Câmara Marques Pereira** e à secretária **Solange Sako Cagliari**.

Aos **secretários da Seção de Pós-graduação da FMB**, pela atenção, ajuda e paciência.

À **CAPE**S pela concessão da bolsa de doutorado.

À **minha família**, pais, irmãos, sobrinhos, padrinhos, tios, primos que sempre torceram por mim e que nesse último ano estiveram muito mais presentes.

À amiga **Cidinha Langoni**, por toda força, experiência e palavras de confiança do início ao final das minhas lutas.

Ao **Prof. Alexandre Lima de Andrade**, pela amizade e bom humor de sempre.

À minha querida e adorada amiga **Lucilene Granuzzio Camossi**, pelo acolhimento desde o meu primeiro dia de estágio no Laboratório de Zoonoses, fazendo com que eu me sentisse em casa, pelos ensinamentos, pelo carinho, pela cumplicidade, pela dedicação e pelas palavras de fé e certeza durante a minha luta, que me fizeram acreditar que tudo iria passar e o mundo seria muito melhor. Meu desejo é de que nossa amizade seja infinita e que possamos contar uma com a outra sempre, porque o que você fez por mim, só se faz a um irmão. Não há meios para se agradecer! E ao **Daniel Cardia** pela amizade, cuidado e conversas intermináveis. Chegamos até aqui!!

À minha amiga-irmã **Inah Carolina Galatro Faria Proença**, pela amizade sem tamanho, desde o cursinho até hoje, pelo acolhimento nas minhas horas de desespero, pelas conversas sérias e outras não, pelo cuidado e carinho de amiga e médica, quando estava internada. Não há o que eu possa fazer para retribuir tanto amor! E ao **Fernando Proença**, por me acolher em sua casa e partilhar a minha querida amiga nos momentos em que preciso e precisei.

À **Nair Lira**, minha amiga de Recife, longe fisicamente, mas muito presente em todos os momentos de luta, com muita fé e amor. Suas palavras sempre me fazem ver que o que vem será muito melhor!! Sorte a minha ter lhe conhecido!!!

À **Juliana Falcato Vecina**, amiga inseparável desde o primeiro ano de faculdade, mesmo em caminhos diferentes, estamos sempre juntas, passando força e apoiando uma a outra. Sinto muito a sua falta!!

À amiga **Daniela Gaspar** e ao **Fábio Kobashigawa**, pela amizade de anos, pelo cuidado, carinho e palavras positivas e de fé, em todos os momentos, bons e não tão bons assim.

Às amigas **Audrey Rennó Campos Braga** e **Cátia Voz**, pelas conversas e saídas divertidas, pelo apoio, preocupação e a frase "eu te amo" de sempre, que modifica o dia de qualquer pessoa.

A amiga **Deolinda Carneiro**, pela convivência maravilhosa no tempo que estive em Botucatu e pelo carinho e consideração à distância. Obrigada pela força!!

Aos queridos amigos que fiz durante o doutorado, **Felipe de Freitas Guimarães, Felipe Fornazari, Leila Sabrina Ullmann, Haroldo Greca Júnior, Marcella Troncarelli, Marcela Manzi, Priscila Barbante, Pâmela Marson, Patrícia Yoshida Fascioli, Juliana Giantomassi Machado, João Marcelo Azevedo de Paula Antunes, Selene Babboni, Simone Mangia, Luciana Baldini Peruca, Benedito Menozzi, Rodrigo Costa da Silva, Rozeani Olímpio Tomé, Simone Baldini Lucheis e Thiago Braga** que compartilharam comigo muitas horas de alegrias e principalmente estiveram próximos quando mais precisei, com palavras positivas e de conforto. Vocês são muito importantes para mim!!

Ao **Antonio José de Araújo Aguiar**, pelo apoio desde o final da graduação, incentivo pelo caminho da pós-graduação, mestrado e doutorado. Dedicção e cuidado durante a minha doença e ajuda para finalização deste trabalho. Obrigada!

Aos médicos dedicados e cuidadosos, **Dr. Gilberto Uemura, Dr. Carlos Eduardo Paiva, Dr. Odaír Michelin, Dr. Eduardo Pessoa, Dr. Cristiano Pádua, Dr. Ronaldo Vidal, Dr. Júlio** e especialmente ao **Dr. Ivo Carelli Filho** por me fazerem acreditar que a cura é possível e que a vida pode ser normal após o câncer.

À minha psicóloga **Clarissa**, aos enfermeiros do Serviço de quimioterapia da FMB, **Camila, Luciana, Fabiana, Léo, Chico e Geraldo** e tantas outras técnicas e auxiliares de enfermagem da enfermaria da Ginecologia. Às secretárias **Ana Paula e Adriana**, da quimioterapia da FMB, gostaria de registrar meu sincero agradecimento pelo acolhimento carinhoso e humanizado durante a minha luta.

À tantas outras pessoas, que não me saem do pensamento, que fizeram parte do meu tratamento e ajudaram-me de alguma forma a entender e aceitar tudo o que estava passando. Pelas conversas na sala de espera e também na sala de quimioterapia e pelo bom humor e esperança de cada uma, mostrando que a vida é muito curta, mas que é maravilhosa e que vale a pena lutar. São essas pessoas que fizeram de mim, o que sou hoje! E em especial as crianças, que são como anjos, que mesmo sem noção do que estão passando, são exemplos da força e da dedicação de seus pais.

Aos residentes do Laboratório de Zoonoses, **Carla Coiro, Mariana Kikutí, Fernanda Gaio e Diego Generoso**, que sempre me ajudaram e me trataram com muito carinho e respeito.

Aos pós-graduandos da Faculdade de Medicina **Daniela Moris, Talísia Moreto, Fernanda Chiuso, Sofia Zorzela, Thaís França, Marcus Vinícius Pimenta Rodrigues, Gisele, Katty Paes, Renato Pavan, Juliano Hoffman**.

Aos pós-graduandos do departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública **Amanda Keller Siqueira, Tatiana Salerno, Larissa Condas, Marília Junqueira, Gustavo Machado, Camila Appolinário** e tantos outros que passaram pelo departamento durante esses anos.

Aos tantos **estagiários** que passaram pelo Laboratório de Zoonoses que fizeram meus dias diferentes e divertidos.

Aos professores do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para meu crescimento pessoal e científico. Muito obrigada!!

Sei que essas palavras expressam pouco tudo que gostaria de dizer e agradecer e sei também que aquela Ana Paula que entrou na pós-graduação em 2007, com certeza, não é mais a mesma hoje.

É muito bom poder continuar...

Epígrafe

O Senhor é o meu pastor: nada me faltará.  
Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a águas  
tranqüilas.  
Refrigera minha alma; guia-me pela vereda da justiça, por amor do  
seu nome.  
Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria  
mal algum, porque tu estás comigo; e a tua vara e o teu cajado me  
consolam.  
Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos,  
unges minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda.  
Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os  
dias da minha vida: e habitarei na casa do Senhor por longos dias.

Salmo 23

**Resposta humoral, carga parasitária e avaliação histopatológica na infecção experimental por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em camundongos BALB/c imunossuprimidos.** Corrêa, A.P.F.L. Botucatu 2011. O objetivo do estudo foi avaliar a resposta humoral, a carga parasitária e os aspectos histopatológicos presentes no fígado em camundongos BALB/c experimentalmente infectados por *L. (L.) chagasi* e imunossuprimidos. 96 camundongos foram subdivididos em quatro grupos: controle (I) – sem tratamento; imunossuprimidos (II) – tratamento com dexametasona (DXM) e pentoxifilina (PTX); infectado (III) – infecção por *L. (L.) chagasi* e infectados e imunossuprimidos (IV) - infecção por *L. (L.) chagasi* e tratados com DXM e PTX. O dia de infecção foi considerado como o dia zero e a imunossupressão ocorreu 60 dias pós-infecção. As amostras foram obtidas de cada grupo, em momentos distintos 15, 30, 60, 75 e 90 dias pós-infecção, em que se coletou sangue total, para detecção de IgG1 e IgG2a pelo ensaio imunoenzimático (ELISA), fragmentos de baço e fígado, para detecção da carga parasitária pela técnica de microtitulação em cultura e fragmentos de fígado para o exame histopatológico. Houve diferença significativa na produção das imunoglobulinas e IgG1 foi à subclasse de imunoglobulina mais produzida pelos grupos ( $P < 0,0001$ ). Quando comparadas a subclasses de imunoglobulinas dentro do mesmo grupo, IgG1 também apresentou médias maiores de produção nos grupos III e IV ( $P = 0,014$  e  $P = 0,009$ ). E quando se considera o momento, não houve diferenças significativas entre IgG1 e IgG2a. Aos 90 dias pós-infecção foram encontradas diferenças significativas entre as médias de produção de IgG1 e IgG2a, entre os grupos III e IV e o grupo III produziu mais as duas subclasses ( $P = 0,02$ ). Nos momentos 75 e 90 dias pós-infecção houve produção maior de IgG1 e IgG2a. O Grupo IV apresentou maior carga parasitária ( $P < 0,005$ ). A carga parasitária no fígado foi mais elevada 15 e 30 dias pós-infecção e aos 60 dias pós-infecção o baço passou a apresentar carga parasitária maior ( $P = 0,0001$ ;  $P = 0,004$ ;  $P = 0,01$ ), independente do grupo. Considerando-se o grupo IV, 15 dias pós-infecção apresentou maior carga parasitária no fígado e 75 dias pós-infecção, carga parasitária maior no baço ( $P = 0,01$ ;  $P = 0,03$ ). Quando se considera o órgão entre os grupos, no mesmo momento, foram encontradas diferenças significativas, para o baço, 75 e 90 dias pós-infecção ( $P = 0,0004$ ;  $P = 0,007$ ). No fígado, essa diferença ocorreu aos 75 dias pós-infecção ( $P = 0,05$ ). Para ambos os órgãos, o grupo IV foi quem produziu maior carga parasitária. No grupo III houve correlação entre a produção de IgG1 e IgG2a ( $P < 0,0001$ ), IgG1 e a carga parasitária do fígado ( $P < 0,0112$ ) e IgG2a e a carga parasitária do fígado ( $P < 0,0061$ ) e no grupo IV, houve correlação entre IgG1 e IgG2a ( $P < 0,0001$ ), IgG1 e a carga parasitária do baço ( $P < 0,0066$ ) e IgG2a e a carga parasitária do baço ( $P < 0,0115$ ). Durante os momentos de estudo foi observada reação inflamatória progressiva e constante, de infiltrado inflamatório a granulomas completos, sendo renovada em todas as fases e a presença de formas amastigotas, confirmadas pela imunoistoquímica. O grupo imunossuprimido apresentou fraca reação inflamatória e raros granulomas. A imunossupressão influenciou na produção de imunoglobulinas, na multiplicação do parasito e na resposta imune do fígado. A subclasse de IgG1 está relacionada à resposta Th2 e a subclasse IgG2a à resposta Th1. Há um balanço entre Th1 e Th2 na LV murina, com predomínio da resposta Th2. O fígado é o primeiro local de replicação do parasito na LV murina e ele controla a infecção.

**Palavras-chave:** leishmaniose visceral, BALB/c, imunossupressão, resposta humoral, carga parasitária

**Humoral response, parasite load and histopathological evaluation in BALB/c mice experimentally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* and immunosuppressed. Corrêa, A.P.F.L. Botucatu, 2011.** This study aimed to evaluate the humoral response, the parasite load and liver histopathological features in BALB/c experimentally infected by *L. (L.) chagasi* and immunosuppressed. Ninety-six mice divided into four groups: control (I) - no treatment; immunosuppressed (II) - Treatment with dexamethasone (DXM) and pentoxifylline (PTX), infected (III) - infection by *L. (L.) chagasi* and infected and immunosuppressed (IV) - infection by *L. (L.) chagasi* and treated with PTX and DXM. The days of infection was considered as day zero and immunosuppression occurred 60 days post-infection. Samples were obtained from each group at different times 15, 30, 60, 75 and 90 days post-infection, which collected whole blood for detection of IgG1 and IgG2a by test immunoassay (ELISA), fragments of spleen and liver, to detect the parasite load in the technique microtiter culture and fragments of liver for histopathology. Significant differences in production of immunoglobulins, IgG1 was the subclass immunoglobulin produced by most groups ( $P < 0.0001$ ). When comparing the immunoglobulin subclasses within the same group, IgG1 also showed higher average production in groups III and IV ( $P = 0.014$  and  $P = 0.009$ ). When one considers the time, there were no significant differences between IgG1 and IgG2a. At 90 days post-infection were significant differences between the means of production of IgG1 and IgG2a between group III and IV and group III produced over the two subclasses ( $P = 0.02$ ). In periods of 75 and 90 days post-infection there was increased production of IgG1 and IgG2a. Group IV showed a higher parasite load ( $P < 0.005$ ). The parasite load in the liver was higher 15 and 30 days post-infection and 60 post-infection in spleen ( $P = 0.0001$ ,  $P = 0.004$ ,  $P = 0.01$ ), regardless of group. Considering the group IV, 15 days post-infection showed a higher parasite load in the liver and 75 days post-infection, increased parasite load spleen ( $P = 0.01$ ,  $P = 0.03$ ). When considering the national between groups at the same time, we found significant differences in the spleen, 75 and 90 days post-infection ( $P = 0.0004$ ,  $P = 0.007$ ). In the liver, this difference occurred at 75 days post-infection ( $P = 0.05$ ). For both organs, the group has produced the largest IV parasite load. In group III was no correlation between production of IgG1 and IgG2a ( $P < 0.0001$ ), IgG1 and in the liver parasite load ( $P < 0.0112$ ) and IgG2a and the liver parasite load ( $P < 0.0061$ ) and group IV, there was correlation between IgG1 and IgG2a ( $P < 0.0001$ ), IgG1 and parasite load of the spleen ( $P < 0.0066$ ) and IgG2a and the cargo parasitic spleen ( $P < 0.0115$ ). During the moments of study was an inflammatory reaction and progressive constant, mononuclear granulomas complete, being renewed at all stages and the presence amastigotes, as confirmed by immunohistochemistry. The immunosuppressed group had a weak reaction and rare inflammatory granulomas. Immunosuppression influences the production of immunoglobulins in multiplication of the parasite and the immune response of the liver. The IgG1 subclass is related to Th2 response and subclass IgG2a for Th1. There is a balance between Th1 and Th2 cells in murine LV, with a predominance of Th2 response. The liver is the first site of replication of the parasite in LV murine and it controls the infection.

**Keywords:** visceral leishmaniasis, BALB/c, immunosuppression, humoral response, parasite load

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		<i>Página</i>
1	Valores das médias de IgG1 e IgG2a para os grupos III (infectado) e IV (infectado e imunossuprimido), nos momentos estudados. Botucatu, 2011	61
2	Valores de cargas parasitárias nos grupos III e IV, nos momentos estudados. Botucatu, 2011	65
3	Valores de cargas parasitárias no baço e no fígado, independente do grupo, nos momentos estudados. Botucatu, 2011	67
4	Valores de cargas parasitárias no baço e no fígado, em cada grupo III (infectado) ou IV (infectado e imunossuprimido), nos momentos estudados. Botucatu, 2011	69
5	Valores de cargas parasitárias no baço e no fígado, nos dois grupos, nos momentos estudados. Botucatu, 2011	71
6	Correlação das médias das produções das subclasses IgG1 e IgG2a com a carga parasitária do fígado do grupo III (infectado). Botucatu, 2011	72
7	Correlação das médias das produções das subclasses IgG1 e IgG2a com a carga parasitária do baço do grupo IV (infectado e imunossuprimido). Botucatu, 2011	74
8	Análise histopatológica de cortes de fígado de camundongos BALB/c, corados por HE. (A-B) 15 dias pós-infecção. (A) Reação granulomatosa, no detalhe presença de amastigotas intracelulares. (B) reação granulomatosa perivascular. (C-D) 30 dias pós-infecção. (C) granulomas disseminados, no detalhe amastigotas intracelulares. (D) granulomas com amastigotas intracelulares. (E-F) 60 dias pós-infecção. (E) granulomas multifocais. (F) células morfológicamente semelhante à célula gigante com amastigotas intracelulares. Botucatu, 2011	77
9	Análise histopatológica de cortes de fígado de camundongos BALB/c, 75 dias pós-infecção, corados por HE. (A-B) <b>Grupo III</b> (infectados), (A) Granuloma perivascular (B) granuloma com amastigotas intracelulares. (C-D) <b>Grupo IV</b> (infectados e imunossuprimidos). (C) Reação inflamatória mínima perivascular, no detalhe formas amastigotas. (D) granulomas com amastigotas intracelulares. Botucatu, 2011	78

Figura		Página
10	Análise histopatológica de cortes de fígado de camundongos BALB/c, 90 dias pós-infecção, corados por HE. (A-B) <b>Grupo III</b> (infectados), (A) Granuloma multifocais. (B) granuloma perivascular com amastigotas intracelulares. (C-D) <b>Grupo IV</b> (infectados e imunossuprimidos). (C) Reação inflamatória mínima perivascular. (D) reação inflamatória mínima com amastigotas intracelulares. Botucatu, 2011	79
11	Cortes de fígado de camundongos BALB/c, submetidos à reação de imunoistoquímica. Detecção de formas amastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i> imunomarcadas no citoplasma de macrófagos e células de Kupffer. (A-B) 15 dias pós-infecção, (C) 30 dias pós-infecção e (D) 60 dias pós-infecção. Botucatu, 2011	81
12	Cortes de fígado de camundongos BALB/c, submetidos à reação de imunoistoquímica. Detecção de formas amastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i> imunomarcadas no citoplasma de macrófagos e células de Kupffer. (A-B) Grupos III e IV (respectivamente), 75 dias pós-infecção, (C-D) Grupos III e IV, 90 dias pós-infecção. Botucatu, 2011	82

## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela</i>		<i>Página</i>
<b>1</b>	Valores das médias de IgG1 e IgG2a e percentis, independente do grupo e do momento de estudo. Botucatu, 2011	58
<b>2</b>	Valores das médias de IgG1 e IgG2a e percentis, no grupo III (infectado) e IV (infectado e imunossuprimido), independente do momento de estudo. Botucatu, 2011	59
<b>3</b>	Valores das médias de IgG1 e IgG2a e percentis, nos grupos III (infectado) e IV (infectado e imunossuprimido), em todos os momentos do estudo. Botucatu, 2011	60
<b>4</b>	Médias das cargas parasitárias dos grupos III (infectado) e IV (infectado e imunossuprimido) e seus limites inferiores e superiores. Botucatu, 2011	63
<b>5</b>	Médias das cargas parasitárias dos grupos III (infectado) e IV (infectado e imunossuprimido) e seus limites inferiores e superiores, nos momentos estudados. Botucatu, 2011	63
<b>6</b>	Médias das cargas parasitárias do baço e do fígado e seus limites inferiores e superiores, nos momentos estudados. Botucatu, 2011	66
<b>7</b>	Médias das cargas parasitárias dos grupos III (infectado) e IV (infectado e imunossuprimido), do baço e do fígado e seus limites inferiores e superiores, nos momentos estudados. Botucatu, 2011	68
<b>8</b>	Médias das cargas parasitárias dos grupos III (infectado) e IV (infectado e imunossuprimido), do baço e do fígado e seus limites inferiores e superiores. Botucatu, 2011	70
<b>9</b>	Correlação das médias das produções das subclasses IgG1, IgG2a, das cargas parasitárias do baço e do fígado dos grupos III (infectado). Botucatu, 2011	72
<b>10</b>	Correlação das médias das produções das subclasses IgG1, IgG2a, das cargas parasitárias do baço e do fígado dos grupos IV (infectado e imunossuprimido). Botucatu, 2011	73

# SUMÁRIO

	Página
<b>I. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b>	19
<b>II. REVISÃO DE LITERATURA</b>	23
2.1. Leishmaniose Visceral (LV)	23
2.2. Efeito da terapia imunossupressora na resposta imune em camundongos infectados por <i>Leishmania</i> spp.	27
2.3. Modelos murinos na infecção por <i>Leishmania</i> spp.	29
2.4. O papel da IgG na infecção por <i>Leishmania</i> spp.	31
2.5. Carga parasitária na infecção por <i>Leishmania</i> spp.	35
2.6. Alterações histopatológicas dos órgãos na infecção por <i>Leishmania</i> spp.	38
<b>III. OBJETIVOS</b>	44
3.1. Objetivo Geral	44
3.2. Objetivos Específicos	44
<b>IV. MATERIAL E MÉTODOS</b>	47
4.1. Local de realização do estudo	47
4.2. Animais	47
4.3. Grupos Experimentais	48
4.4. Delineamento do estudo	48
4.5. Infecção	49
4.6. Imunossupressão	50
4.7. Obtenção de amostras	50
4.8. Avaliação da resposta humoral	51
4.9. Determinação da carga parasitária	53
4.10. Exame histopatológico do fígado	54
4.11. Reação de imunoistoquímica em tecidos incluídos em parafina	54
4.12. Análise Estatística	55
<b>V. RESULTADOS</b>	58
5.1. Avaliação da resposta humoral	58
5.2. Determinação da carga parasitária	62
5.3. Correlação das subclasses de IgG x carga parasitária dos órgãos	71
5.4. Exame histopatológico do fígado	74
5.5. Reação de imunoistoquímica	80
<b>VI. DISCUSSÃO</b>	84
6.1. Considerações Gerais	84
6.2. Resposta humoral	85
6.3. Carga parasitária	88
6.4. Exame histopatológico do fígado	91
<b>VII. CONCLUSÃO</b>	94



## I. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A leishmaniose visceral (LV) é uma das zoonoses parasitárias mais importantes, de ocorrência em diversas regiões do mundo. Constitui um grave problema de saúde pública, em que os cães infectados são as principais fontes de infecção, com prevalência maior que na espécie humana, e é considerada uma enfermidade emergente.

No Brasil, apresenta ampla distribuição geográfica, sendo relatada nas cinco regiões do país (Norte, Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul). Apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados. Anteriormente conhecida como enfermidade de áreas rurais e ambientes silvestres, hoje abrange regiões urbanas, peridomiciliares e domiciliares.

No Estado de São Paulo, a leishmaniose visceral canina (LVC) foi relatada em 1998, na região de Araçatuba, no oeste do Estado. Desde então, a enfermidade tem se disseminado, totalizando 54 municípios com casos humanos e caninos autóctones, três municípios que registraram apenas casos humanos autóctones (Jaú, Parapuã e Lençóis Paulista) e 30 municípios que apresentam somente transmissão canina. Em 1999, um ano após o relato da LVC, foi notificado na região de Araçatuba, o primeiro caso de leishmaniose visceral humana (LVH). No estado, entre 1999 e julho de 2009, foram notificados mais de 3720 casos humanos suspeitos de LV, dos quais 1750 foram confirmados, totalizando 144 óbitos.

O agente etiológico da LV é o protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi*, parasito intracelular obrigatório de células do sistema fagocítico mononuclear. Apresenta um ciclo de vida digenético, caracterizado por uma forma promastigota flagelada, no sistema digestório do vetor (fêmea do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*) e uma forma amastigota, imóvel, dentro do fagolisossomo de macrófagos de mamíferos. Na leishmaniose visceral canina (LVC) após a infecção da pele, ocorre a disseminação do parasito, preferencialmente, para baço, fígado,

linfonodos e medula óssea, onde se multiplicam ativamente, podendo originar os sinais clínicos da enfermidade.

O curso clínico da enfermidade está diretamente relacionado com a competência imunológica do hospedeiro. As células T desempenham papel importante na resistência, persistência do parasito no hospedeiro e na progressão da infecção ou na cura clínica, pois são capazes de mediar respostas celular e humoral, que regulam a produção e ação de citocinas e de anticorpos, respectivamente. De maneira geral, a população de linfócitos TCD4+ subdivide-se em duas subpopulações: Th1 - secreta IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  induzindo a ativação de macrófagos e a resposta mediada por células, contribuindo para a resolução da infecção e Th2 - secreta IL-4, IL-5 e IL-10, relacionada à resposta mediada por anticorpos, não protetora e deletéria, fazendo com que haja progressão da infecção.

