

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

**APOPTOSE EM LINFÓCITOS T ESPLÊNICOS E DO
SANGUE PERIFÉRICO EM CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS POR *LEISHMANIA (L.) CHAGASI*.**

Karina Reinaldo Fattori

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2009

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

**APOPTOSE EM LINFÓCITOS T ESPLÊNICOS E DO
SANGUE PERIFÉRICO EM CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS POR *LEISHMANIA (L.) CHAGASI*.**

Aluna: Karina Reinaldo Fattori

Orientadora: Prof^a. Adj. Valéria Marçal Félix de Lima

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Novembro/2009

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

KARINA REINALDO FATTORI – nasceu em 06 de Agosto de 1980, no município de Penápolis, SP. Filha de Arivaldo Fattori e Maria Aparecida da Cruz Fattori. Graduada em Ciências Biológicas, em 2004, na Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS. Curso de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, nível de mestrado, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal – SP, início em Agosto de 2007 e término em 2009.

ANJOS

Existem pessoas que não gostam de animais, estas, com certeza, nunca tiveram em sua vida um amigo de quatro patas. Ou, se tiveram, nunca olharam dentro daqueles olhos para perceber quem estava ali. Um animal é um anjo que vem ao mundo ensinar amor.

Quem mais pode dar amor incondicional, amizade sem pedir nada em troca, afeição sem esperar retorno, proteção sem ganhar nada, fidelidade vinte e quatro horas por dia? Ah, não me venham com essa de que os pais fazem isso, porque os pais são humanos, se irritam, se afastam...

Um animal não se afasta, mesmo quando você o agride, ele retorna cabisbaixo pedindo desculpas por algo, que talvez não fez, lambendo suas mãos a suplicar perdão.

Alguns anjos não possuem asas, possuem quatro patas, um corpo peludo, nariz de bolinha, orelhas de atenção, olhar de aflição e carência.

Apesar dessa aparência, são tão anjos quanto os outros (aqueles com asas) e se dedicam aos seus humanos tanto quanto qualquer anjo costuma dedicar-se."

Autor Desconhecido

Dedico...

A minha querida filha Anita e ao meu eterno amor Clodoaldo.

AGRADECIMENTOS

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

À Prof^a. Adj. Valéria Marçal Félix de Lima pela orientação e idealização do projeto.

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

Às Prof^a Dr^a Rosemeri de Oliveira Vasconcelos e Prof^a Dr^a Hiro Goto, pelas participações e sugestões na comissão examinadora de defesa da dissertação.

Ao colega Almir Aparecido Spinola Lemos, técnico do Laboratório de Imunologia da UNESP - FOA, Campus da Medicina Veterinária por toda a colaboração indispensável.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia da UNESP - FOA, Campus da Medicina Veterinária; Cidinha, Luiz, Maria Emília e em especial ao Fausto pela colaboração com projeto.

Ao Prof^a Dr^a Sílvia Helena Venturoli Perri pela atenção e supervisão das análises estatísticas.

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

Ao Prof. Dr. Paulo César Ciarlini e a todos os alunos e funcionários do Laboratório Clínico pela realização dos hemogramas dos cães.

Aos professores da UNESP - FOA, Campus da Medicina Veterinária, que contribuíram em disciplinas, aumentando o meu conhecimento em várias áreas;

Ao Hospital Veterinário da UNESP - FOA, Campus da Medicina Veterinária, pelo uso dos canis para instalação dos animais do experimento.

Aos professores Dr. Paulo Sérgio Patto dos Santos e a Dr^a Flávia de Rezende Eugênio por realizarem as cirurgias dos cães do grupo controle.

A secretária da Microbiologia Edna D'Aquila pelo apoio e amizade.

A todos os funcionários da UNESP - FOA, Campus da Medicina Veterinária, que fizeram parte de toda esta jornada.

À minha mãe e minha irmã pelo apoio e incentivo.

À minha querida amiga e companheira Fernanda Borges que nunca me deixou desistir ou fraquejar.

Ao meu eterno grande amor Clodoaldo pelo incentivo, dedicação e companheirismo.

A minha filha Anita por fazer os últimos oito meses do meu mestrado os mais incríveis da minha vida.

E as minhas outras duas filhas de quatro patas Samantha e Charlotte por tornarem o meu regresso diário pra casa mais feliz.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	x
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xii
I INTRODUÇÃO.....	1
II REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	3
2.2 ASPECTOS GERAIS E EPIDEMIOLÓGICOS.....	6
2.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA ADAPTATIVA CANINA E APOPTOSE NA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	8
III OBJETIVOS.....	11
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
IV MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4.1 ÁREA DE ESTUDO.....	12
4.2 TRIAGEM DOS ANIMAIS.....	12
4.3 COLHEITA DAS AMOSTRAS.....	13
4.4 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA LVC.....	13
4.4.1 DETECÇÃO DE ANTICORPO <i>LEISHMANIA (L.) CHAGASI</i> POR ELISA INDIRETO.....	13
4.4.2 DETECÇÃO DE ANTICORPO <i>LEISHMANIA (L.) CHAGASI</i> PELO TESTE RÁPIDO ANTI-rK39.....	14
4.4.3 EXTRAÇÃO DE DNA E REAÇÃO DE PCR.....	15
4.5 AVALIAÇÃO DA APOPTOSE.....	16
4.6 ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD3-FITC CANINO E CONTROLE ISOTIPO.....	16
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
V RESULTADOS.....	18
5.1 DIAGNÓSTICO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR <i>LEISHMANIA (L.) CHAGASI</i> POR DIFERENTES MÉTODOS.....	18
5.2 ESTRATÉGIA DE ANÁLISE DA APOPTOSE DOS LINFÓCITOS T.....	20
5.3 APOPTOSE EM LINFÓCITOS T DE SANGUE PERIFÉRICO E TECIDO ESPLÊNICO.....	20
VI DISCUSSÃO.....	23
VII REFERÊNCIAS.....	26
ANEXOS	

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Densidade óptica obtida no ensaio ELISA indireto contra antígeno de <i>L. (L.) chagasi</i> e do resultado do teste rápido k-39.....	18
2	Médias ($\bar{x}$) e desvio padrões (sd) da apoptose em linfócitos de sangue e baço.....	22

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Amplificação de DNA para o gênero <i>Leishmania</i> de amostras de baço de animais infectados e saudáveis, eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. A - (PM) Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder); (CT+) Controle positivo utilizando DNA de promastigota de <i>L. (L.) chagasi</i>, (CT-) Controle negativo sem DNA; (4, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 17, 18, 20, 21, 22, 23) amostras de cães infectados com LVC; B - (PM) Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder); (CT+) Controle positivo utilizando DNA de promastigota de <i>L. (L.) chagasi</i>, (CT-) Controle negativo sem DNA (C1, C2, C3, C4, C5, C6) amostras de cães saudáveis.....	19
2	Valores de apoptose de linfócitos T em animais infectados e controles. Cada ponto representa um animal. As barras representam o valor médio de cada grupo. $P < 0.05$, diferença significativa dos valores médios na comparação dos animais infectados e saudáveis.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

WHO	<i>World Health Organization</i>
CCZA	Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba
CD4	Linfócito T auxiliar
CD8	Linfócito T citotóxico
DNA	Ácido desoxiribonucléico
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
IFN- γ	Interferon gama
iv	Intravenoso
kDa	Quilodalton
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
NK	<i>Natural killer</i>
p	Probabilidade
PBS	Solução Salina Tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Th1	T <i>helper</i> (auxiliar) tipo 1
Th2	T <i>helper</i> (auxiliar) tipo 2
UNESP	Universidade Estadual Paulista

APOPTOSE EM LINFÓCITOS T ESPLÊNICOS E DO SANGUE PERIFÉRICO EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *LEISHMANIA (L.) CHAGASI*.