No presente estudo, avaliou-se a resposta imune humoral, por meio da determinação das subclasses de anticorpos IgG1 e IgG2a, em camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) chagasi* e imunossuprimidos, pois se sabe que a produção de anticorpos tem papel contraditório e discutível na resolução da infecção e na imunidade protetora. Assim, níveis elevados, são responsáveis por alterações fisiopatológicas, pela doença ativa e pela supressão da resposta imune mediada por células. O estudo também avaliou a replicação do parasito no hospedeiro, pelo comportamento da carga parasitária do baço e do fígado e a resposta imune órgão-específica do fígado, pelas alterações morfológicas causadas pelo parasito no hospedeiro e relacionou essas variáveis entre si. Desta forma, acredita-se ser possível contribuir tanto na leishmaniose canina, quanto na humana, para a realização do diagnóstico e prognóstico da doença, que revelem a situação clínica e parasitológica do hospedeiro. Nesse sentido, pretende-se prever o resultado final da infecção, para a investigação da imunidade protetora, para dados de suscetibilidade e resistência do hospedeiro, para a produção de vacinas que previnam e controlem a enfermidade e para o desenvolvimento de fármacos

eficientes para a espécie canina e que não afetem o tratamento em uma subsequente infecção humana.

## **II. REVISÃO DE LITERATURA**

## 2.1. Leishmaniose Visceral (LV)

O protozoário tripanosomatídeo pertencente ao gênero *Leishmania* é o agente etiológico das leishmanioses, um complexo de doenças parasitárias que acomete 14 milhões de pessoas no mundo, em 88 países<sup>1</sup>, sendo mais de 25 espécies de *Leishmania* que podem produzir a doença em humanos<sup>2,3,4</sup>. Dependendo da espécie e virulência do parasito e da resposta imune do hospedeiro, as manifestações clínicas apresentam-se como: cutânea, mucocutânea, cutânea difusa e visceral<sup>4,5</sup>.

A leishmaniose visceral (LV) é a apresentação mais severa da enfermidade, podendo ser fatal. Estima-se 500 mil casos novos a cada ano no mundo<sup>3</sup> e, no Brasil são registrados pelo menos 3000 casos confirmados anuais<sup>6</sup>. Atualmente, encontra-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo<sup>7</sup>. *Leishmania (Leishmania) chagasi* é responsável por causar a LV no Novo Mundo, enquanto que no Velho Mundo é causada por *Leishmania (Leishmania) donovani* e no sudeste da Europa e na área Mediterrânea por *Leishmania (Leishmania) infantum*<sup>2</sup>.

O primeiro caso registrado da doença no Brasil ocorreu em 1913, diagnosticado a partir de material de necropsia de paciente oriundo do Mato Grosso<sup>8</sup>. Estudando-se a febre amarela no Brasil, foram encontrados 41 casos positivos para leishmaniose, em indivíduos oriundos das regiões Norte e Nordeste. Em seguida, o díptero, flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* foi incriminado como vetor e foram detectados os primeiros casos da infecção em cães<sup>9</sup>.

Nas áreas urbanas, os cães (*Canis familiaris*) são os principais reservatórios de *L. (L.) chagasi*<sup>10,11</sup> e apresentam maior prevalência à infecção<sup>12</sup>, pois é a partir deles que ocorre a transmissão ao homem<sup>9,13</sup>, por apresentarem um intenso parasitismo na pele. No ambiente silvestre os reservatórios são o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*)<sup>14</sup> e os marsupiais

(*Didelphis albiventris*)<sup>9</sup>. A transmissão entre hospedeiros vertebrados ocorre pela picada da fêmea do flebotomíneo hematófago *Lutzomyia longipalpis*<sup>8,15</sup>, enquanto houver parasitismo na pele ou no sangue periférico do hospedeiro. Não ocorre transmissão direta da LV de pessoa a pessoa. Outros mecanismos de transmissão incomuns são: a auto-inoculação por material perfurocortante, a transfusão sanguínea, o compartilhamento de seringas e agulhas no uso de drogas injetáveis, a transmissão congênita pelas células do sistema fagocítico mononuclear, infectadas por formas amastigotas que atravessaram a placenta e, o contato do sangue materno com o feto no momento do parto<sup>16</sup>.

A LV é uma doença sistêmica grave cujas manifestações clínicas são dependentes do tipo de resposta imunológica do hospedeiro infectado. Os sinais clínicos tanto no homem quanto no cão são inespecíficos, como febre irregular por longos períodos, anemia, perda de peso, hepatoesplenomegalia e caquexia, ao final do estágio da enfermidade<sup>15</sup>.

O maior problema referido hoje é a co-infecção com a síndrome da imunodeficiência humana (HIV/aids)<sup>17</sup>, sendo a leishmaniose a terceira doença parasitária mais frequente em indivíduos com aids, após a toxoplasmose (*Toxoplasma gondii*) e a criptosporidiose (*Cryptosporidium parvum*)<sup>18</sup>.

Essa co-infecção é considerada como uma doença emergente de alta gravidade em várias regiões do mundo, sendo observado um expressivo aumento do número de casos desde o início da década de 1990, com projeções de seu crescimento contínuo devido à superposição geográfica das duas infecções, como consequência da urbanização das leishmanioses e da interiorização da infecção pelo HIV. A situação é particularmente preocupante no sudoeste da Europa, no sul da Ásia, na África subsaariana e na América do Sul, onde o Brasil surge como o país que mais requer atenção devido ao grande número de casos das duas infecções<sup>19</sup>.

Em cães, especificamente, podemos encontrar sinais clínicos como linfadenomegalia generalizada e hepatoesplenomegalia, alterações dermatológicas (queda de pelos, lesões

ulcerativas, prurido intenso, pelame opaco e dermatite seborreica), onicogrifose, lesões renais, hepáticas, pulmonares, cardíacas, locomotoras, oculares e neurológicas, com menor frequência<sup>15,20</sup>. Portanto, como não há manifestações clínicas patognômicas, em áreas endêmicas, diante de qualquer sinal clínico no cão, deve-se investigar primeiro se esse se encontra infectado por *L. (L.) chagasi*.

O diagnóstico da leishmaniose visceral humana (LVH) se faz pela confirmação dos casos suspeitos, que são os indivíduos com febre e esplenomegalia e provenientes de áreas endêmicas. Os exames laboratoriais são o parasitológico direto ou em cultura de aspirado de medula óssea ou sorológico, pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Um erro no diagnóstico oferece risco, pois sem o tratamento, a taxa de mortalidade é próxima a 100 %<sup>21</sup>.

O diagnóstico clínico da LVC é difícil de ser determinado devido à grande percentagem de cães assintomáticos e oligossintomáticos, e também por apresentar semelhança com outras doenças infecto-contagiosas que acometem cães<sup>9</sup>. Por outro lado, o diagnóstico laboratorial pode ser baseado no exame sorológico e parasitológico. Os métodos recomendados pelo Ministério da Saúde (MS) para avaliação da soroprevalência canina, são o ensaio imunoenzimático em fase sólida (ELISA), para triagem de cães sorologicamente positivos para *Leishmania* spp., e a imunofluorescência indireta (RIFI), para a confirmação dos cães sororreagentes ao teste de ELISA, ambos buscando encontrar anticorpos anti-leishmania. 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<sup>9</sup>.

O tratamento da LVH é feito pela administração de compostos de antimônio, pentamidina, marbofloxacino, anfotericina ou metilfosina. A escolha dos fármacos é realizada

de acordo com o estado geral do paciente e a sua administração realizada apenas em hospitais de referência<sup>21</sup>.

Na espécie canina não se recomenda o tratamento, pois o mesmo não diminui a importância dos cães como reservatórios da enfermidade, além de ser proibido pela portaria interministerial nº 1426 editada em julho de 2008. No Brasil não há fármacos específicos para o tratamento da LVC e o uso de fármacos, tradicionalmente empregados na LVH (antimoniais e alopurinol), apresenta baixa eficácia e, o uso rotineiro em cães, apesar de induzir a remissão temporária dos sinais clínicos, não previne recidivas; tem efeito limitado na infectividade de flebotomíneos e há o risco de seleção de parasitos resistentes<sup>9</sup>.

O controle da LV é realizado a partir da eutanásia dos cães, que apresentem os sinais clínicos e o exame sorológico positivo para *Leishmania* spp., mesmo havendo estudos que demonstrem não ser o melhor método para a redução da transmissão<sup>22</sup>. Além disso, contribui para o controle, diagnóstico e tratamento dos casos humanos, o combate químico e mecânico ao vetor, além da educação da população, quanto à posse responsável, controle de natalidade canina e emprego de medidas de saneamento básico<sup>9</sup>. Ainda não há uma vacina eficaz contra a LVH e, os resultados até o momento obtidos com a vacinação, utilizando o parasito bruto, não demonstram eficácia esperada. A proteção obtida com essas vacinas, nas mais variadas formulações, é muito baixa em relação ao que se espera de uma resposta vacinal<sup>23,24</sup>. Para a LVC há duas vacinas no mercado, registradas pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que cumpriram com os requisitos técnicos de eficácia vigentes no momento da concessão dos registros (anos de 2003 e 2006). Entretanto, o Ministério da Saúde ainda não recomenda o seu uso em saúde pública, pois estão sendo realizados estudos para avaliar o uso destes produtos para este fim<sup>25</sup>.

## **2.2. EFEITOS DA TERAPIA IMUNOSSUPRESSORA NA RESPOSTA IMUNE EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *LEISHMANIA* spp.**

A dexametasona (DXM) é um glicocorticóide sintético usado como anti-inflamatório e imunossupressor desde 1940<sup>26</sup>. Sua ação terapêutica compreende um amplo espectro de doenças humanas, incluindo doenças inflamatórias alérgicas e autoimunes, além de prevenir rejeição de órgãos transplantados. Têm ação sob a resposta imune e inflamatória, por inibir a transcrição de genes que envolvem proteínas da imunidade inata<sup>27</sup> e por serem potentes reguladores da resposta imune adaptativa, suprimindo a maturação, diferenciação e proliferação de células T e B<sup>28</sup>. Durante o curso da resposta imune, a secreção de glicocorticóides endógenos pela glândula adrenal é aumentada e esse mecanismo limita a magnitude da reação inflamatória para um estímulo imunogênico<sup>29</sup>.

A pentoxifilina (PTX) é derivada da xantina, conhecida por inibir inespecificamente a fosfodiesterase (PDE) e por aumentar o AMP cíclico (AMPC) intracelular<sup>30</sup>, usada amplamente na clínica em tratamentos de vários distúrbios vasculares periféricos e cerebrais, caracterizados pela inadequada perfusão sanguínea nos tecidos<sup>31</sup>. Tem ações imunomodulatórias, anti-inflamatórias e antitumorigênicas. Muitos estudos mostram que ela inibe a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) *in vivo* e *in vitro*<sup>32</sup> e que interfere na síntese de outras citocinas, inibindo a produção de IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 e interferon-gama (INF- $\gamma$ )<sup>32,33,34</sup> e estimulando a produção de IL-4, IL-10, e IL-13<sup>35</sup>.

Ambas, DMX e PTX agem determinando mudanças na resposta imune do perfil Th1 para o Th2, mimetizando a ativação do sistema de estresse com a liberação dos glicocorticóides, que impedem a liberação de citocinas proinflamatórias e seus produtos, que ativam macrófagos e levam ao dano tecidual<sup>35</sup>. Esses fármacos, isolados ou associados, por seus efeitos supressores podem alterar o curso da toxoplasmose e da leishmaniose em modelos murinos<sup>36,37</sup>.

Gangneux et al.<sup>37</sup>, estudaram o efeito da terapia imunossupressora em dois grupos: um com acetato de hidrocortisona (HA) e outro com a associação de DXM e PTX, no curso da LV em modelos murinos, monitorando a carga parasitária esplênica e hepática, a produção de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> no baço e o perfil de secreção de citocinas Th1 e Th2 (INF- $\gamma$  e IL-4) em cultura esplênica. A terapia com HA induziu o aumento da carga parasitária apenas no baço, enquanto que no tratamento com DXM e PTX houve aumento significativo da carga parasitária no baço e no fígado. Não houve diferenças nas percentagens das células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> do baço entre os grupos. A produção de INF- $\gamma$  diminuiu no grupo DXM e PTX, enquanto não se observou alteração de IL-4, sugerindo que esses fármacos produziram imunossupressão na LV experimental, mas sem esclarecer se é mediada pelas células produzidas pelo baço e/ou pelo desequilíbrio de Th1 e Th2. Talvez isso explique, em parte, porque a LV é rara em pacientes que recebem terapia imunossupressora em relação a pacientes imunossuprimidos pelo HIV.

Em estudo experimental com o uso da PTX em camundongos infectados por *L. (L.) amazonensis*, agente da leishmaniose cutânea, foi observada a redução na propensão de vacuolização de macrófagos e destruição maior de parasitos por essas células, quando o fármaco foi usado nas fases iniciais da infecção, reforçando a idéia de que a resposta do hospedeiro ao parasito é um jogo complexo entre citocinas pró e anti-inflamatórias<sup>38</sup>.

Rousseau et al.<sup>39</sup> observaram que o efeito prolongado da administração de DXM na LV crônica murina, causada por *L. (L.) infantum*, provocou uma redução de 55% da produção de células T no baço de camundongos BALB/c, havendo também redução na produção de citocinas (IL-2, INF- $\gamma$ , IL-4, TNF- $\alpha$ ) pelas células esplênicas e na produção de anticorpos específicos anti-leishmania (3-5 vezes). Quando administrada por mais de dois meses, foi observado o aumento da carga parasitária do baço (3 vezes), diferente do fígado e da medula óssea, em que não ocorreu a proliferação do parasito. Os resultados mostraram a baixa

sensibilidade das células esplênicas à DXM na infecção crônica e uma resposta distinta à imunossupressão causada pela DXM entre os órgãos-alvo infectados.

### **2.3. MODELOS MURINOS NA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA* spp.**

Os modelos murinos na infecção por *Leishmania* spp. têm sido amplamente utilizados em estudos para entender melhor o ciclo de vida do parasito, o processo de infecção e a relação parasito-hospedeiro. O uso é vantajoso, pois permite grande controle sobre as características da infecção do hospedeiro e do parasito, esclarecendo aspectos importantes que talvez direcionem estratégias de controle da infecção, tais como a imunoterapia e a vacinação. Há muitas linhagens de camundongos inatos ou mutantes, que permitem a seleção de características interessantes do hospedeiro de acordo com os objetivos da pesquisa. As diferenças ou similaridades genéticas entre as linhagens, explicam as manifestações clínicas da doença que cada uma apresenta<sup>40</sup>.

O curso da leishmaniose cutânea por *L.(L.) amazonensis* apresenta diferenças marcantes entre as linhagens de camundongos, sendo os camundongos BALB/c altamente suscetíveis ao desenvolvimento de lesões crônicas, características da infecção, do mesmo modo que camundongos C57BL/10 desenvolvem lesões crônicas com carga parasitária persistente<sup>41</sup>. Em contraste, camundongos CBH, C57BL/6, DBA e CBA são menos suscetíveis à infecção por parasitos do mesmo grupo e em níveis distintos, apresentam desenvolvimento lento das lesões, mas com carga parasitária persistente<sup>41, 42, 43</sup>.

É importante ressaltar que além das características genéticas dos camundongos que definem padrões de progressão ou resolução da infecção, existem fatores adicionais, que talvez influenciem nessas características, tais como: o tamanho do inóculo, o local de inoculação, a cepa do parasito de escolha e a sua procedência ou fonte de isolamento<sup>40</sup>.

A infecção por *L. (L.) donovani* e *L. (L.) chagasi* não é letal em camundongos e diferentes linhagens podem apresentar cargas parasitárias variadas. Conseqüentemente, a suscetibilidade e a resistência são definidas de acordo com a magnitude da carga parasitária no baço e no fígado após a infecção. Camundongos BALB/c são suscetíveis à infecção e apresentam visceralização nas espécies *L. (L.) donovani*<sup>44</sup> e *L. (L.) chagasi*. A infecção com *L. (L.) chagasi* na linhagem de camundongo resistente, C3H.HeJ, mostrou a baixa magnitude da carga parasitária, mas apresentou o mesmo padrão de enfermidade e períodos de multiplicação do parasito no baço e no fígado<sup>45</sup>.

O modelo murino tornou-se um padrão para a leishmaniose cutânea causada por *L. (L.) major*, no estudo da resposta imune celular a patógenos intracelulares. Nesse modelo, o desenvolvimento da resposta Th1, por linhagens de camundongos resistentes, induziu a produção de interferon-gama (INF- $\gamma$ ) e o desenvolvimento de lesões pequenas e parasitemia baixa. No entanto, camundongos suscetíveis induzem uma resposta imune inapropriada, que desencadeia o desenvolvimento de lesões maiores e parasitemia alta. Esses camundongos não conseguem controlar a doença e sucumbem à infecção. Por isso, esse modelo tem ajudado muito na compreensão de eventos que induzem a produção de células T e determinam uma resposta imune ineficiente<sup>46</sup>.

Por muitos motivos, a infecção de camundongos BALB/c com *L. (L.) major* pode ser considerada o melhor modelo para a leishmaniose visceral (LV) humana que para a leishmaniose cutânea, pois desenvolvem títulos elevados de anticorpos e o parasito, frequentemente, desloca-se para locais distantes do ponto de inoculação, como a medula óssea, o baço e o fígado<sup>46</sup>.

Rolão et al.<sup>47</sup>, em estudo experimental da resposta imune Th1 e Th2 demonstraram a competência de camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) infantum*, em estabelecer e manter a infecção, pela disseminação precoce do parasito, pois esses desenvolvem uma

resposta balanceada de Th1 e Th2, com a produção de citocinas no baço e no fígado e também produzem dois isotipos de IgG (IgG1 e IgG2a).

#### **2.4. O PAPEL DA IgG NA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA* spp.**

Muitos estudos objetivam associar as respostas das células T com a infecção por *Leishmania* spp. As citocinas, as subpopulações de células T e as classes e subclasses de imunoglobulinas têm sido avaliadas em modelo experimental murino e de leishmaniose humana, com a finalidade de entender os mecanismos imunológicos que controlam a persistência e a multiplicação do parasito no hospedeiro<sup>48</sup>.

Além da extrema importância da resposta imune mediada por células, outros componentes do sistema imune adaptativo têm influenciado no resultado da infecção por *L. (L.) amazonensis*. Por exemplo, demonstra-se que a circulação de anticorpos é muito importante para a manutenção da infecção em camundongos geneticamente modificados, com células B funcionais ou não, mas a ausência desses anticorpos é refratária à infecção por *Leishmania* spp.<sup>49</sup>. O mesmo foi encontrado para animais que produziam anticorpos sem a cadeia gama. A possível explicação para essas observações talvez seja que a IgG, que opsoniza parasitos, é mais eficiente na indução da produção da citocina IL-10 por macrófagos que as imunoglobulinas que não opsonizam e, que essa citocina está relacionada à exacerbação da infecção<sup>50</sup>. Nesse sentido, Miles et al.<sup>46</sup> demonstraram, em animais infectados experimentalmente por *L. (L.) major* e em pacientes com LV, que a presença de imunocomplexos formados por IgG, além de não fornecer proteção à infecção, contribui para a progressão da doença, com prejuízo ao hospedeiro.

Estudos com C57BL/6, camundongo resistente à infecção por *Leishmania* spp., evidenciaram que as células B e os receptores Fc $\gamma$  são necessários ao *clearance* de parasitos e

auxiliam na redução das lesões<sup>51</sup>. Isto se correlaciona com os achados de que a IgG e os receptores de Fc são os responsáveis pela ativação de macrófagos e resultando na produção de superóxidos, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, promovendo uma resposta imune protetora<sup>52</sup>. Outras evidências mostram que as células B, os receptores de Fc $\gamma$  e anticorpos são necessários para o recrutamento de células T e promovem a ativação de macrófagos para os locais de lesão após a infecção *in vivo* por *L. (Mexicana) pifanoi*<sup>53</sup>.

A marcada hipergamaglobulinemia (elevação da fração IgG) e a ausência de imunidade celular são as principais características imunológicas da infecção por *Leishmania* spp.<sup>54,55,56</sup>, sendo descritas em humanos, hamsters e cães com LV devido à ativação policlonal dos linfócitos B<sup>57,58</sup>. Acredita-se que essa ativação seja parcialmente responsável por imunocomplexos circulantes e vários fenômenos autoimunes<sup>59</sup>.

Ensaio experimental da infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos JhD, que não produzem células B, mais uma vez mostraram que os anticorpos estão relacionados à exacerbação da infecção e que as células B também podem estar relacionadas ao aumento da patologia na enfermidade. Esses camundongos apresentaram desenvolvimento mais lento da infecção e lesões de tamanhos menores que os BALB/c. As células BCD19<sup>+</sup> foram consideradas como o principal tipo celular que prolifera em linfonodos de BALB/c infectados, em grau maior que as células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>. Esses resultados sugerem que a proliferação de células BCD19<sup>+</sup> pode estar relacionada à suscetibilidade à infecção. É possível que essas células B estejam causando efeitos adversos durante a infecção pelo aumento da produção de células TCD4<sup>+</sup> e por induzir a migração celular para o local da infecção<sup>60</sup>.

Por se acreditar que esses anticorpos não desempenhem uma função protetora na leishmaniose e adicionalmente, que levam à exacerbação da infecção, Sartori et al.<sup>61</sup> demonstraram seu papel na patogênese de lesões renais, pelo depósito de imunocomplexos que levam à injúria glomerular. Assim, a presença de IgG anti-leishmania na urina é o método

mais específico e menos invasivo para a realização do diagnóstico e do prognóstico em cães infectados por *Leishmania* spp. que apresentam glomerulonefropatias<sup>62</sup>.

Mathias et al.<sup>63</sup>, estudando a patogênese de lesões de fígado e pulmão, avaliaram a presença de IgG total nesses órgãos, em hamsters com LV e verificaram mudanças nas características das lesões e a ocorrência de depósitos de IgG na lesão ao redor de 30-45 dias pós-infecção, o que sugere a participação da IgG na patogênese, ao longo do curso da infecção.

A avaliação do curso da infecção e a resposta imunológica desenvolvida por camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) infantum*, mostraram picos de produção de IgG1 e IgG2a, coincidentes com picos de carga parasitária no baço (56º dia pós-infecção) e no fígado (84º dia pós-infecção). A cinética de ambos os isotipos de IgG estava fortemente relacionada entre si, levando em consideração que IgG1 e IgG2a estão associadas com o desenvolvimento da resposta imune Th2 e Th1, respectivamente<sup>64</sup>. Afrin et al.<sup>65</sup>, em estudo com camundongos infectados com *L. (L.) donovani* e imunizados com antígenos lipossomais, observaram níveis significativamente superiores de IgG1 em relação a IgG2a, IgG2b e IgG3, sugerindo uma resposta Th2 dominante, resultando em fraca proteção contra a LV.

Mohammadi et al.<sup>66</sup>, estudaram dois novos antígenos de *L. (L.) major* em camundongos resistentes e suscetíveis e observaram a produção de uma resposta dominante de IgG2a, nos dois modelos, importante na cura da leishmaniose cutânea.

Na LVC, também se investiga o tipo de resposta imune pela correlação entre as classes e subclasses de IgG<sup>67,68</sup>. A detecção de anticorpos IgG2 específicos contra *Leishmania* spp. foi relacionada a cães assintomáticos e o predomínio de IgG1 com a progressão da enfermidade. Verificou-se que os níveis dessas subclasses, IgG1 e IgG2, são considerados índices de confiabilidade maior do desenvolvimento da doença, que os níveis de IgG total<sup>69</sup>. Nieto et al.<sup>70</sup> observaram, por análise clínica e dos mecanismos imunológicos associados à

LVC experimental, evidências de uma relação direta entre os níveis de IgG1 e IgG2 e o aparecimento dos sinais clínicos, ou seja, os níveis de IgG1 não eram detectáveis em cães que apresentavam a regressão dos sinais clínicos ou a forma oligossintomática. Porém, seus níveis eram elevados, quando os cães apresentavam a forma ativa da doença. Inieta et al.<sup>71</sup> observaram a expressão de classe e subclasses de IgG em todos os animais estudados, sendo que a expressão de IgG1 estava aumentada apenas em cães sintomáticos, podendo ser considerado um marcador de doença ativa.

Alguns estudos discordam dos anteriores. Bourdoiseau et al.<sup>72</sup> verificaram o predomínio de níveis altos de IgG2, enquanto Deplazes et al.<sup>69</sup> relacionaram esses com a ausência de sinais clínicos em cães infectados. Leandro et al.<sup>73</sup> confirmaram que os níveis de IgG1 apresentam o mesmo padrão em todos os animais infectados e a produção de IgG2 é alta nesses animais, não havendo relação com a resistência à infecção. Por outro lado, Almeida et al.<sup>74</sup> associaram a produção alta de IgG2 à resposta Th2 em cães sintomáticos e sua produção baixa associada a cães infectados assintomáticos ou saudáveis. Solano-Gallego et al.<sup>48</sup> estudando a resposta de IgG total, IgG1 e IgG2, na evolução da infecção e após tratamento, em 280 animais em diferentes estágios da infecção, não conseguindo relacionar o *status* clínico do animal e à secreção das subclasses de IgG, embora tenham encontrado níveis elevados de IgG total e IgG2 em cães sintomáticos em comparação aos assintomáticos.

O tratamento da LVC é mais eficiente, quando detectado no início da infecção, com níveis elevados de IgG1 nos animais, sugerindo que o sucesso do tratamento esteja ligado à resposta humoral. O estudo longitudinal realizado por Quinnell et al.<sup>75</sup> mostrou que as subclasses de IgG não são marcadores úteis do estabelecimento de resistência ou de suscetibilidade para LVC.

Pode-se citar ainda outro papel importante do estudo dos títulos de IgG, representado pelas subclasses IgG1 e IgG2, que são ferramentas na distinção da infecção natural e dos

títulos vacinais, respectivamente, no caso de cães vacinados com a vacina comercial para LVC no Brasil<sup>22,76</sup>.

## **2.5. CARGA PARASITÁRIA NA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA* spp.**

O balanço entre células Th1 e Th2 define as diferentes respostas imunes que afetam muitas, se não todas, as células do sistema imune, controlando a carga parasitária observada nos diferentes órgãos de camundongos infectados por *Leishmania* spp. e o padrão de produção de citocinas que podem influenciar na suscetibilidade ou resistência à infecção<sup>47</sup>. Na LVC, comprovou-se uma forte associação entre o número de parasitos, a severidade dos sinais clínicos e a intensidade da resposta imune<sup>77</sup>.

Em camundongos suscetíveis, há um aumento precoce da carga parasitária, na LV, mas a infecção declina, quando é montada uma resposta imune celular, envolvendo células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup><sup>78</sup>. A carga parasitária elevada é observada no fígado e está associada com a produção das citocinas IL-10, IL-6 e INF- $\gamma$  e também da reação granulomatosa<sup>79</sup>. No baço, a carga parasitária é menos pronunciada e está associada à produção das citocinas IL-4, IL-6, IL-10 e INF- $\gamma$  pelos esplenócitos<sup>45,80</sup>, a atividade da arginase<sup>81</sup> e também a migração de células T e dendríticas da polpa branca e da zona marginal para a polpa vermelha, onde se encontram os macrófagos infectados por *Leishmania* spp.

Por outro lado, em camundongos resistentes, ocorre a auto-resolução da infecção com a produção de INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ <sup>82</sup>. Embora o fígado torne-se resistente à reinfecção após a cura da doença<sup>83</sup>, o baço não apresenta proteção contra a reinfecção<sup>84</sup>, caracterizando a LV murina, como modelo de doença com resposta imune órgão-específica.

Rolão et al.<sup>47</sup>, em estudo da resposta imune Th1 e Th2 em camundongos infectados experimentalmente por *L. (L.) infantum*, detectaram parasitos no baço e no fígado já no

primeiro dia de infecção e o parasitismo foi mantido até o final do experimento, demonstrando a precocidade da disseminação do parasito para os órgãos e a competência do estabelecimento e manutenção da infecção em camundongos BALB/c. Melby et al.<sup>85</sup> encontraram parasitos no baço e nos linfonodos de camundongos infectados por *L. (L.) chagasi*, 48 horas pós-inoculação. Outros estudos relatam, em infecção experimental de LV, o *clearance* de parasitos no fígado ocorrendo em torno da quarta semana pós-infecção<sup>84,86,87</sup>. Essas diferenças talvez sejam devidas às variações na virulência entre as diferentes espécies de *Leishmania*, cepas da mesma espécie ou diferentes clones da mesma espécie<sup>88</sup>.

A variação da carga parasitária parece estar associada à cinética de citocinas. No baço os valores altos de INF- $\gamma$  são coincidentes com a redução da carga de parasitos, sugerindo que essa citocina seja responsável pela sua eliminação. Entretanto, tal relação não foi observada para o fígado, pois a produção alta de INF- $\gamma$  ocorreu nos dias 56 e 70 pós-infecção, sem redução da carga de parasitos<sup>47</sup>. Uma razão que talvez explique a diferença entre os órgãos é a produção alta de TGF- $\beta$  detectada no fígado<sup>89</sup>, que age suprimindo a expressão da enzima óxido nítrico sintetase e a produção de INF- $\gamma$  pelos macrófagos, favorecendo a multiplicação do parasito e inibindo o desenvolvimento da resposta imune tipo Th1<sup>47</sup>.

Observou-se que na inoculação de *L. (L.) infantum* em camundongos resistentes ou suscetíveis, o aumento da carga parasitária no fígado está associado aos níveis altos de TGF- $\beta$ , como descrito anteriormente, níveis baixos de citocinas do tipo Th2 e a falta do desenvolvimento da resposta imune celular<sup>90</sup>.

Rolão et al.<sup>47</sup>, sugeriram que o baço seja mais sensível à infecção por *L. (L.) infantum*, pela presença de carga parasitária alta, níveis altos de citocinas Th2 (IL-4 e IL-10), enquanto que o fígado produziu mais citocinas Th1 (INF- $\gamma$ , IL-12).

Wilson et al.<sup>45</sup>, em estudo com camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) chagasi*, para a avaliação da taxa e magnitude da multiplicação do parasito em diferentes órgãos,

demonstraram a elevação inicial da carga de parasitos no fígado, seguido da resolução espontânea da infecção e uma taxa diferente da multiplicação do parasito no baço, com a carga parasitária permanecendo mínima no pico da infecção hepática e elevando-se após a resolução da doença no fígado.

Em cães, foram observadas diferenças na resposta imune no fígado e no baço de animais assintomáticos e sintomáticos. Cães sintomáticos mostraram carga parasitária elevada no fígado e no baço, em relação aos assintomáticos. O fígado de assintomáticos apresentou uma resposta imune eficiente, com formação de granuloma bem organizado, com ativação de células T, macrófagos e células dendríticas. Isso permite ao animal infectado tornar-se cronicamente infectado, com a carga parasitária baixa e sem sinais clínicos. Em contraste, o fígado de cães sintomáticos apresentou um infiltrado composto de células T, não organizado e ineficiente e células de Kupffer intensamente parasitadas, com expressão diminuída de moléculas de ativação. Por fim a resposta imune no baço de assintomáticos e sintomáticos foi similar, sugerindo resposta imune distintas contra a *L. (L.) chagasi* nos órgãos-alvo<sup>91</sup>.

## **2. 6. ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DOS ÓRGÃOS NA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA* spp.**

O principal substrato histopatológico na LV é a multiplicação de amastigotas em células mononucleares fagocíticas dos órgãos internos tais como o baço, fígado e medula óssea<sup>92</sup>, ocorrendo hiperplasia e hipertrofia das células. Outros órgãos como pulmões e rins também são afetados durante a progressão da infecção. Foi observada inflamação intersticial em pulmões, rins e fígado, mas a patogênese ainda não está bem esclarecida<sup>93</sup>.

A diversidade na qualidade e quantidade da resposta imune no hospedeiro contra a infecção é aparente, quando distintos órgãos-alvo são examinados e, o modelo experimental da LV é a mais clara representação dessa diversidade. Na LV experimental, causada pela *L.*

(*L. donovani*)<sup>94</sup>, *L. (L.) infantum* ou *L. (L.) chagasi*<sup>45,84</sup>, a infecção hepática é geralmente auto-limitante e a resposta imune é um bom exemplo de que as células mononucleares são predominantes na resposta inflamatória granulomatosa, envolvendo células de Kupffer, monócitos e células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>. Muitas dessas interações moleculares e celulares, necessárias à eficiente formação do granuloma hepático, são importantes na eliminação de *Leishmania* spp.<sup>95</sup>. As citocinas envolvidas na resposta imune são INF- $\gamma$ , IL-12, IL-4 e TNF, sendo níveis moderados de TNF importantes para a proteção do hospedeiro no fígado, pela observação da produção local de TNF no granuloma hepático<sup>82</sup>. Sabe-se que a administração de doses baixas de TNF- $\alpha$  causa necrose neovascular e doses altas causam necrose vascular madura. A necrose está relacionada com o posterior desenvolvimento de fibrose<sup>96</sup>, pois a sua expressão recruta e ativa macrófagos para o tecido injuriado, provocando a liberação de citocinas fibrogênicas<sup>97</sup>. Por outro lado, ao mesmo tempo em que ocorre a resolução hepática da infecção, a multiplicação de amastigotas no baço é descontrolada e dano tecidual é comum. O excesso de TNF medeia danos na arquitetura e disfunção imunológica do baço, além de estar associado ao estado de inflamação crônica<sup>98</sup>.

Em camundongos BALB/c infectados experimentalmente por *L. (L.) donovani* são descritas alterações histopatológicas dos órgãos e sabe-se que os granulomas são as lesões mais importantes relatadas, sendo formados granulomas maduros no fígado e imaturos no baço e medula óssea. Gutierrez et al.<sup>99</sup> estudaram a dinâmica de sua formação, a deposição de colágeno e a sua resolução no fígado e observaram a formação de inúmeros granulomas nas quatro primeiras semanas de infecção, reduzindo a formação lentamente até a 20ª semana. No início os granulomas são imaturos, de tamanho relativamente constante e contêm amastigotas, indicando que essas sejam capazes de evadir os mecanismos de eliminação. A maturação dos granulomas hepático é dinâmica e a taxa de alteração de imaturos para maduros varia durante a evolução da infecção. O número total de granulomas hepáticos diminui lentamente,

indicando que a formação de novos granulomas é mais lenta que a ocorrência de reabsorção dos granulomas já formados ou resolução dos mesmos.

A dinâmica de formação de granulomas ocorre após introdução dos parasitos na corrente sanguínea, sendo esses sequestrados pelos macrófagos do baço e do fígado. No fígado, as células de Kupffer fagocitam os micro-organismos, mas apesar de suas propriedades endocítica e secretória, há uma falha na produção de intermediários reativos de oxigênio, um de seus principais mecanismos antimicrobianos<sup>100,101</sup>. Em consequência formas amastigotas se multiplicam e concomitantemente ocorre a agregação de células de Kupffer para formar o núcleo dos granulomas.

A segunda etapa na formação de granulomas ocorre nas proximidades ou no parênquima hepático e depende de fatores quimiotáticos que induzem a migração de células (granulócitos, linfócitos e monócitos). A rápida migração e a preponderância precoce das células T helper pode dar início a uma série de eventos importantes. Em primeiro lugar, a produção de IFN- $\gamma$  serve para manter a produção de intermediários reativos de oxigênio pelos monócitos<sup>102</sup>, sendo essas células ativadas capazes de degradar e matar amastigotas fagocitadas<sup>103</sup>. Células T helper podem produzir citocinas como IL-2, IL-3 e IL-4, cada qual com funções específicas na imunidade mediada por células. O caminho dessas células não é claro, mas inclui a destruição no granuloma.

O centro do granuloma em desenvolvimento consiste em células de Kupffer infectadas e com a progressão da lesão, são encontrados macrófagos infectados. Sabe-se que as células de Kupffer são hospedeiras permissivas de amastigotas, não respondem ao IFN- $\gamma$  e uma resposta humoral ou mediada por células podem influenciar pouco a sobrevivência dos parasitos dentro do vacúolo dessas células. Por isso, é necessário um mecanismo para destruir a célula hospedeira e liberar o seu conteúdo no ambiente extracelular. Os anticorpos, o sistema complemento e outras moléculas secretadas no local, modificam o parasito no

ambiente extracelular e o preparam para sofrer nova ação de fagócitos. Após a destruição dos parasitos, o estímulo para a formação do granuloma cessa e, quando ocorre um novo desafio, as células hepáticas já estão preparadas e a fagocitose de parasitos por células de Kupffer desencadeia uma nova cascata de mediadores, o que resulta em uma resposta celular local rápida, migração celular e morte imediata de amastigotas<sup>104</sup>.

Bradley e Kirkley<sup>105</sup> descreveram o curso da infecção *L. (L.) donovani* em sete linhagens de camundongos, mencionando a formação de granulomas no fígado em seis delas, mas sem a descrição das lesões ou da evolução da formação de granulomas.

Mathias et al.<sup>63</sup>, em estudo com hamsters com LV para a detecção de IgG total em pulmões e fígado, observaram que as lesões em diferentes órgãos foram progressivas, com mudanças notáveis em suas características durante a evolução da infecção. No fígado, o infiltrado inflamatório de células mononucleares tornou-se mais proeminente que a hiperplasia das células de Kupffer nos últimos momentos do estudo e, nos pulmões, a população de células no infiltrado intersticial modificou-se durante o curso da infecção. Também no fígado, o aumento progressivo da hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer foi observado do 7º ao 80º dias pós-infecção, quando a hiperplasia tornou-se menos pronunciada. Focus de células mononucleares foram observados desde o 7º dia pós-infecção, iniciando nos espaço periportal e centrolobular.

O estudo da formação do granuloma hepático de cães com LVC mostrou granulomas de tamanhos variados, constituídos por macrófagos, parasitados ou não por formas amastigotas de *L. (L.) chagasi*, algumas células epitelióides, poucos linfócitos e plasmócitos e raros neutrófilos. Cães assintomáticos apresentaram número maior de granulomas que oligossintomáticos e sintomáticos. Quanto ao parasitismo do fígado, não houve diferenças entre os grupos<sup>106</sup>. Por outro lado, no estudo do baço de cães infectados naturalmente por *L.*

*(L.) chagasi*, observou-se frequência alta de periesplenites, granuloma, desorganização estrutural e atrofia de folículos linfóides e da zona marginal<sup>107</sup>.

A fibrose em cães infectados naturalmente por *L. (L.) chagasi*, dividido em grupos assintomáticos e sintomáticos, todos os cães apresentaram fibrose intralobular e a deposição de colágeno. Houve diferenças significativas entre os grupos sendo que os cães sintomáticos apresentaram maior deposição de colágeno em relação aos assintomáticos. Foi observada em dois casos, fibrose intralobular difusa peculiar, em que as fibras colágenas circundavam grupos pequenos de hepatócitos<sup>108</sup>.

Considerando-se a importância dos aspectos imuno-patológicos na infecção por *L. (L.) chagasi*, estudou-se o comportamento do parasito no hospedeiro, proliferação e mecanismo de escape ao sistema imune, também em relação ao hospedeiro infectado e a sua resposta imunológica frente ao parasito.

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar a resposta imune humoral, a carga parasitária e os aspectos histopatológicos das lesões presentes no fígado em camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) chagasi* e imunossuprimidos.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Estudar a resposta imune humoral por meio das subclasses de IgG: IgG1 e IgG2a, nos dias 15, 30, 60, 75 e 90 pós-infecção, em camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) chagasi* e imunossuprimidos, por ensaio imunoenzimático (ELISA);
- Quantificar a carga parasitária do baço e fígado de camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) chagasi*, nos dias 15, 30, 60, 75 e 90 pós-infecção, pelo método de microtitulação em cultura;
- Avaliar as alterações histopatológicas e confirmar a presença de formas amastigotas no fígado de camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) chagasi* e imunossuprimidos, nos dias 15, 30, 60, 75 e 90 pós-infecção, pela coloração de Hematoxilina-Eosina e pela reação de imunoistoquímica;
- Correlacionar as variáveis resposta imune humoral, a carga parasitária do baço e do fígado e as alterações histopatológicas do fígado de camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) chagasi* e imunossuprimidos, nos dias 15, 30, 60, 75 e 90 pós-infecção.

## **IV. MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, da Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, campus de Botucatu-SP, protocolo nº 124/2008-CEEA.

### **4.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO**

O estudo foi conduzido na cidade de Botucatu, Estado de São Paulo, nas dependências do Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses (NUPEZO), no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, – FMVZ, UNESP – Campus de Botucatu.

#### 4.2. ANIMAIS

Foram utilizados 96 camundongos machos de linhagem isogênica BALB/c, com sete semanas de idade, provenientes do CEMIB<sup>1</sup>. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno alocadas em uma estante ventilada (Alesco Ind. e Com. Ltda, Monte Mor - Brasil), localizada no infectório do Núcleo de Pesquisa em Zoonoses da FMVZ-UNESP-Botucatu/SP, que possui janelas e portas teladas (tela de 0,7 mm). Os camundongos não passaram por qualquer privação alimentar ou hídrica, recebendo ração comercial específica para a espécie (Nutrilabor® - Guabi, Campinas, Brasil) e água *ad libitum*.

#### 4.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram formados quatro grupos com 24 camundongos em cada, de acordo com o que se segue:

**Grupo I:** 24 camundongos BALB/c **não infectados e não imunossuprimidos** (sem tratamento - **controle**).

**Grupo II:** 24 camundongos BALB/c **imunossuprimidos** com pentoxifilina e dexametasona.

---

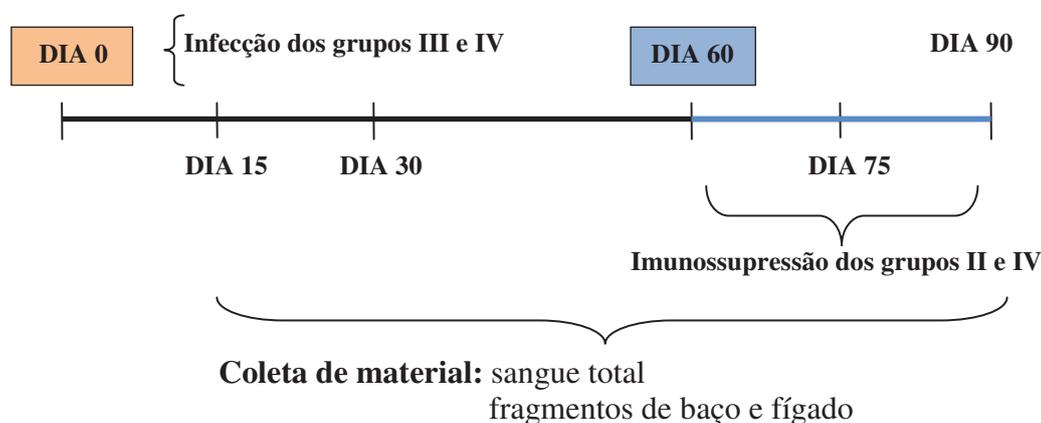
<sup>1</sup> Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica, da Universidade de Campinas – UNICAMP – Campinas-SP.

**Grupo III:** 24 camundongos BALB/c **infectados** por *L. (L.) chagasi*.

**Grupo IV:** 24 camundongos BALB/c **infectados** por *L. (L.) chagasi* e **imunossuprimidos** com pentoxifilina e dexametasona.

#### 4.4. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Segue abaixo a linha representativa do estudo, para melhor visualização dos momentos e procedimentos realizados nos grupos de animais.



#### 4.5. INFECCÃO

Os animais de todos os grupos foram anestesiados com o Cetamina<sup>2</sup> (dose: 100 mg/kg) e Xilazina<sup>3</sup> (dose: 10 mg/kg), por via intramuscular de acordo com Curl e Peters<sup>109</sup>, para minimizar os traumas durante a manipulação para o procedimento de infecção. Em camundongos dos grupos **III** e **IV** procedeu-se a infecção pela inoculação de formas amastigotas de *L. (L.) chagasi* cepa M6445, fornecida pelo Laboratório de Protozoologia -

<sup>2</sup> Cloridrato de Cetamina - KETAMIN® 50 mg/mL - Laboratório Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira/SP.

<sup>3</sup> Cloridrato de Xilazina - ROMPUN® 20 mg/mL - Bayer HealthCare S.A., São Paulo/SP.

IMTSP<sup>4</sup>, com a dose infectante de  $10^7$  promastigotas/mL de solução salina<sup>5</sup>, perfazendo um volume de 100  $\mu$ L, por via intravenosa, no plexo venoso retro-orbital<sup>110</sup>. A cepa M6445 foi mantida, por passagens a cada dois meses, em hamster SÍrio Dourado (*Mesocricetus auratus*), obtidos do ANILAB<sup>6</sup> (Apêndice A).

Foi realizada a inoculação de água para injeção<sup>7</sup> em camundongos dos grupos **I** e **II**, com o mesmo volume e pela mesma via de inoculação citados anteriormente.

**O dia da inoculação foi considerado o dia zero da infecção.**

#### **4.6. IMUNOSSUPRESSÃO**

Os animais pertencentes aos grupos **II** e **IV** foram imunossuprimidos a partir do dia 60 até 90 dias pós-infecção, perfazendo 30 dias. A dose utilizada de fosfato dissódico de **dexametasona**<sup>8</sup> (classe dos corticosteróides) foi de **15 mg/kg/dia** em um volume de 200  $\mu$ L/dia, pela via intraperitoneal e a de **pentoxifilina**<sup>9</sup> foi de **150 mg/kg/dia** em um volume de 300  $\mu$ L/dia, pela via subcutânea, na região escapular<sup>37</sup>.

---

<sup>4</sup> Instituto de Medicina Tropical – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP, São Paulo-SP.

<sup>5</sup> Solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% - Laboratório Sanobiol Ltda., São Paulo/SP.

<sup>6</sup> Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda, Paulínia/SP.

<sup>7</sup> Água para injeção - 10 mL – solução estéril, apirogênica e hipotônica - Samtec Biotecnologia Ltda, Ribeirão Preto/SP.

<sup>8</sup> Fosfato dissódico de dexametasona – Decadron® 4 mg - Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A.

<sup>9</sup> Pentoxifilina - Trental® 400 mg – Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda.

Foi realizada a inoculação de água para injeção em animais dos grupos **I** e **III**, com o mesmo volume e pela mesma via de inoculação citados anteriormente.

#### **4.7. OBTENÇÃO DE AMOSTRAS**

A obtenção de amostras iniciou com **15 dias pós-infecção**. A partir desse momento, quatro camundongos pertencentes a cada um dos grupos **I, II, III, e IV**, nos dias 15, 30, 60, 75 e 90 pós-infecção, foram anestesiados em uma câmara de acrílico, administrando-se isofluorano<sup>10</sup> (5V%), diluído em oxigênio (5 L/min), para a coleta de amostras de sangue total, pela punção do plexo venoso retro-orbital, com o auxílio de um tubo capilar e acondicionamento em um tubo de ensaio de vidro. As amostras foram centrifugadas para separação do soro e armazenadas a -80 °C e, posteriormente, foram utilizadas para a detecção das subclasses de IgG: IgG1 e IgG2a, pelo método de ELISA, segundo Rolão et al.<sup>47</sup>.

Em seguida foi realizado o procedimento de eutanásia dos animais, nas condições citadas anteriormente, aumentando-se o tempo de permanência na câmara anestésica, até que ocorresse a parada cardiorrespiratória, para a obtenção dos fragmentos de baço e de fígado. Um fragmento de cada órgão foi utilizado imediatamente para a determinação da carga parasitária, pelo método de microtitulação em cultura e outro fragmento de fígado, fixado em solução de formalina a 10 % e incluído em parafina para realização de cortes histopatológicos e posterior avaliação das alterações causadas pela infecção. Todo material foi obtido de forma asséptica e estéril.

#### **4.8. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL**

A resposta humoral de subclasses de IgG (IgG1 e IgG2a) foi avaliada pela pesquisa no soro dos camundongos BALB/c dos grupos **III** e **IV**. As amostras de soro dos grupos **I** e **II**

---

<sup>10</sup> Isofluorano - Forane® 100 ml – Abbott Laboratórios do Brasil Ltda, Rio de Janeiro/RJ.

foram utilizadas como controles negativos. A técnica utilizada foi o ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto, utilizando-se antígeno de proteína de promastigotas de *L. (L.) major* que passaram pelo processo de sonicação e anticorpos monoclonais conjugados à biotina comerciais, anti-IgG1<sup>11</sup> e anti-IgG2a<sup>12</sup> de camundongo (BD Pharmingen™, Califórnia, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

As microplacas de poliestireno de 96 poços (Maxisorb, Nunc Internacional, EUA), foram sensibilizadas com 100 µL da solução, por poço, de antígeno de *L. (L.) major* na concentração de 10 µg/mL em **tampão de ligação** (pH 9,6) (Apêndice B), incubadas a 4 °C por toda à noite.

Após a sensibilização as placas foram lavadas por cinco vezes com **tampão de lavagem** (Apêndice B) e bloqueadas com 200 µL por poço, de **tampão de bloqueio** (Apêndice B), por 1 hora, em estufa a 37 °C. Em seguida as placas foram lavadas como descrito anteriormente.

As amostras foram diluídas em **tampão bloqueio**, na diluição de 1:20 e adicionados 100 µL das amostras, por poço. Dois poços da placa foram deixados apenas com tampão de bloqueio para funcionarem como branco da reação. Esta etapa do ensaio foi incubada por 1 hora, em estufa a 37 °C e em seguida, a placa foi lavada como já descrito.