RESUMO - O objetivo deste estudo foi avaliar a apoptose de linfócitos T do baço e do sangue periférico de cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral (LV) apresentando sintomas clínicos da doença e comparar ao observado em cães saudáveis. Treze cães provenientes do CCZA de Araçatuba (SP) área endêmica para leishmaniose visceral canina foram diagnosticados como positivos para a doença utilizando dos três métodos: o ELISA indireto utilizando antígeno total, a imunocromatografia com antígeno rK39 e a PCR. No grupo controle foram utilizados seis cães oriundos de área não endêmica que apresentaram resultados negativos nos testes para *Leishmania* spp e apresentaram hemograma normal. Após a eutanásia dos cães infectados, o sangue periférico e fragmentos de baço foram coletados para análise da apoptose. As amostras de baço do grupo controle foram retiradas por excisão cirúrgica após sedação, o sangue foi obtido por punção venosa, e coletado em tubos contendo EDTA. As amostras dos dois grupos foram processadas imediatamente após a coleta para determinação de apoptose utilizando dois marcadores diferentes e simultânea marcação para CD3 com anticorpo monoclonal. Nos cães infectados os linfócitos T do sangue periférico e do tecido esplênico mostram um aumento significativo dos níveis de apoptose comparado com o observado em cães controles. Esses resultados sugerem que em cães infectados a imunossupressão da resposta celular associada à infecção crônica pode ser consequência da aceleração das taxas de apoptose de células T, esses dados contribuem para o entendimento da resposta imune em cães infectados com *L. (L.) chagasi*, que pode levar ao desenvolvimento de medidas profiláticas ou preventivas para estes animais.

Palavra-chave: Leishmaniose visceral canina, apoptose, linfócitos T, *Leishmania. (L.) chagasi*, supressão da imunidade celular.

T LYMPHOCYTE APOPTOSIS IN THE SPLEEN AND PERIPHERAL BLOOD IN DOGS NATURALLY INFECTED BY *LEISHMANIA (L.) CHAGASI*.

SUMMARY: The aim of this study was to evaluate the apoptosis of T lymphocytes in the spleen and peripheral blood of dogs naturally infected with visceral leishmaniasis demonstrating symptoms of the disease and comparing to those observed in healthy dogs. Thirteen dogs from CCZA of Araçatuba, SP endemic area for canine visceral leishmaniasis were diagnosed as positive for the disease using three methods: ELISA using total antigen, the antigen rK39 immunochromatography and PCR. Six dogs from non-endemic area were tested negative in tests for *Leishmania* spp and had normal blood account. After euthanasia of infected dogs, the peripheral blood and fragments of spleen were collected for analysis of apoptosis. Samples of spleen in the control group were removed by surgical excision after sedation; blood was obtained by venipuncture and collected into tubes containing EDTA. Samples of both groups were processed immediately after collection to determinate of apoptosis using two different markers and simultaneous marking with CD3 monoclonal antibody. In dogs infected T lymphocytes from peripheral blood and spleen tissue showed a significant increasing in levels of apoptosis compared to those seen in control dogs. These results were supposed to be about those dogs in the immunosuppression of the cellular response associated with chronic infection being a consequence of accelerated rates of apoptosis of T cells, these data contributed to understanding the immune response in dogs infected *with L. (L.) chagasi*, which may lead to the development of prophylactic or preventive procedures for these animals.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis, apoptosis, T lymphocytes, *Leishmania. (L.) chagasi*, suppression of cellular immunity.

I. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença sistêmica causada por espécies pertencentes ao complexo *Leishmania donovani*. A doença esta presente em oitenta e oito países, com destaque na Africana, América do Sul, Europa e Ásia

As fases evolutivas do parasita são duas, a promastigota, alongada, móvel, com flagelo livre, encontrada no hospedeiro invertebrado (vetor), e a forma amastigota, forma ovóide, sem flagelo livre que vive e se multiplica no interior de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado.

Os vetores são insetos hematófagos da família Phlebotomidae, sendo a *Lutzomyia* o vetor da LV no continente americano.

No Brasil a LV ocorre endemicamente em vários estados das regiões Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sudeste. Em todos os estados há associação entre cães infectados e presença do vetor.

O primeiro relato de ocorrência de leishmaniose visceral canina (LVC) no estado de São Paulo ocorreu em maio de 1998 na cidade de Araçatuba. Desde então a doença vem se disseminando, 36 municípios da região já apresentaram casos confirmados da doença.

A prevalência de leishmaniose visceral em cães em áreas endêmicas pode atingir 20 a 40% da população. Acredita-se que em áreas com alta infecção em cães, a prevalência na população humana varie entre 1 e 2%.

Em cães a doença é geralmente crônica, podendo ser assintomática ou sintomática onde a doença é caracterizada por um ou mais dos nove principais sintomas, quais sejam, hiporexia com perda de peso, linfadenopatia local ou generalizada, lesões de pele, lesões oculares, epistaxe, claudicação, anemia, insuficiência renal. A forma assintomática da LVC geralmente representa de 20 a 40% de uma população soropositiva sendo que aproximadamente 80% desenvolvem a doença.

Após o processo de infecção pela *Leishmania*, o sistema imune do hospedeiro é ativado e passa a lutar contra a infecção ativando as respostas imunes inatas

(fagócitos, células NK e sistema complemento) e adaptativas (produção de citocinas e anticorpos). Por sua vez, o parasita consegue evadir a resposta imune, levando a uma cronicidade da infecção.

Na LVC o baço é um dos órgãos alvo da doença, e a esplenomegalia é um achado freqüente, as modificações patológicas apresentam graus variados, e o aspecto macroscópico das lesões está relacionado com a evolução da doença, ocorre uma queda no número de linfócitos na bainha periarteriolar, e a proliferação de macrófagos gerando uma hiperplasia folicular.

As mudanças morfológicas do baço sugerem uma supressão da imunidade celular mediada e a imunidade humoral ativa, pois a hipergamaglobulenemia resultante pode ser responsável pelo aumento de imunocomplexos circulante e diversas manifestações imunopatológicas observadas na infecção.

A supressão de imunidade celular constitui o aspecto mais importante na patogênese e progressão da doença canina, e a apoptose tem sido relacionada à ausência da imunidade celular observada na LV experimental e humana. Na infecção humana a apoptose tem sido associada à falha na imunidade, pacientes em fase aguda da doença demonstraram redução de linfócitos T e células mononucleares de sangue periférico e a diminuição na secreção do IFN- γ .

Em cães naturalmente infectados observa-se uma hipoplasia de polpa branca associada à redução de células T CD4+ no sangue periférico, no entanto nenhum estudo avaliou se existe uma associação entre a diminuição de linfócitos T e a apoptose, portanto pretende-se investigar se os níveis de apoptose estão aumentados em cães naturalmente infectados.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A Leishmaniose Visceral Canina é uma antropozoonose de distribuição mundial, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, família Tripanossomatidae. No Brasil é causada pelo protozoário *Leishmania (L.) chagasi*, que é semelhante à *Leishmania (L.) infantum* encontrada em alguns países da Ásia e do Mediterrâneo (SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997; GONTIJO & MELO, 2004). A *Leishmania* spp. é um parasita intracelular obrigatório de células do sistema fagocitário mononuclear (SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997; CARVALHO-NETTO *et al.*, 2006).

A transmissão de *Leishmania (L.) chagasi*, se dá pela picada de fêmeas de insetos dípteros, denominados flebotomínios, conhecidos popularmente como mosquitos palha ou birigui e pertencentes à família Psychodidae. O principal vetor do protozoário é *Lutzomyia longipalpis*. Recentemente, *Lutzomyia cruzi* foi também incriminado como vetor da doença no Estado do Mato Grosso do Sul (CAMARGO-NEVES *et al.*, 2001; FEITOSA, 2006).

A *Leishmania (L.) chagasi* pode ser encontrada nas formas promastigota e paramastigota (formas flageladas), no trato digestório dos hospedeiros invertebrados e na forma amastigota (formas sem flagelo livre), no citoplasma de células do sistema fagocitário mononuclear dos hospedeiros vertebrados (LEE *et al.*, 2002; BARBIÉRI, 2006; FEITOSA, 2006).

No Brasil a leishmaniose visceral canina coexiste com a leishmaniose visceral humana em todos os focos conhecidos e ela precede a ocorrência de casos humanos (DEANE, 1956; ALENCAR, 1978; MARZOCHI *et al.*, 1985).