Posteriormente, foram adicionados 100 µL, por poço, de anticorpo anti-IgG1 ou anti-IgG2 de camundongo conjugado à biotina, diluído em 1:1000 em **tampão de bloqueio**. A incubação foi realizada por 1 hora, em estufa a 37 °C. Aos 30 minutos antes do final da incubação foi preparada a **solução de estreptavidina/biotina/peroxidase** – StrepAB HRP Dako® (Dakocytomation, Dinamarca), de acordo com a recomendação do fabricante (Apêndice B), em uma diluição de 1:1000 e incubada à temperatura ambiente. A lavagem das placas foi realizada como nas outras etapas.

---

<sup>11</sup> Anticorpo monoclonal anti-IgG1 de camundongo conjugado à biotina, 0,5 mg, clone A85-1

<sup>12</sup> Anticorpo monoclonal anti-IgG2 de camundongo conjugado à biotina, 0,5 mg, clone R19-15

As placas foram cobertas com 100 µL, por poço, da **solução de estreptavidina/biotina/peroxidase** e incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Seguiu novamente a etapa de lavagem. E por fim, as placas foram cobertas com 100 µL, por poço, da **solução reveladora** composta pelo cromógeno **orto-fenilenodiamina** (OPD) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, EUA), substrato de **água oxigenada** (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e **tampão citrato-fosfato** (Apêndice B).

A reação ocorreu em cinco minutos, em ambiente escuro e foi interrompida pela adição de 50 µL, por poço, de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 16 %. A leitura foi realizada em espectrofotômetro para microplacas de 96 poços, Multiskan EX® (MTX La Systems, INC, Vienna, EUA), utilizando-se filtro para comprimento de onda de 492 nm. Os resultados foram expressos em densidade óptica (D.O.).

#### **4.9. DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA**

A carga parasitária foi determinada pelo método de microtitulação em cultura de acordo com Buffet et al.<sup>111</sup>. Para tal, todo procedimento foi realizado de modo estéril. Foram pesados os fragmentos de baço e de fígado e adicionados 4 mL de meio Drosophila de Schneider (Invitrogen, Calrsbad, EUA) suplementado com 20 % de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil), penicilina<sup>13</sup> e estreptomicina<sup>14</sup> para maceração.

Foram preparadas microplacas de poliestireno de 96 poços (Maxisorb, Nunc Internacional, EUA) pela adição de 225 µL de meio Drosophila de Schneider, por poço, exceto na primeira coluna. Na primeira coluna, foram adicionados 300 µL, por poço, dos

---

<sup>13</sup> Penicilina – 10000 UI/mL – Cultilab, Campinas/SP.

<sup>14</sup> Estreptomicina – 10 mg/mL – Cultilab, Campinas/SP.

homogenatos de baço e de fígado obtidos anteriormente, em quadruplicata. Em seguida, foram realizadas diluições sucessivas, passando-se 75 µL do homogenato dos órgãos ou solução contidos nas colunas para as colunas seguintes e assim por diante, obedecendo à razão 4. As placas foram incubadas por sete dias, à temperatura de 28 °C, com 5 % de CO<sub>2</sub>.

A leitura foi realizada em microscópio invertido, com aumento de 200x. Foi considerado como título final a última diluição que apresentou pelo menos um parasito viável. Para o cálculo do número de parasitos por grama (carga parasitária), correspondente ao órgão tem-se:

**Carga parasitária** = (média geométrica do título de cada quadruplicata/ peso do fragmento do órgão) x 400, sendo 400 a fração do órgão homogeneizado e colocado no primeiro poço antes da diluição.

#### **4.10. EXAME HISTOPATOLÓGICO**

O processamento histopatológico foi realizado no Serviço de Patologia Veterinária do Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ - UNESP, campus de Botucatu-SP. Os fragmentos de fígado previamente fixados em solução de formalina a 10 % foram clivados e acondicionados em cassetes plásticos, identificados e processados segundo os métodos de rotina que compreendem desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Foram realizados cortes histológicos de 3 µm de espessura e corados pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE), para exame em microscopia de luz.

#### **4.11. REAÇÃO DE IMUNOISTOQUÍMICA EM TECIDOS INCLUÍDOS EM PARAFINA**

A técnica foi realizada a partir dos fragmentos de fígado previamente incluídos em parafina. Foram realizados cortes de 3 µm de espessura e processou-se segundo os métodos de rotina que são desparafinização, hidratação, recuperação do antígeno pelo calor, inibição da peroxidase endógena e inibição de ligações inespecíficas. Foi utilizado anticorpo primário policlonal anti-leishmania na diluição de 1:800, produzido em camundongos, gentilmente cedido pelo Laboratório da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP, LIM 500. O anticorpo monoclonal secundário ligado à biotina comercial, a solução de avidina/biotina/peroxidase e o cromógeno 3-3-diaminobenzedina (DAB) foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante do kit Novolink (Leica® Biosystems Newcastle Ltd., United Kingdom)<sup>15</sup>

#### **4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados referentes à avaliação sorológica foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Ambos os resultados foram significativos e optou-se por testes não-paramétricos. Portanto, aplicou-se o teste de Mann-Whitney buscando comparar as médias de produção das subclasses IgG1 ou IgG2a, entre os grupos III e IV, em cada momento do estudo. Para comparar a produção das subclasses de IgG1 ou IgG2a, ao longo da infecção (independente do momento), em cada grupo III ou IV, utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis e para comparar a produção de IgG1 com IgG2a, independente do grupo e do momento e no mesmo grupo, independente do momento, como também no grupo III ou IV e com momentos definidos, optou-se pelo teste de Wilcoxon.

Em relação à carga parasitária, também foi realizado o teste de Shapiro-Wilk, para analisar a normalidade da distribuição e o teste de Levene para checar a homogeneidade de

---

<sup>15</sup> Kit Novolink (Polymer Detection System) – 250 testes, Leica® Biosystems Newcastle Ltd.,(Ref RE 7140-K).

variâncias. Os valores da carga parasitária foram transformados em logaritmos, com o objetivo de atingir tanto a homogeneidade de variâncias, como a normalidade de distribuição. Posteriormente, aplicou-se o teste de variância multivariada (MANOVA) para checar o efeito do grupo e do momento sobre a carga parasitária do animal (definidas pelas cargas parasitárias do fígado e do baço). Utilizaram-se ambas as cargas como variáveis dependentes e o grupo e o momento como independentes. Avaliou-se a homogeneidade das matrizes de covariância utilizando-se o teste de Box. Detectando-se o efeito significativo do grupo, do momento e a positividade do efeito de interação sobre a carga parasitária (utilizando-se a significância em  $P$  da maior raiz de Roy), partiu-se para análises utilizando-se o modelo linear generalizado (GLM) como segue:

$$CP_{(klmn)} = \beta + grupo_k + amostra_l + momento_m + grupo*amostra + grupo*momento + amostra*momento + grupo*amostra*momento + \varepsilon_n$$

Em que  $CP$  = carga parasitária (valor convertido em escala logarítmica),  $\beta$  é o intercepto,  $grupo_k$  é o grupo ao qual o animal pertence (III – infectados, IV – infectados e imunossuprimidos),  $amostra_l$  é a amostra em estudo (1 = baço, 2 = fígado),  $momento_m$  é o efeito do momento do estudo (1 = 15, 2 = 30, 3 = 60, 4 = 75, 5 = 90, todos os momentos pós-infecção),  $grupo*amostra$  é o efeito da interação entre o grupo ao qual o animal pertence e o momento de estudo,  $amostra*momento$  é o efeito da interação entre a amostra estudada e o momento de estudo,  $grupo*amostra*momento$  é o efeito da interação entre as três variáveis e  $\varepsilon_n$  fator de erro. Para o ajuste do modelo, foram avaliados todos os parâmetros necessários, considerando-se critérios pré-estabelecidos<sup>112</sup>. Contrastes ortogonais foram calculados de acordo com os efeitos detectados na análise principal, buscando evidenciar diferenças entre os grupos, amostras e momentos.

Para correlacionar a produção das subclasses IgG1 e IgG2a à produção da carga parasitária no baço e no fígado, nos grupos III e IV, aplicou-se o teste de correlação de Spearman. Para valores de  $P$  com 5 % de significância.

As análises dos dados foram efetuadas empregando-se o programa estatístico SAS (SAS Institute, 2008).

## V. RESULTADOS

### 5.1. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL

#### IgG1 x IgG2a

Inicialmente aplicou-se *Wilcoxon Signed Ranks Test* buscando comparar diferenças quanto às médias de produção da subclasse IgG1 com IgG2a, independente do grupo e do momento e foram encontradas diferenças significativas ( $P < 0,0001$ ), sendo observada a produção mais elevada de IgG1 (Tabela 1).

**Tabela 1** - Valores das médias de IgG1 e IgG2a e percentis, independente do grupo e do momento de estudo. Botucatu, 2011

Amostra	Média	Percentil	
		P25	P75
IgG1	0,8516 <sup>a</sup>	0,0498	1,4268
IgG2a	0,6576 <sup>b</sup>	0,0263	1,0030

<sup>a,b</sup> valores de médias seguidos de letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Wilcoxon

O mesmo teste foi aplicado para comparar as médias de produção de IgG1 com IgG2a em um grupo específico, III (infectado) ou IV (infectado e imunossuprimido), independente do momento, em que também foram encontradas diferenças significativas para as subclasses de IgG ( $P = 0,014$  e  $P = 0,009$ ), respectivamente. Nas duas comparações IgG1 apresentou-se

mais elevada (Tabela 2). Mas quando em tal comparação considera-se o momento, não foram

Grupo	Amostra	Média	Percentil	
			P25	P75
3	IgG1	0,9866 <sup>a</sup>	0,0498	1,5983
	IgG2a	0,8172 <sup>b</sup>	0,0263	1,6272
4	IgG1	0,7166 <sup>A</sup>	0,0365	1,2333
	IgG2a	0,4979 <sup>B</sup>	0,0248	0,8575

encontradas diferenças significativas nas produções das subclasses de IgG (Tabela 3).

**Tabela 2** - Valores das médias de IgG1 e IgG2a e percentis, no grupo III (infectado) e IV (infectado e imunossuprimido), independente do momento de estudo. Botucatu, 2011

<sup>a,b/A,B</sup> valores de médias, dentro do mesmo grupo, seguidos de letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Wilcoxon

#### **Grupo infectado (III) x Grupo infectado e imunossuprimido (IV)**

No teste de Mann-Whitney detectou-se para as médias de produção da mesma subclasse de imunoglobulina (IgG1 ou IgG2a), em diferentes momentos, independente do grupo, diferenças significativas, tanto para IgG1 quanto para IgG2a ( $P = 0,02$ ), apenas no período 90 dias pós-infecção. O grupo III produziu quantidade mais elevada das duas imunoglobulinas, três vezes mais para IgG1 e 2,4 vezes mais para IgG2a (Tabela 3, Figura 1).

**Tabela 3** - Valores das médias de IgG1 e IgG2a e percentis, nos grupos III (infectado) e IV

Grupo	Amostra	Momento	Média	Percentil	
				P25	P75
3	IgG1	15	0,016	0,010	0,027
		30	0,070	0,049	0,094
		60	1,356	1,375	1,588
		75	1,283	1,099	1,458
		90	2,208 <sup>a</sup>	2,140	2,280
	IgG2a	15	0,010	0,000	0,022
		30	0,028	0,016	0,038
		60	0,794	0,727	0,874
		75	1,483	1,009	1,810
		90	1,771 <sup>A</sup>	1,620	1,930
4	IgG1	15	0,009	0,007	0,011
		30	0,131	0,060	0,221

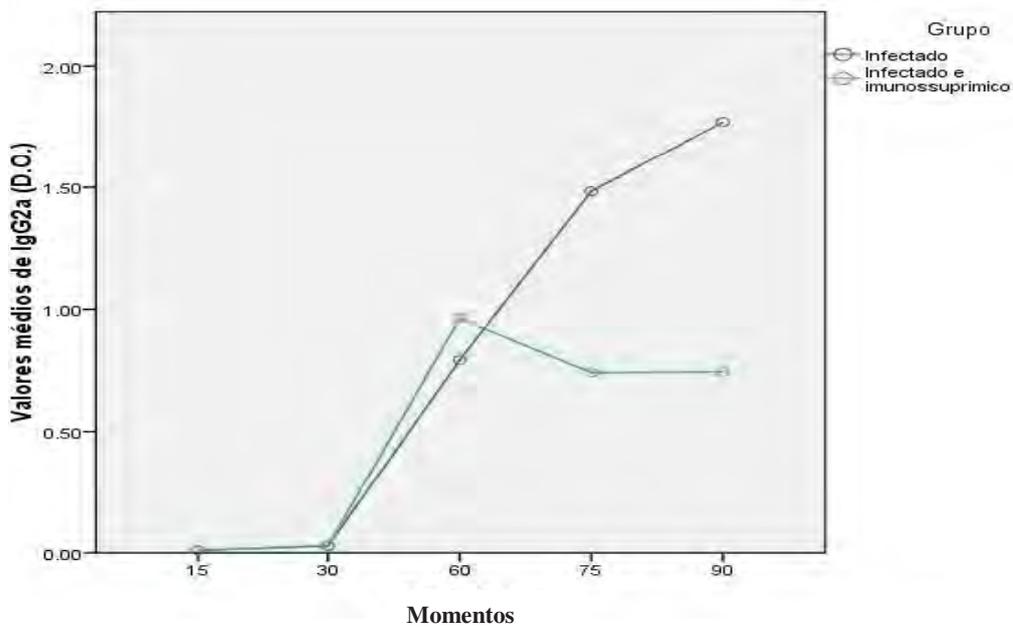
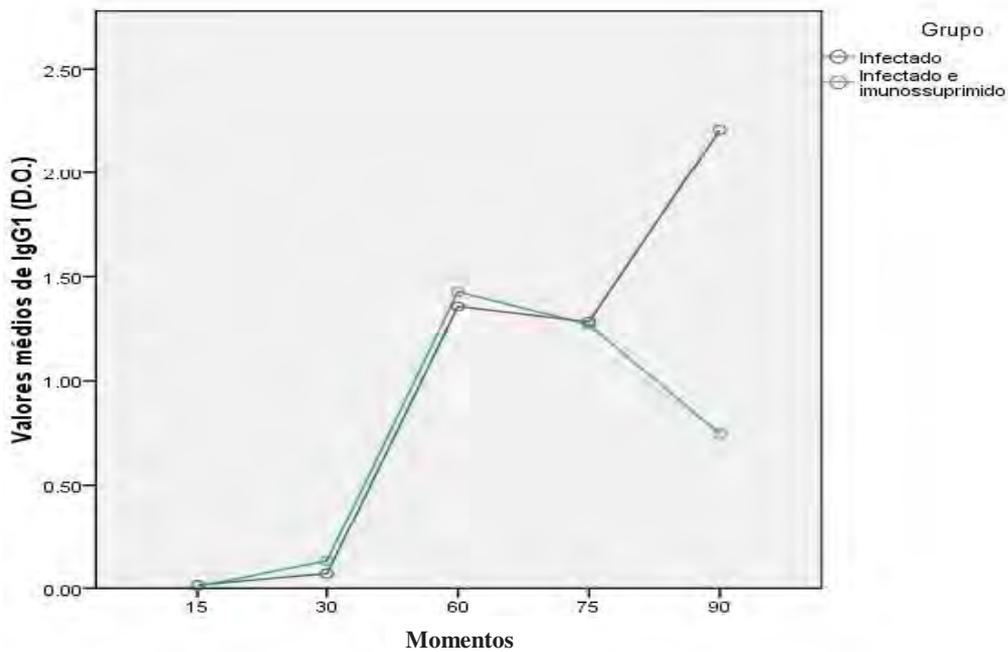
(infectado e imunossuprimido), em todos os momentos do estudo. Botucatu, 2011

	60	1,427	1,290	1,580
	75	1,269	1,020	1,530
	90	0,746 <sup>b</sup>	0,580	0,920
IgG2a	15	0,011	0,003	0,019
	30	0,029	0,012	0,041
	60	0,963	0,742	1,217
	75	0,742	0,546	0,940
	90	0,745 <sup>B</sup>	0,580	0,920

<sup>a,b/A,B</sup> valores de médias, da mesma subclasse de IgG, seguidos de letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Mann-Whitney

Para traçar o perfil das subclasses de imunoglobulinas, ao longo da infecção, nos grupos III ou IV, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis e foi observado para os dois grupos (III e IV), para as duas imunoglobulinas, que houve diferença significativa nas suas produções (grupo III,  $P = 0,002$  para ambas as imunoglobulinas e no grupo IV,  $P = 0,002$ , para IgG1 e  $P = 0,005$ , para IgG2a). Observou-se que as diferenças são derivadas da produção mais elevada de imunoglobulinas a partir do 60º dia pós-infecção (Figura 1, Tabela 3). Quando comparados os momentos de 15 e 30 dias pós-infecção com 75 e 90 dias pós-infecção, em ambos os grupos para as duas subclasses de imunoglobulina, foi observado que houve produção mais elevada de IgG1 e IgG2a no momento final, para os dois grupos (Figura 1).

**Figura 1** - Valores das médias de IgG1 e IgG2a para os grupos III (infectado) e IV (infectado e imunossuprimido), nos momentos estudados. Botucatu, 2011



#### DETERMINAÇÃO DA CAR<sub>1</sub> [A

Na análise de variâncias multivariadas (MANOVA) detectou-se o efeito do **grupo** ou do **momento** sobre as cargas parasitárias do baço e do fígado,  $F(2,29) = 5,77, P = 0,008$ ;  $F(4,30) = 20,75, P < 0,001$ , respectivamente. Detectou-se também o efeito da interação entre **grupo e momento** sobre a carga parasitária dos órgãos,  $F(4,30) = 2,72, P = 0,048$ .

Quando realizada a análise univariada detectou-se o efeito do **grupo**,  $F(1) = 8,39$ ,  $P = 0,005$ , o efeito da interação entre **grupo e momento**,  $F(4) = 4,21$ ,  $P = 0,005$  e o efeito da interação entre **amostra e momento**,  $F(4) = 8,61$ ,  $P < 0,001$  sobre a carga parasitária dos órgãos. No entanto, não foi detectado efeito da interação de três variáveis (**grupo, amostra e momento**),  $F(4) = 0,47$ ,  $P = 0,753$  ou da interação entre **grupo e amostra**,  $F(1) = 3,65$ ,  $P = 0,006$  nem efeito do **momento** ou da **amostra** sobre a carga parasitária,  $F(4) = 2,35$ ,  $P = 0,06$ ;  $F(1) = 1,90$ ,  $P = 0,17$ , respectivamente.

### Efeito do grupo

Observou-se que os grupos diferiram entre si, independente das outras variáveis (momento e amostra) em relação à carga parasitária. O grupo III (infectados) apresentou média 8,773 e o grupo IV (infectados e imunossuprimidos) média 9,116;  $t = 2,9$ ,  $P < 0,005$ . Havendo, assim uma produção mais elevada de carga parasitária pelos animais do grupo IV, independente do órgão (Tabela 4).

**Tabela 4** - Médias das cargas parasitárias dos grupos III (infectado) e IV (infectado e imunossuprimido) e seus limites inferiores e superiores. Botucatu, 2011

Grupo	Média	95% Intervalo de Confiança	
		Limite inferior	Limite superior
3	8.773 <sup>a</sup>	8.605	8.940
4	9.116 <sup>b</sup>	8.949	9.284

<sup>a,b</sup> valores de médias seguidos de letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de *General linear model* (GLM)

### Efeito da interação entre grupo e momento

Nos contrastes ortogonais o efeito da interação entre **grupo e momento** reflete a diferença das cargas parasitárias entre os grupos III e IV, nos momentos de 75 e 90 dias pós-infecção,  $t = 4,04$ ,  $P = 0,0002$ ;  $t = -2,74$ ,  $P = 0,008$ , respectivamente, independente do órgão, momento em que os animais do grupo IV estavam imunossuprimidos. Para os dois momentos, o grupo IV apresentou carga parasitária maior (Tabela 5).

**Tabela 5** - Médias das cargas parasitárias dos grupos III (infectado) e IV (infectado e imunossuprimido) e seus limites inferiores e superiores, nos momentos estudados. Botucatu, 2011

<sup>a,b/A,B</sup> valores de médias, em grupos diferentes, seguidos de letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de *General linear model* (GLM)

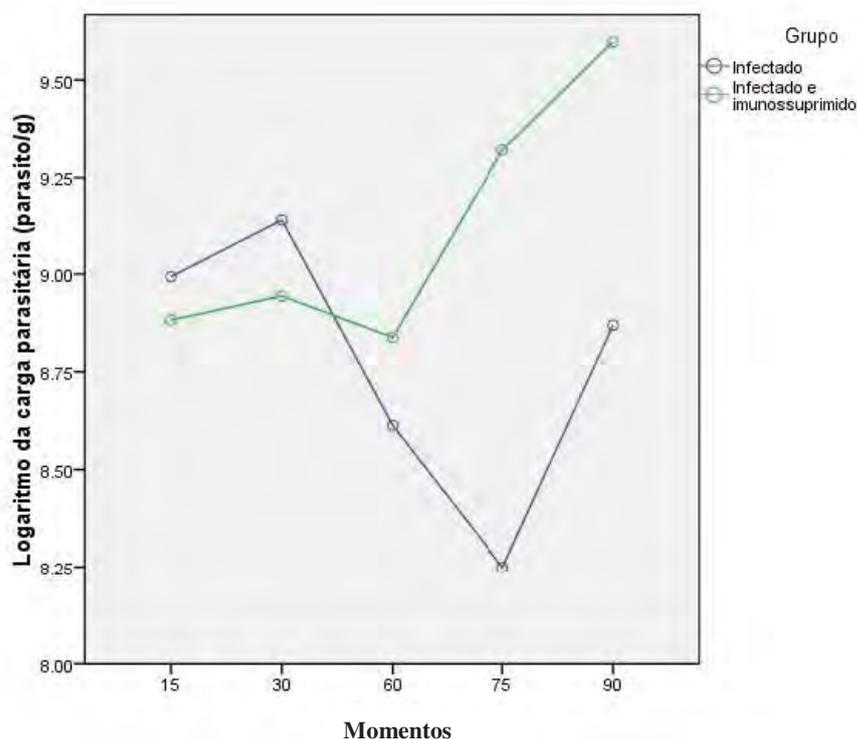
Quando comparadas as médias das cargas parasitárias dentro do mesmo grupo (III ou IV), independente do órgão, 15 e 30 dias pós-infecção com os 75 e 90 dias pós-infecção, ou seja, foi realizada a comparação a partir de dois momentos em que os animais estavam apenas infectados (sem diferença entre os grupos III e IV) com dois momentos em que os animais além de infectados estavam imunossuprimidos. Para os dois grupos III ou IV, foram encontradas diferenças significativas,  $t = -2,70$ ,  $P = 0,009$ ;  $t = 2,91$ ,  $P = 0,005$ ,

Grupo	Momento	Média	95% Intervalo de Confiança	
			Limite inferior	Limite superior
3	15	8.993	8.618	9.369
	30	9.138	8.763	9.514
	60	8.613	8.237	8.988
	75	8.249 <sup>a</sup>	7.874	8.625
	90	8.869 <sup>A</sup>	8.494	9.245
4	15	8.882	8.507	9.258
	30	8.944	8.568	9.319
	60	8.838	8.462	9.213
	75	9.321 <sup>b</sup>	8.945	9.697
	90	9.598 <sup>B</sup>	9.222	9.973

respectivamente. Pode-se observar melhor esta diferença na Figura 2, em que a carga parasitária no grupo III, tendeu a decrescer em relação ao momento inicial, no entanto, ocorreu o inverso para o grupo IV, em que a carga parasitária aumentou no momento final em

relação ao inicial. No entanto, para a comparação feita entre os grupos III e IV, nos momentos de 75 e 90 dias pós-infecção, ou seja, em que os animais do grupo IV apresentavam-se infectados e imunossuprimidos, foram encontradas diferenças significativas,  $t = 4,79$ ,  $P = 0,0001$ , em que o grupo IV apresentou carga parasitária mais elevada (Figura 2).

**Figura 2** - Valores de cargas parasitárias nos grupos III e IV, nos momentos estudados.  
Botucatu, 2011



### Efeito da interação entre amostra e momento

Nos contrastes ortogonais o efeito da interação entre **amostra e momento** reflete a diferença das cargas parasitárias do baço e do fígado, nos momentos 15, 30 e 60 dias pós-infecção, independente do grupo (III e IV),  $t = 4,17$ ,  $P = 0,0001$ ;  $t = 2,98$ ,  $P = 0,004$ ;  $t = -2,60$ ,  $P = 0,01$ , respectivamente. Pode-se observar que a carga parasitária no fígado é mais elevada 15 e 30 dias pós-infecção e 60 dias pós-infecção o baço passou a apresentar carga parasitária mais elevada (Tabela 6, Figura 3).