O cão apresenta todas as características de um ótimo reservatório, pois apresenta uma área de distribuição sobreposta à humana, funciona como fonte de alimentação para o vetor, desenvolve alto parasitismo cutâneo apresentando alta taxa de infecção.

A LVC, geralmente é sistêmica e crônica, com elevada taxa de parasitas distribuídos pela derme (FERRER *et al.*, 1999). O período de incubação pode variar de 3 meses até 2 anos (GENARO, 2000).

A infecção em cães é clinicamente semelhante à infecção humana, embora no cão, além do acometimento das vísceras, são frequentemente encontradas lesões de pele nos animais infectados e sintomáticos (KRAUSPENHAR *et al.*, 2007). O quadro clínico é variável e depende da resposta imune do cão e da cepa do parasita inoculado pela picada do inseto vetor (MICHALICK & GENARO, 2005). Inicialmente surge febre intermitente, perda de peso e linfadenopatia (LIMA *et al.*, 2004). Alguns cães curam espontaneamente enquanto que outros evoluem até a morte em poucas semanas (MICHALICK & GENARO 2005).

A LVC é uma doença crônica, fatal e sistêmica, sendo os principais sinais clínicos no cão representados por caquexia, hipergamaglobulinemia, hepatoesplenomegalia, anemia e linfadenopatia (CIARAMELLA *et al.*, 1997; FERRER, 1999; LIMA *et al.*, 2004; BRITO *et al.*, 2004; LANGONI *et al.*, 2005; LINHARES *et al.*, 2005; KRAUSPENHAR *et al.*, 2007). Na pele são comuns úlceras crostosas na orelha, focinho e região periorbital, descamação furfurácea e alopecia multifocal (KRAUSPENHAR *et al.*, 2007).

De acordo com GENARO (2000), os cães soropositivos são classificados clinicamente em assintomáticos por apresentarem ausência de sinais compatíveis com leishmaniose visceral. Representam 60% da soropositividade em áreas endêmicas e 67% de positividade em exames parasitológicos de pele, apesar dos títulos de anticorpos baixos; oligossintomáticos - apresentam os primeiros sinais da doença com discreto emagrecimento e/ou sinais clínicos pouco característicos; representam cerca de 17% da soropositividade em áreas endêmicas e apresentam 71% de parasitismo cutâneo. Os polissintomáticos ou sintomáticos apresentam sinais clínicos típicos da LV, tais como, onicogrifose, emagrecimento progressivo e lesões dermatológicas. Representam cerca de 25% da soropositividade em áreas endêmicas com 81% de parasitismo cutâneo.

A confirmação do diagnóstico pode ser realizada por métodos diagnósticos diretos, tais como: citologia, isolamento e cultivo do parasita, e detecção molecular do

parasita pela reação em cadeia da polimerase (PCR), onde se amplifica o DNA do cinetoplasto do parasito, em sangue, pele, nódulos linfáticos, conjuntiva ou medula óssea de cães infectados. A sensibilidade e especificidade da PCR dependem de diferentes fatores, incluindo tipos de iniciadores, número de cópias do alvo, método de extração de DNA, biópsia do material e tipos de protocolo da PCR (GONTIJO & MELO, 2004; METTLER *et al.*, 2005).

Devido às limitações dos métodos diagnósticos diretos, têm se pesquisado técnicas indiretas e não invasivas, especialmente aquelas relacionadas à detecção de anticorpos no soro do animal. Tais métodos devem ter sensibilidade e especificidade satisfatórias, não serem dispendiosos e serem de execução simples, especialmente para permitir seu uso em inquéritos epidemiológicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008b). O método sorológico de ELISA tem sido empregado por ser um teste sensível, com facilidades técnicas e econômicas. O teste de ELISA indireto é comumente empregado para diagnóstico (LIMA *et al.*, 2003).