**Tabela 6** - Médias das cargas parasitárias do baço e do fígado e seus limites inferiores e superiores, nos momentos estudados. Botucatu, 2011

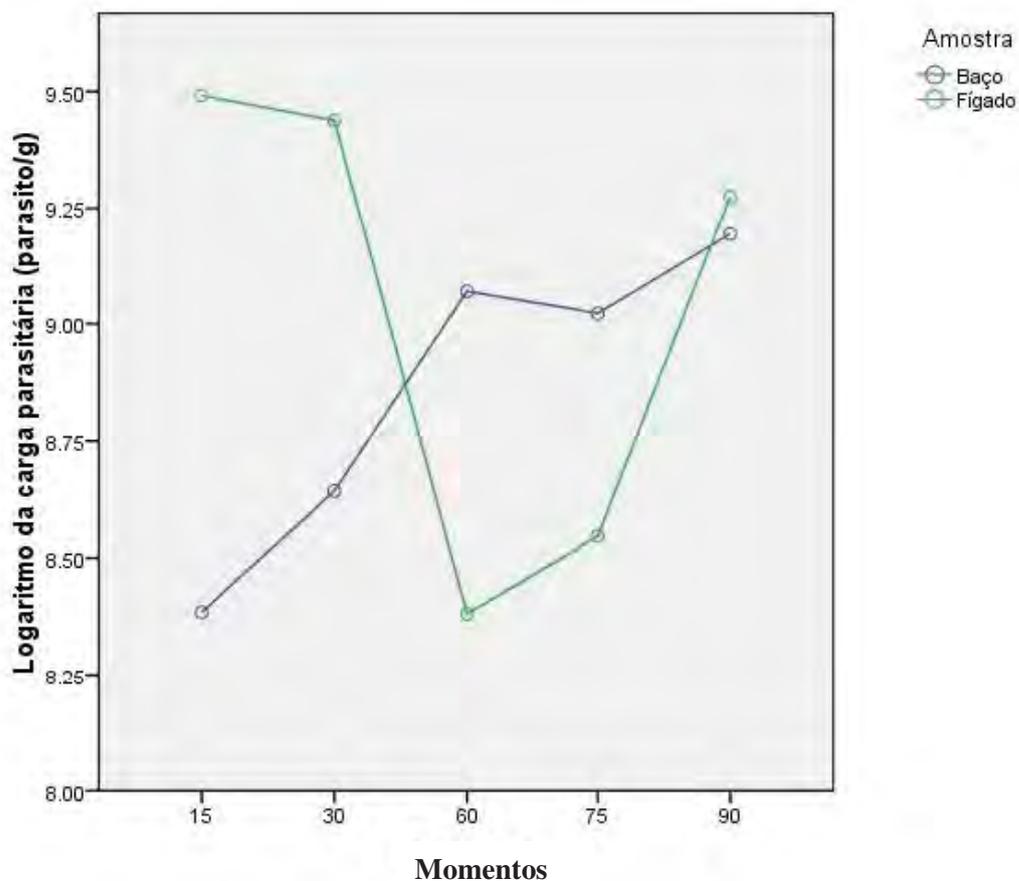
Amostra	Momento	Média	95% Intervalo de Confiança	
			Limite inferior	Limite superior
Baço	15	8.384 <sup>a</sup>	8.009	8.760

	30	8.644 <sup>A</sup>	8.268	9.019
	60	9.070 <sup>c</sup>	8.694	9.445
	75	9.023	8.647	9.398
	90	9.193	8.817	9.568
Fígado	15	9.491 <sup>b</sup>	9.115	9.866
	30	9.438 <sup>B</sup>	9.063	9.814
	60	8.381 <sup>d</sup>	8.005	8.756
	75	8.548	8.172	8.923
	90	9.274	8.899	9.650

a,b/A,B/c,d médias dentro do mesmo período, seguidos de letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de *General linear model* (GLM)

Na comparação das médias das cargas parasitárias do baço ou do fígado, independente do grupo, nos dias 15 e 30 pós-infecção e 75 e 90 dias pós-infecção, ou seja, foi realizada a comparação a partir de dois momentos em que os animais estavam apenas infectados (sem diferença entre os grupos III e IV) com dois momentos em que os animais além de infectados estavam imunossuprimidos. Para os dois órgãos (baço e fígado), foram encontradas diferenças significativas,  $t = 3,16$ ,  $P = 0,002$ ;  $t = -2,95$ ,  $P = 0,004$ , respectivamente. Pela Figura 3, essa diferença foi evidenciada no momento em que o baço passa a apresentar carga parasitária maior no momento final, ao contrário do fígado em que a carga parasitária decresce em relação ao momento inicial.

**Figura 3** - Valores de cargas parasitárias no baço e no fígado, independente do grupo, nos momentos estudados. Botucatu, 2011



### Efeito da interação entre grupo, amostra e momento

Apesar de não haver efeito significativo da interação entre as três variáveis, pode-se observar nos contrastes ortogonais que, quando comparados os órgãos (baço e fígado), no grupo III, houve diferença significativa para os momentos 15, 30 e 60 dias pós-infecção,  $t = 3,32, P = 0,001$ ;  $t = 3,15, P = 0,002$ ;  $t = -1,98, P = 0,05$ , respectivamente. Pode-se observar que nos dois primeiros momentos, o fígado é que está produzindo carga parasitária maior e 60 dias pós-infecção o baço passa a produzir carga parasitária maior. No grupo IV, observaram-se diferenças significativas entre os órgãos, 15 e 75 dias pós-infecção,  $t = 2,57, P = 0,01$ ;  $t = -2,19, P = 0,03$ , respectivamente (Tabela 7, Figura 4). No primeiro momento, que os animais estavam somente infectados, o fígado foi responsável por apresentar carga parasitária maior e no segundo período, em que os animais estavam infectados e imunossuprimidos, foi o baço.

**Tabela 7** - Médias das cargas parasitárias dos grupos III (infectado) e IV (infectado e imunossuprimido), do baço e do fígado e seus limites inferiores e superiores, nos momentos estudados. Botucatu, 2011

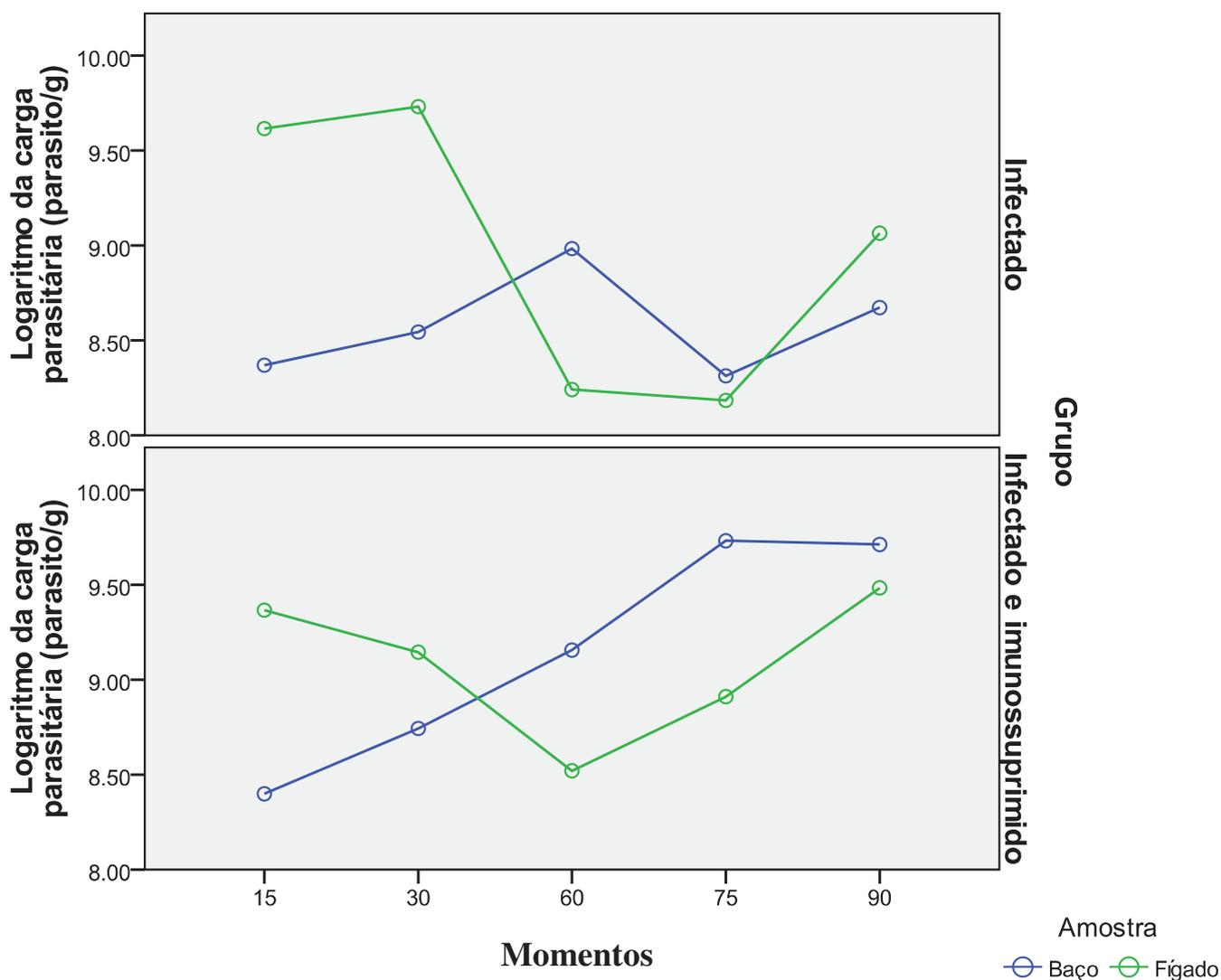
Grupo	Amostra	Momento	Média	95% Intervalo de Confiança	
				Limite inferior	Limite superior
3	Baço	15	8.370 <sup>a</sup>	7.839	8.901
		30	8.545 <sup>c</sup>	8.014	9.076
		60	8.984 <sup>e</sup>	8.453	9.515
		75	8.314 <sup>1</sup>	7.783	8.845
		90	8.673 <sup>3</sup>	8.142	9.205
	Fígado	15	9.616 <sup>b</sup>	9.085	10.147
		30	9.732 <sup>d</sup>	9.201	10.263
		60	8.242 <sup>f</sup>	7.711	8.773
		75	8.185 <sup>5</sup>	7.653	8.716
		90	9.065	8.534	9.596
4	Baço	15	8.399 <sup>h</sup>	7.868	8.930
		30	8.743	8.212	9.274
		60	9.156	8.625	9.687
		75	9.731 <sup>j,2</sup>	9.200	10.262
		90	9.712 <sup>4</sup>	9.181	10.243
	Fígado	15	9.366 <sup>i</sup>	8.835	9.897
		30	9.145	8.614	9.676
		60	8.520	7.989	9.051
		75	8.911 <sup>l,6</sup>	8.379	9.442
		90	9.483	8.952	10.015

<sup>a-l</sup> valores de médias dentro do mesmo grupo e período, seguidos de letras distintas indicam diferença significativa para o teste *General linear model* (GLM)

<sup>1-6</sup> valores de médias dentro da mesma amostra e período, seguidos de letras distintas indicam diferença significativa para o teste *General linear model* (GLM)

Quando se leva em consideração, o mesmo órgão (baço ou fígado), entre os grupos (III e IV), no mesmo momento, encontraram-se diferenças significativas, para o baço, 75 e 90 dias pós-infecção,  $t = 3,78$ ,  $P = 0,0004$ ;  $t = 2,77$ ,  $P = 0,007$ . No fígado, essa diferença ocorreu no momento de 75 dias pós-infecção,  $t = 1,93$ ,  $P = 0,05$ . Para ambos os órgãos, o grupo IV produziu maior carga parasitária (Figura 4).

**Figura 4** - Valores de cargas parasitárias no baço e no fígado, em cada grupo III (infectado) ou IV (infectado e imunossuprimido), nos momentos estudados. Botucatu, 2011



#### Efeito da interação entre grupo e amostra

Mesmo não havendo efeito da interação entre **grupo e amostra**, pode-se observar pelos contrastes ortogonais que, quando comparados o mesmo órgão (baço ou fígado), entre os grupos, houve diferença significativa para baço,  $t = 3,40$ ,  $P = 0,001$ , em que o baço do grupo IV apresentou carga parasitária maior em relação ao grupo III (Tabela 8, Figura 5).

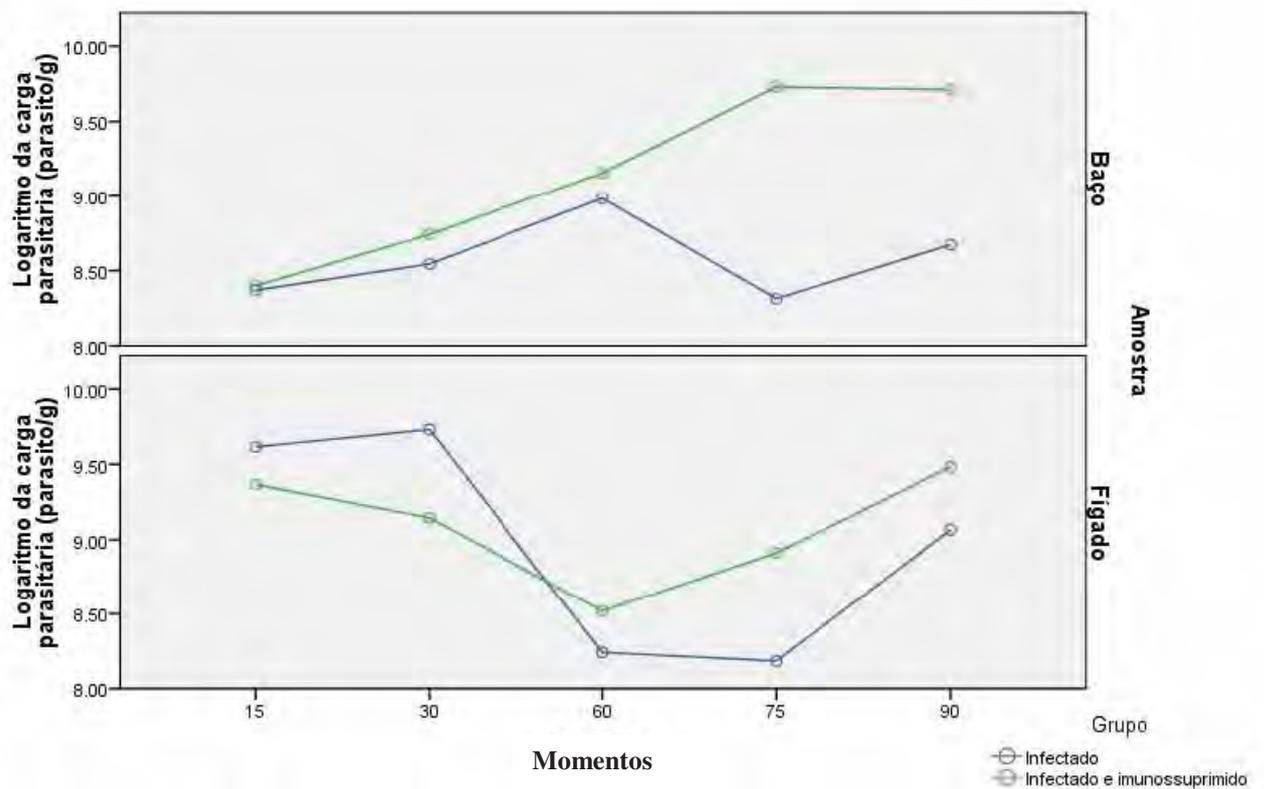
**Tabela 8** - Médias das cargas parasitárias dos grupos III (infectado) e IV (infectado e imunossuprimido), do baço e do fígado e seus limites inferiores e superiores. Botucatu, 2011

Grupo	Amostra	Média	95% Intervalo de Confiança
-------	---------	-------	----------------------------

			<b>Limite inferior</b>	<b>Limite superior</b>
3	Baço	8.577 <sup>a</sup>	8.340	8.815
	Fígado	8.968	8.730	9.205
4	Baço	9.148 <sup>b</sup>	8.911	9.386
	Fígado	9.085	8.847	9.322

<sup>a,b a-l</sup> valores de médias, da mesma amostra, seguidos de letras distintas indicam diferença significativa para o teste *General linear model* (GLM)

**Figura 5** - Valores de cargas parasitárias no baço e no fígado, nos dois grupos III e IV, nos momentos estudados. Botucatu, 2011



### 5.3. Correlação entre as subclasses de IgG e a carga parasitária dos órgãos

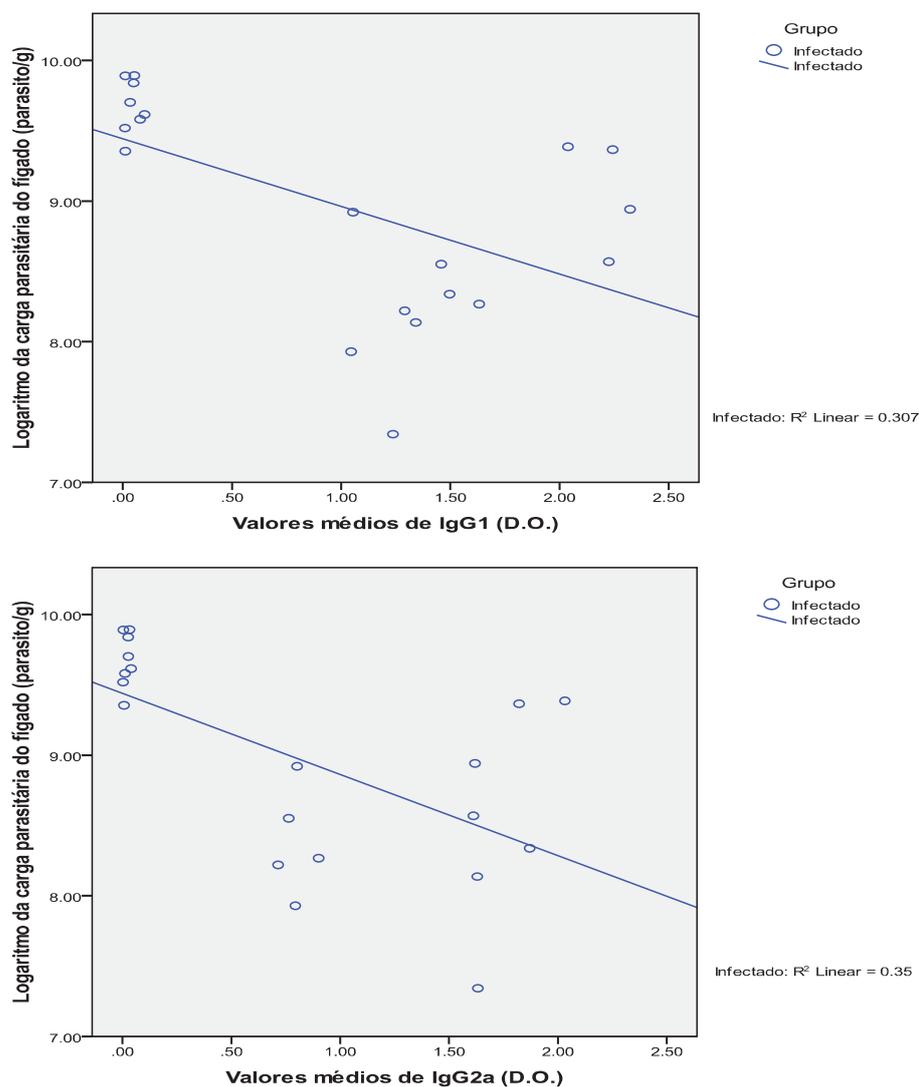
Aplicou-se o teste de correlação de Spearman buscando verificar a correlação entre IgG1, IgG2a, carga parasitária do baço e carga parasitária do fígado, nos grupos. No grupo III, pode-se observar que houve correlação positiva entre a produção de IgG1 e IgG2a ( $P < 0,0001$ ), ou seja quando uma aumenta a outra acompanha (Gráfico 1). Houve correlação negativa entre IgG1 e a carga parasitária do fígado ( $P < 0,0112$ ), em que o aumento de IgG1 é acompanhado da diminuição da carga parasitária do fígado. Da mesma forma, encontrou-se correlação entre IgG2a e a carga parasitária do fígado ( $P < 0,0061$ ), com a carga parasitária do fígado comportando-se da mesma maneira que com a IgG1 (Tabela 9, Figura 6).

**Tabela 9** – Correlação das médias das produções das subclasses IgG1, IgG2a, das cargas parasitárias do baço e do fígado dos grupos III (infectado). Botucatu, 2011

	IgG1	IgG2a	Log Baço	Log Fígado
IgG1	1	0,91541*	0,15375	-0,55438*
IgG2a	0,91541*	1	-0,01405	-0,59108*
Log Baço	0,15375	-0,01405	1	0,09210
Log Fígado	-0,55438*	-0,59108*	0,09210	1

\* valores de correlação marcados indicam coeficiente de correlação de Spearmann (5% de significância)

**Figura 6** – Correlação das médias das produções das subclasses IgG1 e IgG2a com a carga parasitária do fígado do grupo III (infectado). Botucatu, 2011



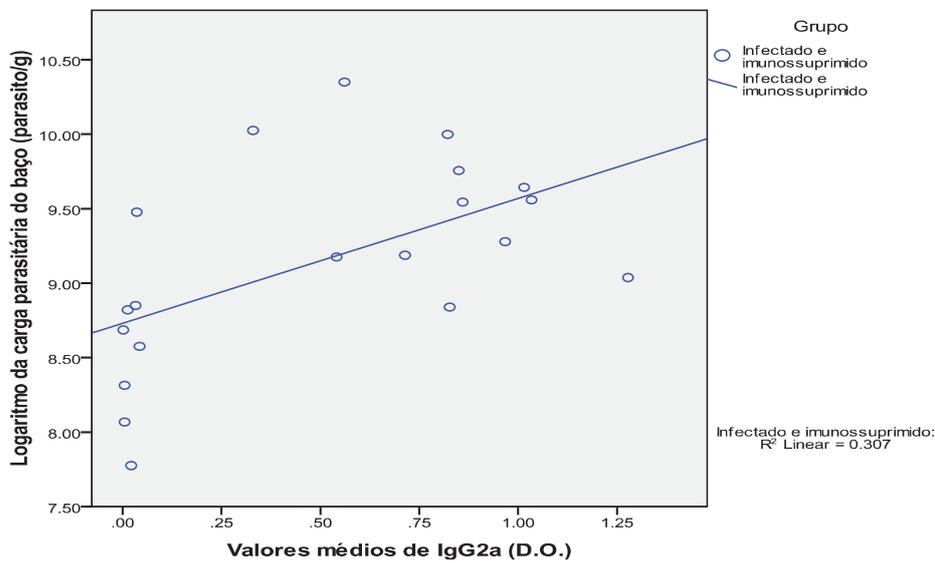
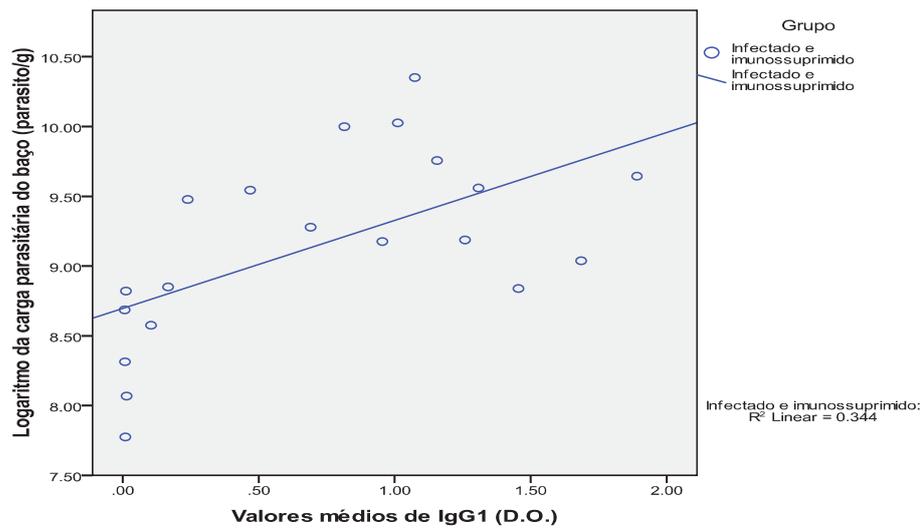
No grupo IV, houve correlação positiva entre IgG1 e IgG2a ( $P < 0,0001$ ), IgG1 e a carga parasitária do baço ( $P < 0,0066$ ) e IgG2a e a carga parasitária do baço ( $P < 0,0115$ ), sendo que quando uma aumenta a outra acompanha (Tabela 10, Figura 7).