Outro importante avanço na área do diagnóstico indireto da LVC foi à identificação de antígenos imunodominantes e a produção de recombinantes (MOHAMMED *et al.*, 1985), entre esses o k39 uma proteína recombinante localizada no DNA do cinetoplasto de *Leishmania* spp., constituinte de uma proteína de 230 kDa da família Kinesina. A proteína rK39 apresenta seqüência idêntica em sete espécies de *Leishmania* spp. A conservação de uma seqüência de 39 aminoácidos repetitivos confere a esta proteína epítomos de alta densidade e identidade específica com as espécies *L. donovani* e *L. chagasi*. A reatividade com outros tripanossomatídeos mostrou-se negativa e a presença de anticorpos anti-rK39 indicaria a infecção ativa (MOLINA *et al.*, 1994). A proteína recombinante K39 tem sido utilizada em testes imunocromatográficos rápidos (*dipsticks*) no diagnóstico sorológico da LVC em campo e em laboratório na África e na Índia (NAKATANI *et al.*, 2001; QUINNELL *et al.*, 2001).

Os impactos no controle da LVC com a remoção e eutanásia dos cães soropositivos têm sido discutidos por se mostrar trabalhosa e de eficácia duvidosa. De acordo com estudos controlados, a propagação da LVA não é afetada exclusivamente pela eliminação de cães soropositivos (DIETZE *et al.*, 1997).

A contribuição da eliminação de cães para a redução da incidência da LV humana é questionável e ponto controverso também entre diversos autores (WHO, 2006).

2.2 ASPECTOS GERAIS E EPIDEMIOLÓGICOS

A epidemiologia das leishmanioses é extremamente complexa: inclui cerca de 20 espécies de *Leishmania* patogênicas ao homem, mais de 30 espécies de flebotomíneos (insetos vetores), muitas espécies de mamíferos, susceptíveis e além do ciclo zoonótico, apresentam também ciclos enzoótico e antroponótico (LAINSON & SHAW, 1987).

Desde 1990, os limites da distribuição geográfica das leishmanioses tem se expandido significativamente. Estima-se que mais de 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de aquisição de leishmaniose e que mais de 12 milhões estejam infectadas (WHO, 2006).

A incidência mundial das leishmanioses é estimada em 2 milhões de novos casos por ano, número provavelmente subestimado, pois se admite que para cada caso diagnosticado, nas Américas, outros cinco não foram notificados (WHO, 2006).

Segundo DESJEUX (2001), as migrações, a ação antrópica no ambiente, a urbanização dos ciclos de circulação de *Leishmania* spp., a imunossupressão e a desnutrição do hospedeiro seriam fatores de risco que explicariam a expansão, a disseminação e o aumento da incidência de casos de leishmanioses em várias regiões do mundo.

As características clínicas, etiológicas, geográficas e epidemiológicas muito diversificadas resultam em um espectro de doenças do sistema fagocítico mononuclear da pele, medula óssea, fígado, baço, linfonodos entre outros, associadas à resposta imunológica expressa pelo hospedeiro (LAINSON & SHAW, 1987).

A LV possui ampla distribuição no Velho e no Novo mundo situando-se entre as sete endemias prioritárias da Organização Mundial da Saúde. A LV afeta 500 mil pessoas por ano e aproximadamente 90% de todos os casos notificados no mundo provém de: Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão. A doença atinge principalmente

as populações mais pobres desses países, associada à desnutrição, saneamento básico e a ocupação desordenada do ambiente (WHO, 2006). No Novo Mundo a doença é conhecida como Calazar neo-tropical ou leishmaniose visceral americana (LVA).

Entre 2001 e 2005, foram notificados 15.340 casos de LV em humanos no Brasil, a maior incidência ocorre no Nordeste, com 92% do total de casos, seguida pelo Sudeste (4%), Norte (3%) e Centro-Oeste (1%) (MINISTERIO DA SAÚDE, 2008b).

A Leishmaniose visceral era anteriormente considerada como uma doença proveniente de zonas rurais, hoje é uma grande preocupação em áreas urbanas (TAUIL, 2006), com a sua incidência aumentando na região Sudeste do país. No distrito de Araçatuba, estado de São Paulo, a LV foi detectada em cães em 1998 e em humanos em 1999 (GALIMBERTTI *et al.*, 1999). O município de Araçatuba contribuiu com 17% do número total de casos humanos e 28,5% das mortes em todo o estado no ano de 2007, em sete anos (1999 a 2005), cerca de 205 pessoas foram infectadas e 20 morreram (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2009).