**Tabela 10** – Correlação das médias das produções das subclasses IgG1, IgG2a, das cargas parasitárias do baço e do fígado dos grupos IV (infectado e imunossuprimido). Botucatu, 2011

	<b>IgG1</b>	<b>IgG2a</b>	<b>Log Baço</b>	<b>Log Fígado</b>
<b>IgG1</b>	1	0,86786*	0,5858*	-0,31095
<b>IgG2a</b>	0,86786*	1	0,55279*	-0,38162
<b>Log Baço</b>	0,58587*	0,55279*	1	0,29551
<b>Log Fígado</b>	-0,31095	-0,38162	0,29551	1

\* valores de correlação marcados indicam coeficiente de correlação de Spearmann (5% de significância)

**Figura 7** – Correlação das médias das produções das subclasses IgG1 e IgG2a com a carga parasitária do baço do grupo IV (infectado e imunossuprimido). Botucatu, 2011



### 5.3. EXAME HISTOPATOLÓGICO

As alterações observadas na análise microscópica de acordo com os momentos e diferentes grupos estão descritas a seguir:

Nos animais do grupo I (controle) evidenciou-se a estrutura do parênquima hepático preservada mostrando hepatócitos com núcleo central, citoplasma acidofílico, células de Kupffer, assim como, as estruturas vasculares e de excreção biliar. O tecido hepático do grupo II (imunossuprimidos), submetido à imunossupressão por 15 e 30 dias, manteve a mesma característica histológica das do grupo I.

Aos 15 dias pós-infecção, a análise histológica do fígado dos animais dos grupos III (infectados) e IV (infectados e imunossuprimidos), mostrou reação inflamatória hepática traduzida por infiltrado linfocitário multifocal e perivascular, principalmente da veia centro-lobular e trato portal. A disposição das células inflamatórias sob forma de agrupamentos mimetizou a formação inicial de granulomas. Formas amastigotas foram identificadas no citoplasma de macrófagos dos focos de inflamação, assim como nas células de Kupffer que se apresentaram hiperplásicas.

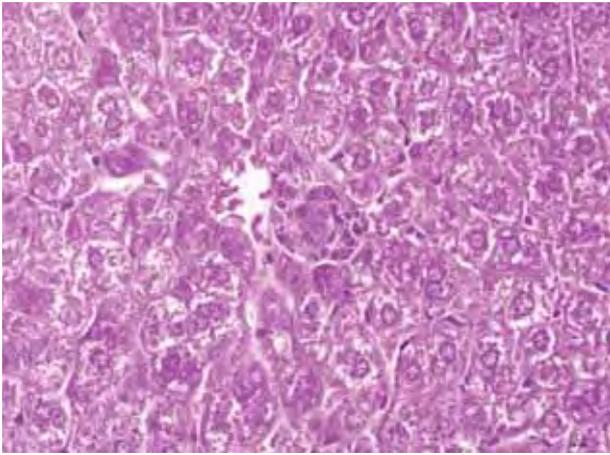
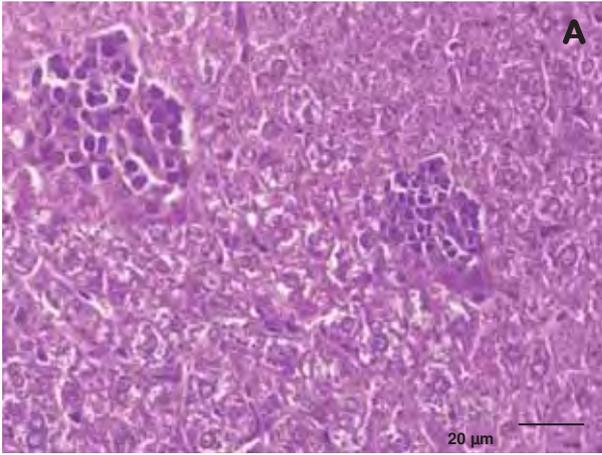
Após 30 dias de infecção em ambos os grupos (III e IV) a reação inflamatória de maior amplitude revelou em associação ao infiltrado linfocitário a presença de neutrófilos, ganhando conformação de granulomas incompletos, distribuídos difusamente no parênquima hepático. Tais granulomas mostravam grupos de macrófagos repletos de amastigotas em meio a neutrófilos, circundados por linfócitos e células epitelióides. Neste momento, a infiltração de linfócitos e macrófagos densamente parasitados estava presente ao redor dos leitos vasculares e espaços portal.

Com 60 dias, nos grupos III e IV, os focos inflamatórios com características marcantes de granulomas mostravam maior organização e extensão comprometendo amplamente o parênquima hepático. O granuloma exibe morfologia de granulomas completos e incompletos, sempre evidenciando formas amastigotas de *Leishmania*. Células morfológicamente semelhantes a células gigantes também foram observadas. A presença de células mononucleares com características de plasmócitos foi evidenciada na composição dos granulomas, em adição à proliferação fibroblástica.

Aos 75 dias pós-infecção, o grupo III evidenciou as mesmas características dos grupos III e IV no dia 60, diferenciando apenas pelo maior comprometimento do parênquima hepático, provavelmente pela coalescência dos granulomas como também de granulomas neoformados.

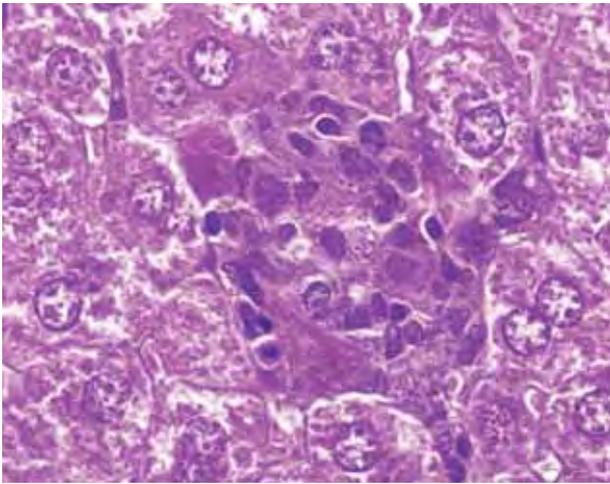
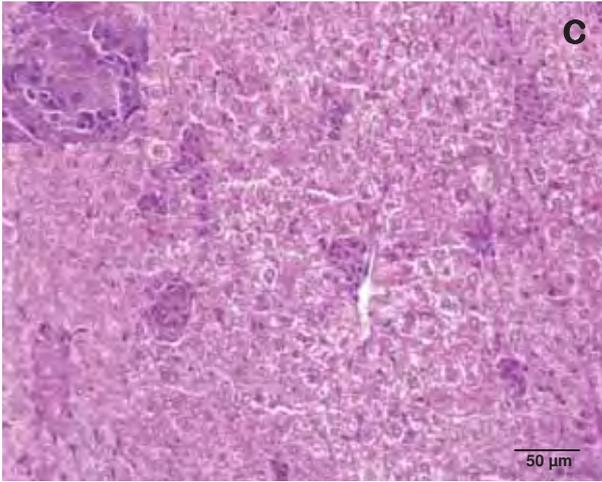
No grupo IV aos 75 dias, notou-se vacuolização difusa de hepatócitos, reação inflamatória mínima focal traduzida pela presença de agrupamentos de linfócitos e macrófagos parasitados, muitas vezes associados à polimorfonucleares. A presença de amastigotas foi predominante nas células de Kupffer. Reação inflamatória semelhante também esteve presente ao redor de vasos e espaço porta e nesse mesmo grupo aos 90 dias, as alterações histopatológicas foram discretas quando comparadas aos 75 dias, persistindo a reação inflamatória multifocal de intensidade discreta, no entanto uma reação fibroblástica mais evidente pode ser detectada perivascular, portal e capsular em associação ao parasitismo intenso, particularmente portal.

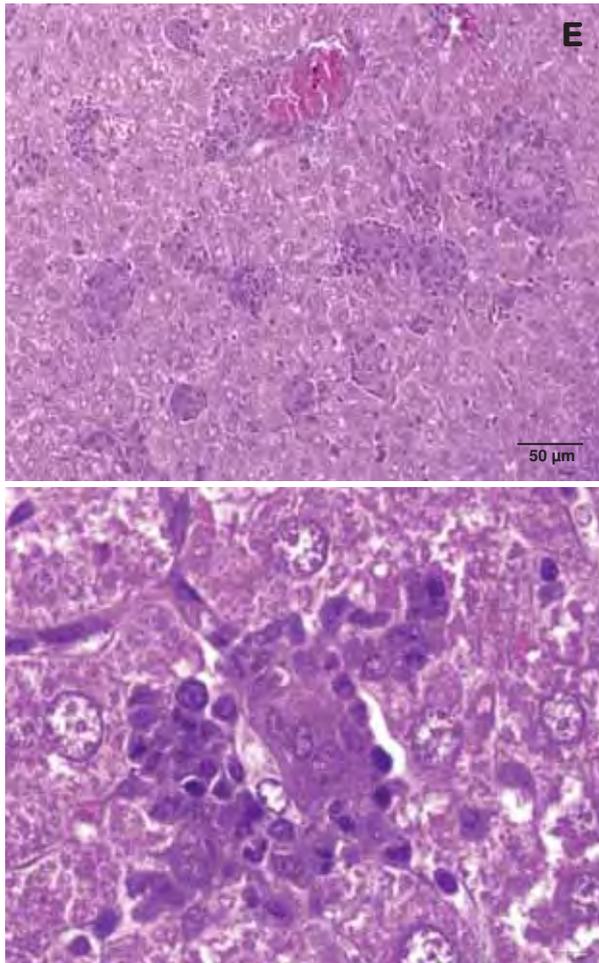
Com 90 dias o grupo III mostrou comprometimento disseminado do parênquima hepático por granulomas organizados em sua maioria, porém outros com morfologia inicial de formação traduzida por agrupamentos de neutrófilos circundados por macrófagos, linfócitos e plasmócitos, além de células epitelióides. A presença de amastigotas foi uma constante nos focos disseminados de inflamação granulomatosa. A proliferação fibroblástica mais acentuada foi observada na composição dos granulomas perivascular, se difundindo pelo parênquima e cápsula hepática de aspecto fibrótico.



**B**

20 μm

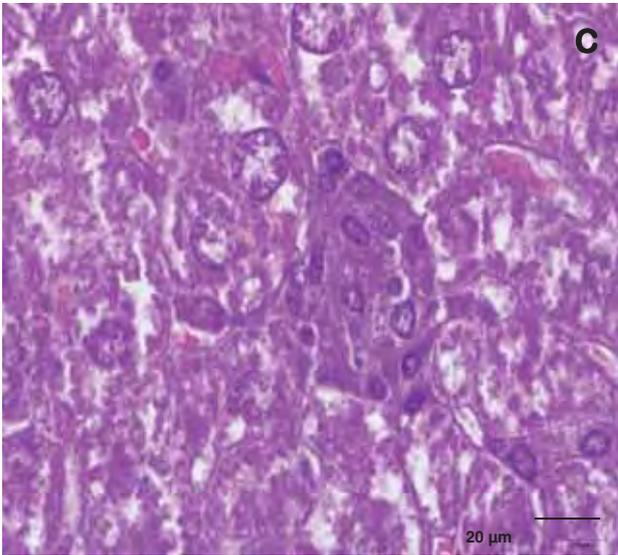
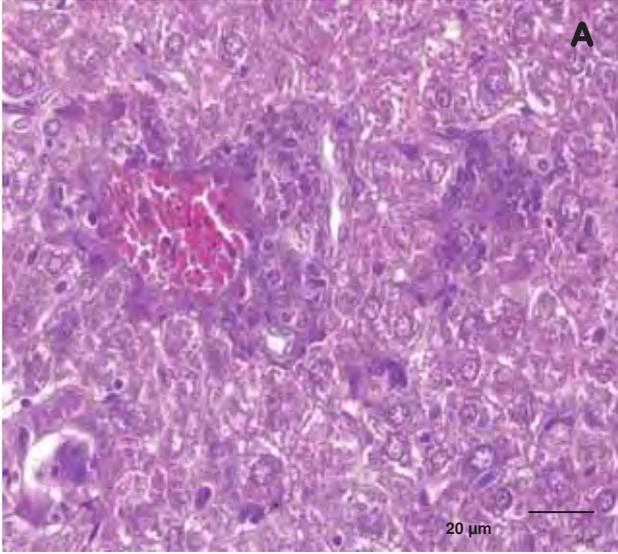




F

10 µm

**Figura 8.** Análise histopatológica de cortes de fígado de camundongos BALB/c, corados por HE. (A-B) 15 dias pós-infecção. (A) Reação granulomatosa, no detalhe presença de amastigotas intracelulares. (B) reação granulomatosa perivascular. (C-D) 30 dias pós-infecção. (C) granulomas disseminados, no detalhe amastigotas intracelulares. (D) granulomas com amastigotas intracelulares. (E-F) 60 dias pós-infecção. (E) granulomas multifocais. (F) células morfológicamente semelhante à célula gigante com amastigotas intracelulares. Botucatu, 2011

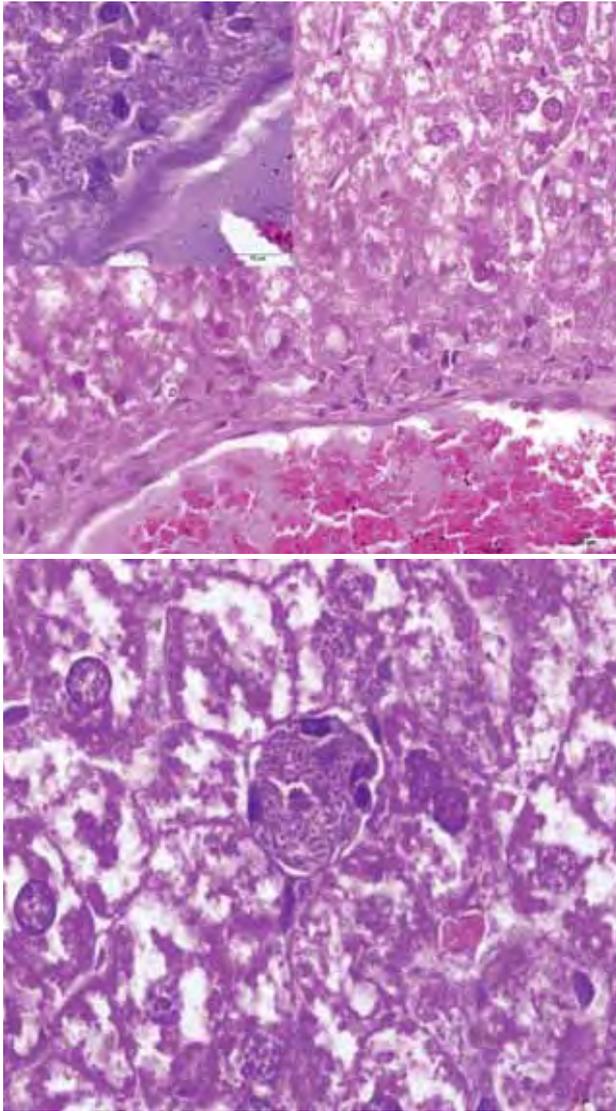


**B**

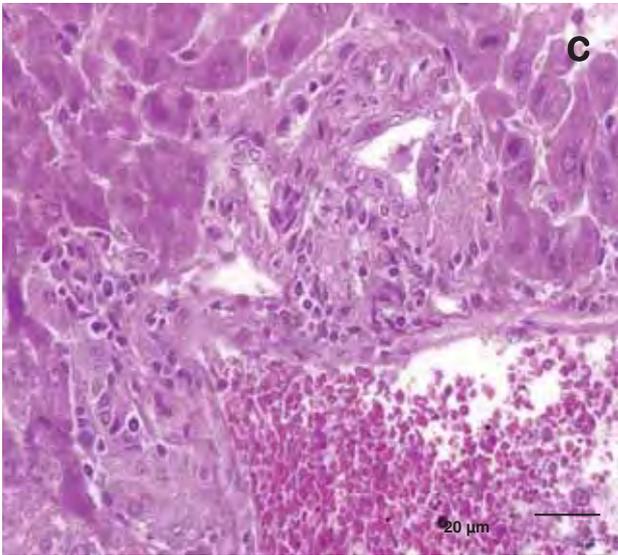
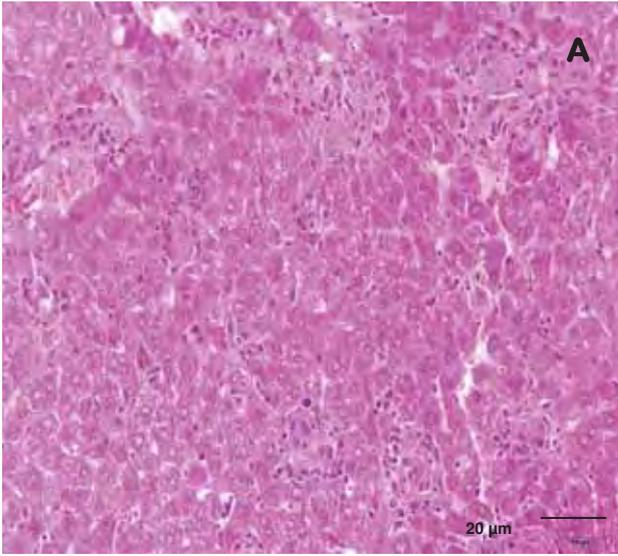
10 μm

**D**

10 μm



**Figura 9.** Análise histopatológica de cortes de fígado de camundongos BALB/c, 75 dias pós-infecção, corados por HE. (A-B) **Grupo III** (infectados), (A) Granuloma perivascular (B) granuloma com amastigotas intracelulares. (C-D) **Grupo IV** (infectados e imunossuprimidos). (C) Reação inflamatória mínima perivascular, no detalhe formas amastigotas. (D) granulomas com amastigotas intracelulares. Botucatu, 2011

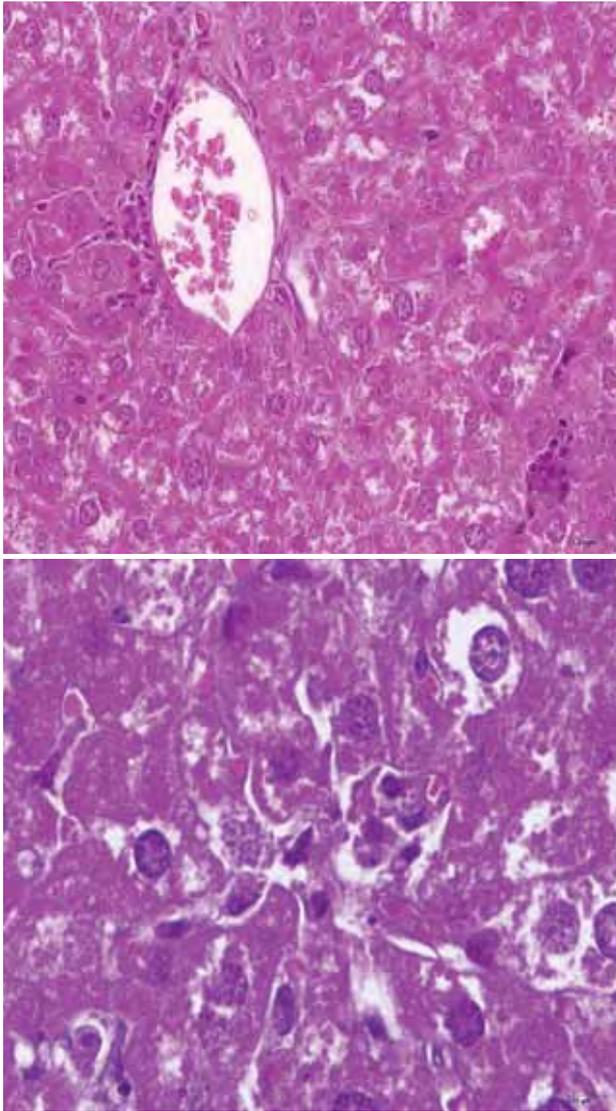


**B**

10 μm

**D**

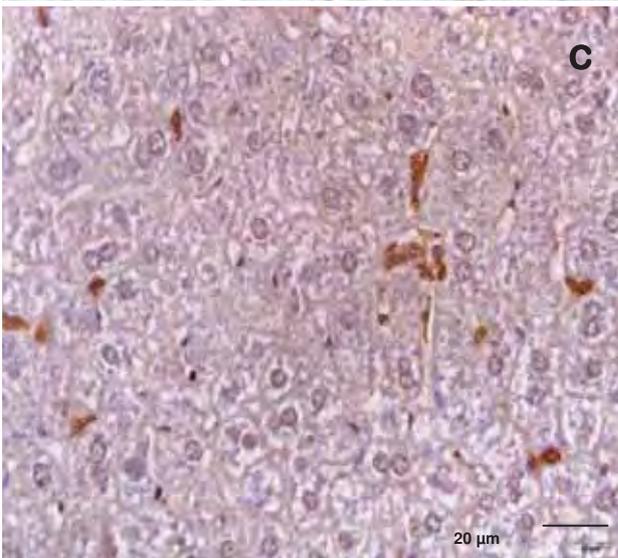
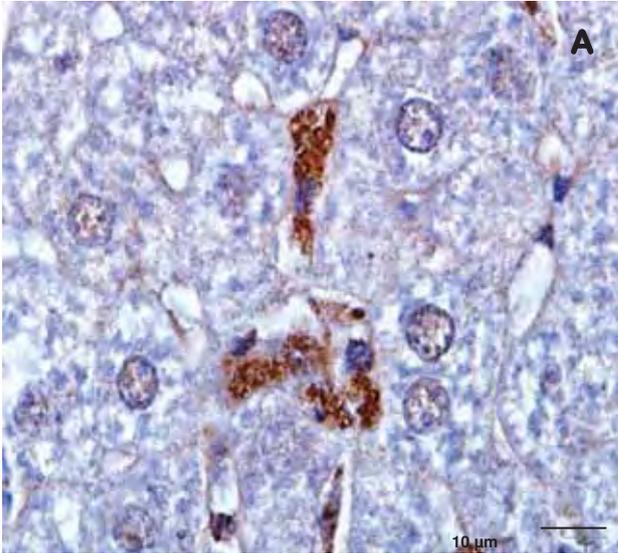
10 μm



**Figura 10.** Análise histopatológica de cortes de fígado de camundongos BALB/c, 90 dias pós-infecção, corados por HE. (A-B) **Grupo III** (infectados), (A) Granuloma multifocais. (B) granuloma perivascular com amastigotas intracelulares. (C-D) **Grupo IV** (infectados e imunossuprimidos). (C) Reação inflamatória mínima perivascular. (D) reação inflamatória mínima com amastigotas intracelulares. Botucatu, 2011

## **5.5. REAÇÃO DE IMUNOISTOQUÍMICA**

A observação em microscopia de luz dos cortes de tecido submetidos à reação de imunistoquímica mostrou marcação positiva para as formas amastigotas de *L. (L.) chagasi* em todos os grupos e momentos analisados.