No Brasil, o agente etiológico é a *Leishmania (L.) chagasi*, espécie semelhante à *L. infantum* encontrada em alguns países do Mediterrâneo e da Ásia. Existe uma grande polêmica em torno da origem da LV no Novo Mundo – se ela foi introduzida recentemente, na época da colonização européia e causada pela espécie *L. infantum*, ou há vários milhões de anos, juntamente com a introdução dos canídeos, devendo a espécie ser classificada como *L. chagasi* (GONTIJO & MELO, 2004).

Os achados de altas taxas de infecção em canídeos originários da Amazônia sugerem a origem autóctone (LAINSON *et al.*, 1987). Entretanto, estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares consideram a *L. chagasi* e a *L. infantum* uma única espécie e aceitam a hipótese de origem recente nas Américas (MAURICIO *et al.*, 2000).

A ocorrência da doença em uma determinada área depende basicamente da presença do vetor susceptível e de um hospedeiro e/ou reservatório igualmente susceptível (GONTIJO & MELO, 2004).

A constante migração do homem, com seus cães (infectados), de áreas altamente endêmicas para aquelas nas quais a LVA não é endêmica, explicaria a introdução do agente etiológico e a manifestação de novos focos, sendo o risco maior

para a população humana residente que convive com *L. longipalpis* e com as raposas e/ou outras fontes silvestres locais (SERVICE, 1989).

2.3. RESPOSTA IMUNOLÓGICA ADAPTATIVA CANINA E APOPTOSE NA LEISHMANIOSE VISCERAL

Na resposta adaptativa, as células T são de fundamental importância na modulação da leishmaniose visceral. A resistência à infecção está associada à ativação de células TCD4⁺ Th1 específicas para *Leishmania* spp., que produzem IFN- γ ativando macrófagos (PINELLI *et al.*, 1994).

As células TCD8⁺ também parecem estar envolvidas com a resistência à infecção (BARBIÉRI, 2006). A ativação das células TCD4⁺ Th2 pelo parasita resulta no aumento da sobrevivência do parasita e no aparecimento das lesões, em razão das ações supressivas de suas citocinas nos macrófagos (ABBAS *et al.*, 2000; BARBIÉRI, 2006).

A supressão de imunidade celular constitui o aspecto mais importante na patogênese e progressão da doença canina. A supressão da resposta das células T é observada pela ausência da resposta linfoproliferativa “*in vitro*” a antígenos de *Leishmania* spp. e reação de hipersensibilidade do tipo retardado negativa para *Leishmania* spp (CARVALHO *et al.*, 1989). Em cães infectados com *Leishmania infantum*, observa-se uma redução no número de linfócitos T CD4⁺ e concomitante proliferação do parasita nos macrófagos e disseminação do parasita para vários órgãos incluindo estômago, intestino e pulmão (BOURDOISEAU *et al.*, 1997; HERVÁS *et al.*, 1996). Há uma correlação direta entre os níveis das células T CD4⁺ e a resposta celular ao parasito, sendo a recuperação do animal doente após o tratamento acompanhada pelo aumento da porcentagem das células T CD4⁺ (ALVAR *et al.*, 2004).

O termo apoptose (do grego *apó* = separação, *ptôsis* = queda), adotado pela primeira vez por KERR *et al.*, 1972, designa forma fisiológica de morte celular que ocorre segundo programa genético que desencadeia processo de autodigestão controlada, em concordância com a remoção de células lesadas, senescentes ou indesejáveis, sem promover uma resposta inflamatória (Li *et al.*, 2009).

Além de seu papel fisiológico que regula a população celular, controla os processos de desenvolvimento e morfogênese e limita as reações imunes (PAROLIN & REASON, 2001)

A apoptose é processo ativo cuja marca registrada é a autodigestão controlada dos constituintes celulares, devida à ativação de proteases endógenas e pode ser comparada metaforicamente a um "suicídio celular". A ativação dessas proteases compromete a integridade do citoesqueleto, provocando verdadeiro colapso da estrutura celular (TIZARD, 2009).