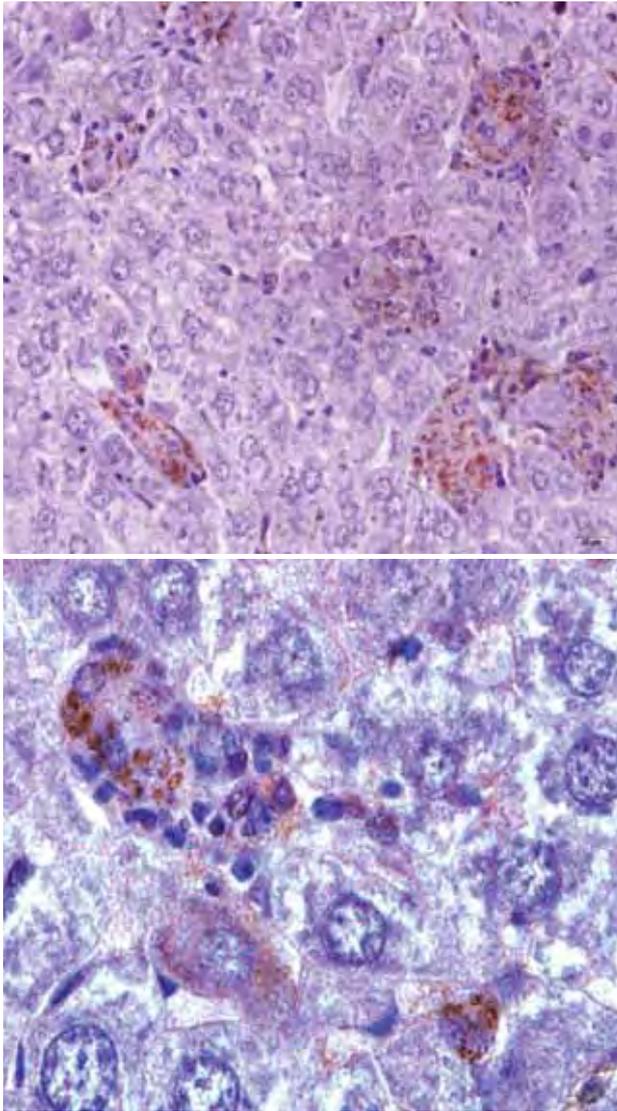


**B**

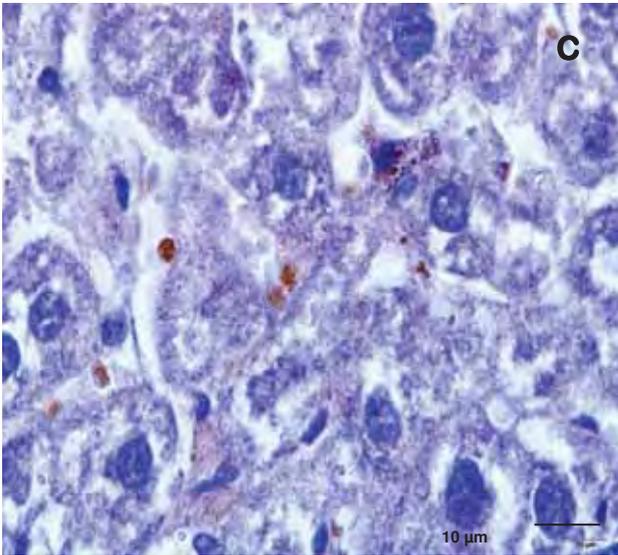
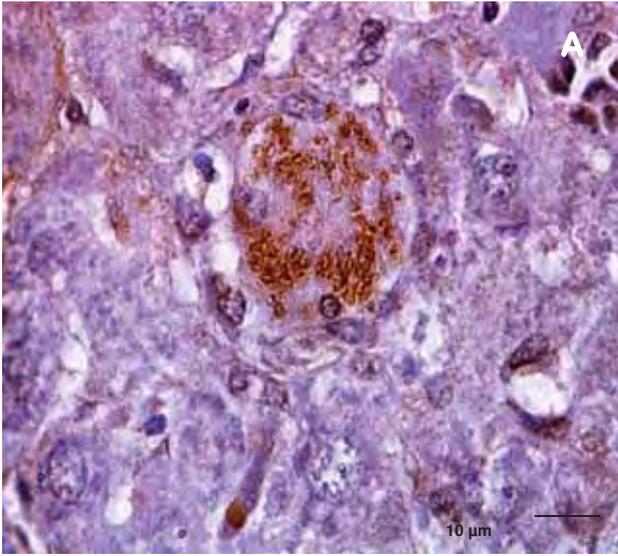
50 µm

**D**

10 µm



**Figura 11.** Cortes de fígado de camundongos BALB/c, submetidos à reação de imunohistoquímica. Detecção de formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* imunomarcadas no citoplasma de macrófagos e células de Kupffer. (A-B) 15 dias pós-infecção, (C) 30 dias pós-infecção e (D) 60 dias pós-infecção. Botucatu, 2011

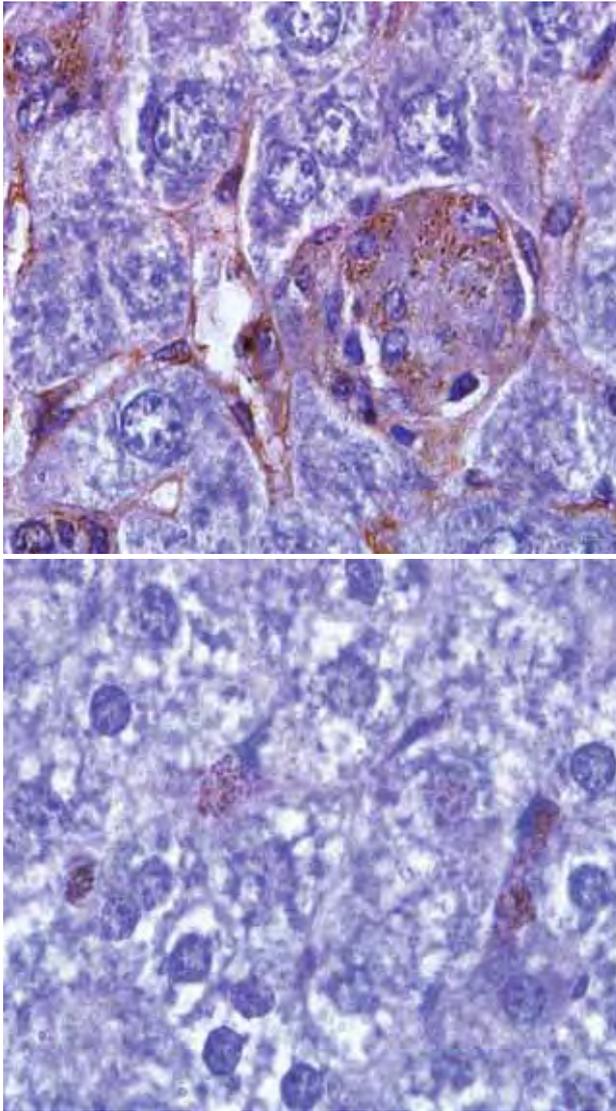


**B**

20 μm

**D**

20 μm



**Figura 12.** Cortes de fígado de camundongos BALB/c, submetidos à reação de imunohistoquímica. Detecção de formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* imunomarcadas no citoplasma de macrófagos e células de Kupffer. (A-B) Grupos III e IV (respectivamente), 75 dias pós-infecção, (C-D) Grupos III e IV, 90 dias pós-infecção. Botucatu, 2011

## VI. DISCUSSÃO

### 6.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Há 12 anos a LVC foi diagnosticada no oeste do Estado de São Paulo e, a partir deste momento, ela vem tomando proporções assustadoras, tornando-se um grande problema de saúde pública no Estado, com o aumento contínuo e descontrolado de casos humanos e caninos, principalmente pela sua urbanização. Sabe-se da dificuldade em controlar a infecção no cão, por falta de tratamento adequado, mas acredita-se que a prevenção ainda é a melhor arma. A falta de consciência por parte do governo e da população faz com que o elemento mais importante da cadeia epidemiológica da leishmaniose, ou seja, o vetor consiga manter-se sempre viável no ambiente, pela presença de grande quantidade de matéria orgânica em terrenos baldios, excesso de lixo e principalmente pela ausência de um programa de combate químico eficiente.

Hoje, tem-se também o problema da coinfeção da LVH e HIV/aids, e a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que das 30 milhões de pessoas infectadas pelo vírus da HIV/aids no mundo, um terço vive em zonas endêmicas para leishmaniose<sup>17</sup>. A associação entre as duas infecções diminui a expectativa de vida dos indivíduos, pois o HIV/aids permite a visceralização mais rápida da infecção e a LVH diminui o tempo de latência do vírus<sup>113</sup>.

Muitos estudos a respeito das características da LV tais como, resposta imune, comportamento e biologia do parasito e hospedeiro, a busca de modelos experimentais, comportamento da infecção e dos sinais clínicos, entre outros, vem sendo desenvolvidos, para que se esclareça e se consiga controlar a infecção em âmbito mundial. É importante salientar que a LV é considerada pela iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi) como uma doença “extremamente negligenciada”, assim como a doenças do sono e a doença de Chagas, devido à prevalência em regiões de grande pobreza, nas quais não há o interesse por parte das indústrias farmacêuticas em desenvolver novos medicamentos eficazes ou adequados<sup>114</sup>.

Nesse trabalho foram estudados 96 camundongos BALB/c, divididos em quatro grupos, sendo dois grupos controle (um sem tratamento e outro imunossuprimido), um infectado experimentalmente por *L. (L.) chagasi* e outro infectado experimentalmente por *L. (L.) chagasi* e imunossuprimido pela DXM e PTX. Assim, além da avaliação do curso da LV em modelos murinos em vários momentos pós-infecção, adicionou-se o fator de imunossupressão, com o uso de fármacos que possuem efeitos inibitórios sobre a resposta inflamatória e também na resposta imune específica, em que o sinergismo desses altera o curso da infecção tanto na toxoplasmose, quanto na leishmaniose<sup>37,115</sup>, e também acabam simulando uma situação que talvez ocorra na coinfeção HIV/aids e LVH.

Nesse estudo os objetivos foram avaliar a imunidade humoral, o comportamento da multiplicação do parasito no hospedeiro e a imunidade órgão-específica do fígado na LV. A principal razão para a realização desse foi a escassez de trabalhos que envolvem estes parâmetros, e a comparação entre grupos infectados e imunossuprimidos, além da contribuição para o entendimento da enfermidade.

## **6.2. RESPOSTA HUMORAL**

Testes sorológicos têm sido empregados, com considerável importância, no diagnóstico e em inquéritos epidemiológicos dessa enfermidade. A análise de anticorpos anti-leishmania permite avaliar o curso evolutivo da infecção, bem como fornecer dados sobre as características de sua resposta imune. Variados perfis e níveis de imunoglobulinas específicas contra *Leishmania* têm sido detectadas em pacientes com leishmaniose tegumentar, parecendo refletir não só na carga parasitária, mas também a espécie envolvida, o tempo de infecção e fatores intrínsecos do próprio hospedeiro<sup>116</sup>.

Neste estudo, a detecção das subclasses de IgG (IgG1 e IgG2a) sérica, pelo ELISA, foi realizada apenas nos grupos III e IV, em todos os momentos estudados, pois os grupos I e II eram controles da infecção e imunossupressão, respectivamente. A produção das duas subclasses de IgG foi detectada em todos os períodos. De modo geral, pode-se observar que a produção de IgG1 e IgG2a não foi semelhante, houve variação ao longo dos períodos, dado que foi encontrada diferença significativa entre a produção destas, sendo que IgG1 apresentou-se mais elevada em relação a IgG2a. Essa observação também foi realizada nos grupos distintos (III e IV) e da mesma forma a subclasse mais produzida foi a IgG1.

Apesar de haver produção maior de IgG1 em cada grupo (III e IV), os momentos não influenciaram na diferença entre IgG1 e IgG2a. Pela produção maior de IgG1 pode-se afirmar que essa subclasse está associada à progressão da infecção em camundongos BALB/c infectados por *L.(L.) chagasi*, relacionando-se assim, ao tipo de resposta Th2. É importante lembrar, que o tipo de resposta mais eficiente contra a LV, é a resposta imune celular (Th1) e a produção de citocinas desse perfil. Os dados desse estudo somam e fortalecem o grupo de estudiosos que consideram que em camundongos, cães e humanos infectados, a progressão da enfermidade e aparecimento de sinais clínicos está associada à resposta Th2, com produção de IgG1 e citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e a resistência e ausência de sinais clínicos associada à resposta Th1, com a produção de IgG2a e a citocina INF- $\gamma$ <sup>69,70,71,117</sup>.

Apenas aos 90 dias pós-infecção, lembrando que nesse momento o grupo IV estava infectado e imunossuprimido, foram encontradas diferenças significativas para IgG1 e IgG2a, quando comparadas entre os grupos e considerando-se os momentos, sendo que o grupo III produziu concentrações médias maiores das duas subclasses de IgG e também pelo fato de que ao longo do experimento, de modo geral, este grupo apresentou aumento de IgG1 e IgG2a e o grupo IV diminuição de ambas. Portanto, pode-se afirmar que o grupo III conseguiu produzir resposta do tipo humoral e celular de modo a impedir a infecção e no grupo IV a

imunossupressão tende a modificar a resposta imune do hospedeiro frente ao parasito, e a produção diminuída desses anticorpos pode ser explicada pela supressão da maturação, diferenciação e proliferação de células B. Desta forma a imunossupressão influencia na produção de IgG1 e IgG2a, concordando com Elenkov<sup>35</sup> que demonstrou que o sinergismo entre a DXM e a PTX estimula mudanças na resposta imune do perfil Th1 para Th2.

A comparação entre os momentos iniciais, 15 e 30 dias com 75 e 90 dias pós-infecção, mostrou diferença significativa entre o grupo III e IV, pois ambos estavam infectados, mas o grupo IV além de infectado, também imunossuprimido, e observou-se que nos momentos finais (75 e 90 dias pós-infecção) houve produção mais elevada de IgG1 e IgG2a, em ambos os grupos, assim acredita-se que a imunossupressão não influenciou nessa relação e talvez que o fator mais importante, nesse caso, seja a cronificação da infecção e a tentativa do hospedeiro em produzir uma resposta imune eficiente.

Considerando-se a detecção e a correlação positiva de IgG1 e IgG2a nesse estudo, nos grupos III e IV e a relação de cada uma delas aos tipos de resposta Th2 e Th1, respectivamente, pode-se afirmar que os dois tipos de resposta, humoral e celular, estão sendo produzidas em camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) chagasi*. Portanto, há um balanço entre as respostas Th1 e Th2, na LV murina, mas seu papel ainda não está bem esclarecido<sup>116</sup>. Entretanto, pode-se dizer que é ineficiente diante da infecção. Mesmo assim, é claro o predomínio da resposta Th2 nesse estudo, que promove fraca proteção contra o parasito e acarreta danos no hospedeiro, podendo ser fatal.

### **6.3. CARGA PARASITÁRIA**

A detecção de parasitos no baço e no fígado, pela técnica de microtitulação em cultura, foi realizada apenas nos grupos III e IV, em todos os momentos, pois os grupos I e II não foram infectados. O parasito foi detectado nos dois órgãos, em todos os momentos, e em quantidade elevada.

Assim, acredita-se na precocidade da visceralização da infecção e também na capacidade do parasito em escapar dos mecanismos de defesa imune, para se estabelecer e manter-se no hospedeiro, além de confirmar a suscetibilidade de camundongos BALB/c a infecção por *L.(L.) chagasi*. Os resultados obtidos concordam com Rolão et al.<sup>47</sup> que detectaram a carga parasitária nos mesmos órgãos e na mesma espécie, com um dia de infecção.

De modo geral, o grupo IV foi quem apresentou carga parasitária maior, independente do órgão, ficando claro entender que a imunossupressão influenciou na proliferação dos parasitos, sugerindo que o hospedeiro produziu uma resposta imune ineficiente frente à infecção, devido, possivelmente, a ação anti-inflamatória e imunomoduladora da DXM e da PTX. Quando considerado o momento, independente do órgão, aos 75 e 90 dias pós-infecção, foram detectadas diferenças significativas entre as cargas parasitárias dos grupos III e IV, em que o IV produziu quantidade maior.

Se distinguirmos a quantificação da carga parasitária entre os dois grupos, pode-se notar que o grupo III, apresentou carga parasitária maior, independente do órgão, no momento inicial da infecção e manteve-se estável até o final, tendendo a diminuir, sugerindo que o hospedeiro estivesse tentando controlar a multiplicação do parasito. Por outro lado, o grupo IV apresentou carga parasitária maior no momento final, mais uma vez, pode-se considerar que a imunossupressão influenciou na carga parasitária dos órgãos, por razões já expostas anteriormente, evidenciando a cronicidade da infecção em modelos murinos.

Segundo o órgão, houve diferenças significativas entre as cargas parasitárias produzidas no baço e no fígado, sendo que 15 e 30 dias pós-infecção o fígado apresentou maior parasitismo e aos 60 dias pós-infecção houve uma inversão, pois o baço apresentou maior parasitismo. O parasitismo foi mais intenso nos momentos iniciais para o fígado e nos momentos finais para o baço e quando relacionado o grupo, o IV foi quem apresentou maior

parasitismo no baço em relação ao grupo III. A partir desses resultados acredita-se que, como já citado anteriormente, que a visceralização da infecção é rápida bem como a multiplicação do parasito e ocorre inicialmente no fígado, dentro dos primeiros 30 dias pós-infecção, semelhante ao observado por Wilson et al.<sup>45</sup>, que observaram que a multiplicação de amastigotas no fígado ocorreu nas primeiras quatro semanas pós-infecção, resolvendo-se espontaneamente após a oitava semana.

Por outro lado, nesse estudo, 60 dias pós-infecção, o baço passou a apresentar maior carga parasitária em comparação ao fígado, sugerindo que o fígado esteja montando uma resposta imune eficiente frente ao parasito. Sabe-se que a infecção do fígado é auto-limitante com formação de granulomas e que no baço o crescimento do parasito é lento e persistente<sup>45</sup>, além desse órgão ser conhecido por ser mais suscetível à infecção por *Leishmaniaspp.*<sup>47</sup>. Segundo Wilson et al.<sup>119</sup>, o fígado aparentemente serve como local de replicação inicial do parasito e o baço como local de persistência. Acredita-se que o momento de 90 dias no presente estudo, talvez não tenha sido suficiente para se afirmar que o fígado consegue resolver a infecção, ao contrário do baço, pois foram detectados parasitos em todos os momentos. Confirma-se que a resposta imune frente à infecção por *L. (L.) chagasi* em camundongos BALB/c é órgão-específica, pela distinção entre os resultados obtidos.

Além de evidenciar que a imunossupressão influencia a multiplicação do parasito, seja favorecendo, pela menor resposta inflamatória no órgão-alvo ou prejudicando, pela ação de alguns mecanismos de defesa do hospedeiro, como a ativação de macrófagos e a produção de citocinas e substâncias tóxicas ao parasito, necessárias para a eliminação do mesmo. Ao contrário do que demonstrou Gangneux et al.<sup>37</sup>, que encontraram o aumento da carga parasitária nos dois órgãos em camundongos tratados com DXM e PTX.

No grupo III foi observada correlação negativa entre IgG1 ou IgG2a e a carga parasitária do fígado, pois a elevação de IgG1 ou IgG2a implica em diminuição do

parasitismo do fígado, talvez pela eficiente resposta imune do hospedeiro, com formação de granulomas, para conter a proliferação do parasito no fígado, lembrando também que a infecção no fígado é auto-limitante, não indicando, entretanto, que não haja mais parasitismo, pois se pode evidenciar no exame histopatológico a presença destes. Por outro lado, no grupo IV foi observada correlação entre IgG1 ou IgG2a e a carga parasitária do baço, com aumento das imunoglobulinas e o parasitismo do baço, indicando persistência e ineficiência da resposta imune do hospedeiro.

A carga parasitária elevada, em ambos os órgãos, associada à produção mais elevada de IgG1, sugere a relação entre o parasitismo e a resposta imune Th2, sabidamente conhecida por não resolver a infecção por *Leishmania* spp. Esses resultados estão de acordo com Miles et al.<sup>46</sup>, que afirmaram que a indução inapropriada de Th2 leva ao desenvolvimento de lesões maiores e parasitismo intenso.

Além disso, cabe comentar sobre a escolha da técnica de quantificação da carga parasitária no presente estudo. É um método mais sensível, quando comparado à enumeração direta de amastigotas em impressões de tecidos corados<sup>111</sup>, embora de difícil realização, porque deve ser feita imediatamente após a coleta do órgão-alvo e de maneira mais asséptica possível para que não haja contaminação do cultivo. A contaminação é outro grande problema, principalmente considerando-se o longo período de cultivo. Tais observações são confirmadas pelo grande disparidade entre os valores encontrados na análise das amostras do baço e do fígado desse estudo.

#### **6.4. EXAME HISTOPATOLÓGICO DO FÍGADO**

O exame das alterações histopatológicas foi realizado em cortes histológicos de fígado corados por HE. Todos os grupos I, II, III e IV foram analisados, em todos os momentos estudados, pois apesar de os grupos I e II não serem infectados, foram utilizados como controle das estruturas normais do órgão, em relação aos grupos III e IV. Considerando que a

descrição dos resultados já foi apresentada, serão utilizados somente os dados mais relevantes para o entendimento da resposta imune frente à infecção.

Foi observada reação inflamatória nos grupos III e IV, em todos os momentos do estudo, mas no grupo III foi intensa e progressiva até o último momento e no grupo IV, foi considerada fraca no 75º dia pós-infecção e rara no 90º dia pós-infecção, mas não ausente, fato que poderia talvez ser detectado, caso os animais fossem avaliados por um período mais longo.

No grupo de camundongos infectados, a reação inflamatória aumentou e apresentou diferentes características, com a cronificação da infecção, com início de um infiltrado inflamatório até a formação de granulomas completos. Pode-se notar que o processo inflamatório foi constante, renovando-se constantemente, representado por desde infiltrado inflamatório mononuclear até granulomas completos, concordando com Gutierrez et al.<sup>99</sup> em estudo da dinâmica de formação de granulomas hepáticos. A hiperplasia das células de Kupffer, com o aumento observado a cada momento, é característica de doenças sistêmicas, mostrando que estas estão reativas, conforme descrito por Mathias et al.<sup>63</sup>, além da hipertrofia. O aumento no tamanho do núcleo, detectado 60 até 90 dias pós-infecção, indica a ocorrência de regeneração das células do fígado, característica conhecida desse órgão.

A presença de células epitelióides, 30 dias pós-infecção até o final, demonstra que os macrófagos estão perdendo a sua função fagocítica e, nos momentos finais há morte desses e de hepatócitos. A presença de necrose e fibrose no fígado pode ser explicada pela ação da citocina TNF- $\alpha$ , encontrada no granuloma hepático<sup>82</sup>, que acarreta necrose e fibrose no mesmo<sup>96</sup> pela liberação de citocinas fibrogênicas<sup>97</sup>. Caso o baço tivesse sido analisado, seriam esperados danos na arquitetura e uma inflamação crônica, pela persistência do parasitismo e também pela ação do TNF- $\alpha$ , segundo demonstrado por Engwerda et al.<sup>98</sup>.

A presença do parasito, em quantidades elevadas, também foi uma constante nos grupos III e IV, sendo detectada em macrófagos e células de Kupffer. Em casos mais extremos, como no grupo IV, 90 dias pós-infecção, observou-se o parasito dentro de grandes vasos sanguíneos, talvez explicando o estímulo e as características da reação imune intensa no órgão. A característica de resolução da infecção no fígado não pode ser observada, talvez pelo curto período do estudo.

Por outro lado, no grupo imunossuprimido, pode-se considerar que as alterações encontradas eram esperadas. O citoplasma vacuolizado é característica do uso de glicocorticóides e ocorre pelo acúmulo de líquido e foi encontrada também em camundongos do grupo II. A reação inflamatória fraca ou rara, com raros granulomas completos, é devida a ação anti-inflamatória da DXM e PTX.

## VII. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos da avaliação da resposta imune expressa por anticorpos, à multiplicação do parasito no hospedeiro e formação da resposta imune específica no fígado, em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) chagasi* e imunossuprimidos, por diferentes técnicas, permitiu-nos concluir que:

- Há produção de imunoglobulinas na LV murina, e a imunossupressão influenciou a sua produção, a multiplicação do parasito e a resposta imune do fígado.
- A subclasse de IgG1 está relacionada à resposta Th2 e a subclasse IgG2a está à resposta Th1.

- Há um balanço entre Th1 e Th2 na LV murina, com predomínio da resposta Th2 na LV murina.
- O fígado é o primeiro local de replicação do parasito na LV murina e ele controla a infecção na LV murina.

## VIII. REFERÊNCIAS <sup>□</sup>

1. Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Neto J. Canine Leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2004, 57: 88p.
2. Organização Mundial de Saúde. *Control of Leishmaniasis.* Geneva: WHO; 1990.
3. Desjeux P. Leishmaniasis: Public health aspects and control. *Clin Dermatol.* 1996, 14 (5): 417-423.
4. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet.* 1999, 354: 1191-9.
5. Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenbergh J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun.* 1994, 62 (1): 229-235.
6. SINAN. Ministério da Saúde – MS. Brasília, 2004. Disponível em <[dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php](http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php)>.
7. Organização Mundial de Saúde. *Communicable Disease Profile.* Iraq: WHO, 2003.
8. Alencar JE, Neves J, Dietze R. Leishmaniose visceral (Calazar). In: Veronezi R. *Doenças Infecciosas e Parasitárias.* 8<sup>a</sup>. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991. p. 706-717.
9. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (LV).* Brasília: Ministério da Saúde; 2003.
10. Costa CH, Vieira JB. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001, 34 (2): 223-8.
11. Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitol.* 2002, 18 (9): 399-405.
12. Paranhos-Silva M, Freitas LAR, Santos WC, Grimaldi G, Jr, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveira-dos-Santos AJ. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg.* 1996, 55 (1): 39-44.

---

\* Referências de acordo com as normas de Vancouver, 2010. Elaboradas pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas – ICMJE (<http://www.icmje.org>), adaptado pela U.S. National Library of Medicine (NLM) ([http://www.ncbi.nlm.gov/bsd/uniform\\_requirement.html](http://www.ncbi.nlm.gov/bsd/uniform_requirement.html)).

13. Abranches P, Silva-Pereira MC, Conceição-Silva FM, Santos-Gomes GM, Janz JG. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol.* 1991, 77 (4): 557-561.
14. Courtenay O, Santana EW, Johnson PJ, Vasconcelos IA, Vasconcelos AW. Visceral leishmaniasis in the hoary zorro *Dusecyon vetulus*: a case of mistaken identity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996, 90(5): 498-502.
15. Ferrer LM. Leishmaniasis. In: Kirk RW, Bonagura JD. *Kirk's Current Veterinary Therapy XI.* Philadelphia: W.B. Saunders, 1992. p. 266-270.
16. Genaro O. Leishmania Visceral Americana. In: Neves DP, Melo AL, Genaro O, Linardi PM. *Parasitologia Humana.* 10<sup>a</sup>. Ed. São Paulo: Atheneu; 2003. p. 37-53.
17. Organização Mundial de Saúde. *Leishmania* and HIV in Gridlock. Geneva: WHO/Joint United Nations Programme on HIV/AIDS 1998.
18. Rosenthal E, Marty P, del Giudice P, Pradier C, Eastaut JA, Le Fichoux, Y, Cassato JP. HIV and Leishmania coinfection: a review of 91 cases with focus on atypical location of *Leishmania*. *Clin Infect Dis.* 2000, 31: 1093–5.
19. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção *Leishmania*-HIV / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. – Brasília: Ministério da Saúde, 2004. 72 p.
20. Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizotto MC, Perri SH. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). *Clínica Veterinária* 2000, 5 (28): 36-44.
21. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Leishmaniose Visceral Grave: Normas e Condutas.* Brasília: Ministério da Saúde; 2006.
22. de Andrade RA, Reis AB, Gontijo CM, Braga LB, Rocha RD, Araújo MS, Vianna LR, Martins-Filho OA. Clinical value of anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007, 116 (1-2): 85-97.
23. Moddaber F. Development of vaccines against leishmaniasis. *Scand J Infect Dis.* 1990, 76: 72–8.
24. Momeni AZ, Jalayer T, Emamjomeh M, Khamesipour A, Zicker F, Ghassemi RL, Dowlati Y, Sharifi I, Aminjavaheri M, Shafiei A, Alimohammadian MH, Hashemi-Fesharki R, Nasserli K, Godal T, Smith PG, Modabber F. A randomized, double-blind, controlled trial of a killed *L. major* vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Vaccine* 1999, 17: 466-72.

25. Ministério da Saúde; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Nota de Esclarecimento sobre as Vacinas Antileishmaniose Visceral Canina registradas no MAPA. [acesso 10 ago. 2010]. Brasília; 2009. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leishmaniosevisceral\\_nota\\_esclarecimento27052009.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leishmaniosevisceral_nota_esclarecimento27052009.pdf)>.
26. Webster JI, Tonelli, L, Sternberg, EM. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol.* 2002, 20: 125-63.
27. Rogatsky I, Ivashkev LB. Glucocorticoid modulation of cytokine signaling. *Tissue Antigens.* 2006, 68 (1): 1-12.
28. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Alkan SS, Heusser CH, Blaser K. Glucocorticoids inhibit human antigen-specific and enhance total IgE and IgG4 production due to differential effects on T and B cells in vitro. *Eur J Immunol.* 1997, 27 (9): 2351-7.
29. Besedovsky HO, Sorkin E, Keller M, Muller J. Changes in blood hormone levels during the immune response. *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* 1975, 150: 466.
30. Schade UF. Pentoxifylline increases survival in murine endotoxin shock and decreases formation of tumor necrosis factor. *Circulatory Shock.* 1990, 31: 171-81.
31. Frampton JE, Brodgen RN. Pentoxifylline (oxpentifylline). A review of its therapeutic efficacy in the management of peripheral vascular and cerebrovascular disorders. *Drugs Aging.* 1995, 7 (6): 480–503.
32. Strieter RM, Remick DG, Ward PA, Spengler RN, Lynch JP 3rd, Larrick J, Kunkel SL. Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor-alpha production by pentoxifylline. *BiochemBiophys Res Commun.* 1998, 155 (3): 1230-6.
33. Currie MS, Rao KM, Padmanabhan J, Jones A, Crawford J, Cohen HJ. Stimulus-specific effects of pentoxifylline on neutrophil CR3 expression, degranulation, and superoxide production. *J Leukoc Biol.* 1990, 47 (3): 244–50.
34. D' Hellencourt CL, Diaw L, Cornillet P, Guenounou M. Differential regulation of TNF alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, TNF beta, and IL-10 by pentoxifylline. *Int J Immunopharmacol.* 1996, 18: 739-48.
35. Elenkov IJ. Glucocorticoids and T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 balance. *Ann N Y Acad Sci.* 2004, 1024: 138-46.
36. Sumyuen M H, Garin Y J, Derouin F. Effect of immunosuppressive drug regimens on acute and chronic murine toxoplasmosis. *Parasitol Res.* 1996, 82 (8): 681-6.
37. Gangneux JP, Chau F, Sulahian A, Derouin F, Garin YJ. Effects of immunosuppressive therapy on murine *Leishmania infantum* visceral leishmaniasis. *Eur Cytokine Netw.* 1999, 10 (4): 557-9.

38. Oliveira TS, Capp M, Neto, Martins BJ, Rodrigues HA, Antonino RM, Magalhães AV. Action of pentoxifylline on experimental cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. MemInstOswaldo Cruz. 2000, 95 (4): 477-82.
39. Rousseau D, Suffia I, Ferrua B, Philip P, Le Fichoux Y, Kubar Y L. Prolonged administration of dexamethasone induces limited reactivation of visceral leishmaniasis in chronically infected BALB/C mice. Eur Cytokine Netw. 1999, 10 (4): 557-9.
40. Pereira BA, Alves CR. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Vet Parasitol. 2008, 158 (4): 239-55.
41. Afonso LCC, Scott P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmaniaamazonensis*. Infect Immun. 1993, 61 (7): 2952-9.
42. Barral A, Petersen EA, Sacks DL, Neva FA. Late metastatic leishmaniasis in mouse. A model for mucocutaneous disease. Am J Trop Med Hyg. 1983, 32 (2): 277-85.
43. JonesDE, Ackermann MR, Wille U, Hunter CA, Scott P. Early enhanced Th1 response after *Leishmaniaamazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. Infect Immun. 2002, 70 (4): 2151-8.
44. Gorczycki RM. Nature of resistance to leishmaniasis in experimental rodents. Dev Comp Immunol. 1982, 6 (2): 199.
45. Wilson ME, Sandor M, Blum AM, Young BM, Metwali A, Elliott D, Lynch RG, Weinstock JV. Local suppression of IFN-gamma in hepatic granulomas correlates with tissue-specific replication of *Leishmaniachagasi*. J Immunol. 1996, 156 (6): 2231-9.
46. Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SMB, Mosser DM. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. J Exp Med. 2005, 201 (5): 747-54.
47. Rolão N, Cortes S, Gomes-Pereira S, Campino L. *Leishmaniainfantum*: Mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. ExpParasitol. 2007, 115 (3): 270-6.
48. Solano-Gallego L, Riera C, Roura X, Iniesta L, Gallego M, Valladares JE, Fisa R, Castillejo S, Alberola J, Ferrer L, Arboix M, Portús M. *Leishmaniainfantum*-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. 2001, 96 (4): 265-76.
49. Kima PE, Constant SL, Hannum L, Colmenares M, Lee KS, Haberman AM, Shlomchik MJ, McMahan-Pratt D. Internalization of *Leishmaniamexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. J Exp Med. 2000, 191 (6): 1036-67.
50. Yang Z, Mosser DM, Zhang X. Activation of the MAPK, ERK, following *Leishmaniaamazonensis* infection of macrophages. J Immunol. 2007, 178 (2): 1077-85.
51. Woelbing F, Kostka SL, Moelle K, Belkaid Y, Sunderkoetter C, Verbeek S, Waisman A, Nigg AP, Knop J, Udey MC, von Stebut E. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is

mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J Exp Med.* 2006, 203 (1): 177–88.

52. Dasgupta D, Chakraborty P, Basu MK. fMLP receptor stimulated activation of macrophage: its effect on killing of intracellular *Leishmaniadonovani*. *Bioscience Reports* 2000, 20 (5): 345–54.

53. Colmenares M, Constant SL, Kima PE, McMahon-Pratt D. *Leishmaniapifanoipatogenesis* P: Selective lack of a local cutaneous response in the absence of circulating antibody. *Infect Immun.* 2002, 70 (12): 6597-605.

54. Cooper GR, Rein RC, Beard JW. Electrophoretic analysis of kalaazar human serum. Hypergammaglobulinemia associated with seronegative reactions for syphilis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1946, 61: 179.

55. Campos-Neto A, Bunn-Moreno MM. Polyclonal B cell activation in hamsters infected with parasites of the genus *Leishmania*. *Infect Immun.* 1982, 38 (3): 871-6.

56. Chaves J, Ferri RG. Immunoglobulin in visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1966; 8 (5): 225-6.

57. Lanotte G, Rioux JA, Periers J, Volhardt Y. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d'une typologie bioclinique à finalité épidémiologique. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1979, 54: 277-95.

58. Bunn-Moreno MM, Madeira ED, Miller K, Menezes JA, Campos-Neto A. Hypergammaglobulinemia in *Leishmaniadonovani* infected hamsters: possible association with a polyclonal activation of B cells and with suppression of T cell function. *Clin Exp Immunol.* 1985, 59 (2): 427-34.

59. Louis JA, Lambert PH. Lypopolysaccharides: from immunostimulation to autoimmunity. *Springer Semin Immunopathol.* 1979, 2 (2): 215-28.

60. Wanasen N, Xin L, Soong L. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. *Intern J Parasit.* 2008, 38 (3-4): 417-29.

61. Sartori A, Oliveira AV, Roque-Barreira MC, Rossi MA, Campos-Neto A. Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azar. *Parasitol Immunol.* 1987, 9 (1): 93-103.

62. Solano-Gallego L, Rodríguez A, Iniesta L, Arboix M, Portús M, Alberola J. Detection of anti-*Leishmania* immunoglobulin G antibodies in urine specimens of dogs with leishmaniasis. *Clin Diag Lab Immunol.* 2003, 10 (5): 849-55.

63. Mathias R, Costa FAL, Goto H. Detection of immunoglobulin G in the lung and liver of hamsters with visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 2001, 34 (4): 539-43.

64. Liew FY, O'Donnell CA. Immunology of leishmaniasis. *Advances in Parasitology* 1993, 32:161–259.

65. Afrin F, Anam K, Ali N. Induction of partial protection against *Leishmaniadonovani* by promastigote antigens in negatively charged liposome. *J Parasitol.* 2000, 86 (4): 730-5.
66. Mohammadi MR, Zeinali M, Ardestani SK, Kariminia A. Identification of novel *Leishmania major* antigens that elicit IgG2a response in resistant and susceptible mice. *Korean J Parasitol.* 2006, 44 (1): 43-8.
67. Chatterjee M, Basu K, Basu D, Bannerjee D, Pramanik N, Guha SK, Goswami RP, Saha SK, Mandal C. Distribution of IgG subclasses in antimonial unresponsive Indian kala-zar patients. *ClinExpImmunol.* 1998, 114 (3): 408-13.
68. Anam K, Afrin F, Banerjee D, Pramanik N, Guha SK, Goswami RP, Saha SK, Ali N. 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.* 1999, 67 (12): 6663-9.
69. Deplazes P, Smith NC, Arnold P, Lutz H, Eckert J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmaniainfantum* and other parasites. *Parasite Immunol.* 1995, 17 (9): 451-8.
70. Nieto CG, García-Alonso M, Requena JM, Mirón C, Soto M, Alonso C, Navarrete I. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmaniainfantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet ImmunolImmunopathol.* 1999, 67 (2): 117-30.
71. Iniesta L, Gállego M, Portús M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniasis. *Vet ImmunolImmunopathol.* 2005, 103 (1-2): 77-81.
72. Bourdoiseau G, Bonnefont C, Hoareau E, Boehringer C, Stolle T, Chabanne L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmaniainfantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet ImmunolImmunopathol.* 1997, 59 (1-2): 21-30.
73. Leandro C, Santos-Gomes GM, Campino L, Romão P, Cortes S, Rolão N, Gomes-Pereira S, RiçaCapela MJ, Abranches P. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet ImmunolImmunopathol.* 2001, 79 (3-4): 273-84.
74. Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML, Alves LC, Berne ME, Atta AM. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmaniachagasi*. *Vet ImmunolImmunopathol.* 2005, 106 (1-2): 151-8.
75. Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez LM, Kaye PM, Shaw MA, Dye C, Day MJ. IgG subclass responses in longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet ImmunolImmunopathol.* 2003, 91 (3-4): 161-8.
76. Oliveira CI, Teixeira MJ, Gomes R, Barral, A, Brodskyn C. Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. *Drug Discov Today Dis Models* 2004, 1 (1): 81-6.

77. Campino L, Cortes S, Pires R, Oskam L, Abranches P. Detection of *Leishmania* in immunocompromised patients us peripheral blood spots on filter paper and the polymerase chain reaction. *Eur J ClinMicrobiol Infect Dis*. 2000, 19(5): 396-8.
78. Stern JJ, Oca MJ, Rubin BY, Anderson SL, Murray HW. Role of L3T4<sup>+</sup> and LyT-2<sup>+</sup> cells in experimental visceral leishmaniasis. *J Immunol*. 1988, 140(11): 3971-7.
79. Squires K, Schreiber RD, McElrath MJ, Rubin BY, Anderson SL, Murray HW. Experimental visceral leishmaniasis: role of endogenous IFN-gamma in host defense and tissue granulomatous response. *J Immunol*. 1989, 143 (12): 4244-9.
80. Kaye PM, Curry AJ, Blackwell JM. 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*. 1991, 146 (8): 2763-70.
81. Iniesta V, Gomes-Nieto LC, Corraliza I. The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-1-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J Exp Med*. 2001, 193 (6): 777-84.
82. Tumang M, Keogh C, Moldawer LL, Helfgott DC, Teitelbaum R, Hariprashad J, Murray HW. Role and effect of TNF-alpha in experimental visceral leishmaniasis. *J Immunol*. 1994, 153 (2), 768-75.
83. Murray HW, Squires KE, Miralles CD, Stoeckle MY, Granger AM, Granelli-Piperno A, Bogdan C. Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. Differential T cell and lymphokine roles in initial versus established immunity. *J Immunol*. 1992, 148 (6): 1858-63.
84. Rousseau D, Demartino S, Anjuère F, Ferrua B, Fragaki K, Le Fichoux Y, Kubar J. Sustained parasite burden in the spleen of *Leishmania infantum*-infected BALB/c mice is accompanied by expression of MCP-1 transcripts and lack of protection against challenge. *Eur Cytokine Netw*. 2001, 12 (2): 340-7.
85. Melby, PC, Yang YZ, Cheng J, Zhao W. Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun*. 1998, 66 (1): 18-27.
86. Wilson ME, Young BM, Davidson BL, Mente KA, McGowan SE. The importance of transforming growth factor  $\beta$  in murine visceral leishmaniasis. *J Immunol*. 1998, 161: 6148-55.
87. Engwerda CR, Murphy ML, Cotterell SE, Smelt SC, Kaye PM. Neutralization of IL-12 demonstrates the existence of discrete organ-specific phases in the control of *Leishmania donovani*. *Eur J Immunol*. 1998, 28 (2): 669-80.
88. Garin YJ, Sulahian A, Pratlong F, Meneceur P, Gangneux JP, Prina E, Dedet JP, Derouin F. Virulence of *Leishmania infantum* is expressed as a clonal and dominant phenotype in experimental infections. *Infect Immun*. 2001, 69 (12): 7365-73.

89. Vodorotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie QW, Nathan C. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *J Exp Med.* 1993, 178 (2): 605-13.
90. Gomes-Pereira S, Rodrigues OR, Rolão N, Almeida PD, Santos-Gomes GM. Hepatic cellular immune responses in mice with “cure” and “non-cure” phenotype to *Leishmaniainfantum* infection: importance of CD8+ T cells and TGF-beta production. *FEMS ImmunolMed Microbiol.* 2004, 41 (1): 59-68.
91. Sanchez MA, Diaz NL, Zerpa O, Negrón E, Convit J, Tapia FJ. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmaniachagasi*. *Am J Trop Hyg.* 2004, 70 (6): 618-24.
92. Oliveira GG, Santoro F, Sadigursky M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993, 88 (2): 243-8.
93. Duarte MI, Corbett CE. Leishmaniose visceral. In: Brasileiro G, Filho. *Bogliolo Patologia.* 5ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1994. p. 1150-60.
94. Smelt SC, Engwerda CR, McCrossen M, Kaye PM. Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. *J Immunol.* 1997, 158 (8): 3813-21.
95. Murray HW. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *Int J ExpPathol.* 2001, 82: 249-67.
96. Lefaix JL, Delanian S, Vozenin MC, Leplat JJ, Tricaud Y, Martin M. Striking regression of subcutaneous fibrosis induced by high doses of gamma rays using a combination of pentoxifylline and alpha-tocopherol: An experimental study. *Int J RadiatOncolBiol Phys.* 1999, 43 (4): 839-47.
97. Hallahan DE, Halmovitz-Friedman A, Kufe DW. The role of cytokines in radiation oncology. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds). *Important advances in oncology.* Philadelphia: Lippincott; 1993. p. 71-80.
98. Engwerda CR, Ato M, Kaye PM. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2004, 20: 524-30.
99. Gutierrez Y, Maksem JA, Reiner NE. Pathologic changes in murine Leishmaniasis (*Leishmaniadonovani*) with special reference to the dynamics of granuloma formation in the liver. *Am J Pathol.* 1984, 114 (12): 222-30.
100. Lepay DA, Nathan CF, Steinman RM, Murray HW, Cohn ZA. Murine Kupffer cells. Mononuclear phagocytes deficient in the generation of reactive oxygen intermediates. *J Exp Med.* 1985, 161 (5): 1079-96.
101. Lepay DA, Steinman RM, Nathan CF, Murray HW, Cohn ZA. Liver macrophages in murine listeriosis. Cell-mediated immunity is correlated with an influx of macrophages capable of generating reactive oxygen intermediates. *J Exp Med.* 1985, 161 (6): 1503-12.
102. Murray HW, Spitalny GL, Nathan CF. Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. *J Immunol.* 1985, 134 (3): 1619-22.

103. Murray HW. Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmaniadonovani* mastigotes. J Immunol. 1982, 129 (1): 351-7.
104. McElrath MJ, Murray HW, Cohn ZA. The dynamics of granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. J Exp Med. 1998, 167 (6): 1927-37.
105. Bradley DJ, Kirkley J. Regulation of Leishmania populations within the host. I. The variable course of Leishmaniadonovani infections in mice. Clinexp Immunol. 1977, 30 (1): 119-29.
106. Sant'Ana JA, Lima WG, Oliveira MR, Simões LA, Michalick MS, Melo MN, Tafuri WL, Tafuri Wg. Hepatic granulomas in canine visceral leishmaniasis and clinical status. Arq Bras Med Vet Zootec. 2007, 59 (5): 1137-44.
107. Santana CC, Vassallo J, de Freitas LA, Oliveira GG, Pontes-de- Carvalho LC, Dos-Santos WL. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. Parasite Immunol. 2008, 30 (10): 515-24.
108. Melo F, Amaral M, Oliveira P, Lima W, Andrade M, Michalick M, Raso P, Tafuri W, Tafuri, Wg. Diffuse intralobular liver fibrosis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Am J Trop Med Hyg. 2008, 79 (2): 198-204.
109. Stauber LA. Host resistance to the Khartoum strain of *Leishmaniadonovani*. Exp Parasit. 1958, 18: 1-11.
110. Curl JL, Peters LL. Ketamine hydrochloride and xylazine hydrochloride anesthesia in the golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). Lab Anim. 1983, 17: 290-3.
111. Buffet PA, Sulahian A, Garin YJ, Nassar N, Derouin F. Culture microtitration: sensitive method for quantifying *Leishmaniainfantum* in tissues of infected mice. Antimicrob Agents Chemother. 1995, 39 (9): 2167-8.
112. Field AP, Miles JMV. Discovering Statistics Using SAS, 1<sup>a</sup> Ed. London: Sage Publications Ltd; 2010. 720 p.
113. Ferreira MS, Borges AS. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients – A review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002, 97: 443-57.
114. Visceral Leishmaniasis [homepage]. Rio de Janeiro, RJ: Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi); [atualizado em 2010; acessado em 05 de ago. 2010]. Disponível em: < <http://www.dndi.org.br/pt/doencas-negligenciadas/leishmaniose-visceral.html> >
115. Funk JO, Ernst M, Schönharting MM, Zabel P. Pentoxifylline exerts synergistic immunomodulatory effects in combination with dexamethasone or cyclosporin A. Int J Immunopharmac. 1995, 17 (12): 1007-16.

116. Gutierrez Y, Salinas GH, Palma G, Valderrama LB, Santrich CV, Saravia NG. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmanibrazilienses* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1991, 45 (3): 281-9.
117. Bretscher PA, Wei G, Menon JN, Bielefeldt-Ohmann H. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes “susceptible” mice resistant to *Leishmania major*. *Science* 1992, 257 (5069): 539-42.
118. Honoré S, Garin YJ, Sulahian A, Gangneux JP, Derouin F. Influence of the host and parasite strain in mouse model of visceral *Leishmaniainfantum* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1998, 21 (3): 231-9.
119. Wilson ME, Jeronimo SM, Pearson RD. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmaniaspecies*. *Microbial Pathogenesis* 2005, 38 (4): 147-60.



# Apêndices

## Apêndice A

**Obtenção do inóculo para infecção, cepa M6445 de *L. (L.) chagasi*, a partir de baço de hamsters (*Mesocricetus auratus*):**

- Eutanásia dos animais infectados com dois meses, segundo o protocolo de ética;
- Retira-se o baço de forma asséptica, em capela de exaustão;
- Pesa-se o baço;
- A partir de um fragmento do baço faz-se impressões em lâminas e cora-se pela técnica de Panótico;
- Para contagem do número de formas amastigotas presentes no baço, utiliza-se a fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de amastigotas no baço} = \text{N}^{\circ} \text{ amastigotas/100 células nucleadas} \times \text{peso do baço (mg)} \times 2 \times 10^5$$

- Após macera-se o baço em 5 ml de solução salina;
- Centrifuga-se a solução por 10 minutos, a 400 rpm, a 4 °C;
- Centrifuga-se o sobrenadante por 10 minutos, 2800 rpm, a 4 °C;
- Despreza-se o sobrenadante e suspende-se o “pellet” em volume necessário para obter  $10^7$  amastigotas/ml de acordo com o cálculo a seguir:

$\text{N}^{\circ}$  de amastigotas no baço/ volume que será diluído =  $\text{N}^{\circ}$  amastigotas/ml

## Apêndice B

Soluções utilizadas para a realização do ensaio de ELISA indireto para IgG1 e IgG2:

Tampão de ligação (Carbonato-bicarbonato)

- **Solução A:** 7,95 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  diluído em 500 ml de água Mili-Q
- **Solução B:** 14,65 g de  $\text{NaHCO}_3$  diluído em 500 ml de água Mili-Q

Adiciona-se 10 ml da solução A e 10 ml da solução B e completar o volume para 100 ml.

Ajustar o pH para 9,6.

Solução de PBS

- 0,8 % de NaCl
- 0,11% de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 0,02% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 0,02% de KCl em  $\text{H}_2\text{O}$

Ajustar o pH 7,2.

**Tampão de lavagem**

- PBS acrescido de 0,05% de Tween-20

Tampão Bloqueio

- PBS acrescido de 10% soro fetal bovino e 0,05% de Tween-20.

**Solução de estreptavidina/biotina/peroxidase - Strep AB HRP Dako® (segundo as instruções do fabricante)**

Para cada placa, as soluções A e B devem ser diluídas em 1:1000:

- 10 µl da solução A e 10 µl de solução B em **tampão de bloqueio**.

**Tampão Citrato-Fosfato**

- 5,7 g de ácido cítrico
- 7,19 g de fosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

Em 1000 ml de água Mili-Q.

**Solução de OPD**

- 12,5 ml de tampão citrato-fosfato
- 10 µl de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (20 volumes)
- 0,01g de OPD.