Há duas vias principais de apoptose. A via "extrínseca" é desencadeada por citocinas, como TNF- α , que atua por meio de receptores de "morte" específicos, como o CD95 (Fas). Nas células que morrem por essa via, a interação das ligantes com os receptores de morte leva a formação do complexo sinalizador indutor de morte (DISC, do inglês death-inducing complex), que contem as caspases 8 e 10. A via "intrínseca" é desencadeada pela ativação das proteínas pró-apoptóticas Bcl-2, que levam a liberação do citocromo c da mitocôndria. Nas células que morrem pela ação dos mecanismos intrínsecos, o citocromo c desencadeia a formação de complexo protéico, o apoptossoma (BUDIHARDJO et al., 1999).

O apoptossoma recruta e ativa a caspase 9. Independentemente das suas origens, as caspases ativadas iniciam uma cascata de "caspases executoras", que degradam as proteínas citoplasmáticas e esqueléticas, ativam as endonucleases e resultando na morte celular (OLSON & KORNBLUTH, 2001).

As células apoptóticas caracteristicamente quebram seu DNA em muitos fragmentos de baixo peso molecular. Esta fragmentação pode ser responsável pela condensação característica da cromatina. Nas células que sofrem a apoptose desencadeada por qualquer uma das vias, a cromatina nuclear se condensa contra a membrana nuclear. As células afetadas se encolhem e se destacam das células ao seu redor. Por fim, a ruptura nuclear e a desintegração citoplasmática formam fragmentos celulares, denominados corpos apoptóticos (SASTRY & RAO, 2000).

Conforme as células morrem, a membrana celular também se inverte, expondo o lipídeo fosfatidilserina em sua superfície. Este lipídeo se liga a receptores nos macrófagos e nas células dendríticas e desencadeia a fagocitose da célula. Isso

também desencadeia citocinas antiinflamatórias, como TGF- β , enquanto inibe a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α . Quando as células dendríticas fagocitam as células apoptóticas, elas processam as moléculas protéicas destas células e apresentam como complexos antígeno-MHC em suas superfícies. No entanto, estas células, neste momento, ainda não expressam moléculas co-estimulantes. Em decorrência disto, quaisquer linfócitos T que reconheçam este antígeno não são co-estimulados. Tais linfócitos serão seletivamente desligados e haverá o estabelecimento de tolerância, tal fato pode ter papel importante na imunopatologia das infecções (NAGATA, 2000, TIZARD, 2009).

Na infecção aguda humana a apoptose tem sido associada à redução de linfócitos T e células mononucleares de sangue periférico e à falha na imunidade, pois ocorre diminuição na secreção do IFN- γ (POTESTIO *et al.*, 2004).

O fenômeno de apoptose está presente em várias infecções influenciando ou não o seu desenvolvimento, como durante infecção por *Leishmania* (DAS *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2002) e *Trypanosoma* (WELBURN *et al.*, 1999).

Achados “*in vitro*” também sugerem o envolvimento da apoptose no mecanismo de supressão observado na LV, a infecção de macrófagos por *L. donovani* aumentou o nível de Fas na membrana e FasL no sobrenadante de cultura, a desregulação significativa da apoptose através da via Fas e FasL que ocorre durante a LV, é um mecanismo que pode contribuir para o aumento da sensibilidade a apoptose de células T específicas para *Leishmania* (EIDSMO *et al.*, 2002).

Em camundongos experimentalmente infectados com *L. donovani* também foi observado o aumento do nível da apoptose espontânea no baço e fígado comparado ao grupo não infectado (ALEXANDER *et al.*, 2001).

A apoptose de células T CD4 foi observada na LV experimental em camundongos susceptíveis, com concomitante queda na secreção de IL-2 e INF-g durante a infecção, estando estes eventos relacionados à imunossupressão (DAS *et al.*, 1999).

Em cães naturalmente infectados a supressão imunológica observada pode ter relação com o mecanismo de apoptose de linfócitos T, a constante estimulação devido

à característica crônica da infecção pode desencadear a apoptose e colaborar na falha da imunidade celular.

III. OBJETIVOS

Avaliar se a apoptose de linfócitos T do baço e do sangue periférico de cães sintomáticos naturalmente infectados com leishmaniose visceral pode ter envolvimento na supressão da imunidade celular desses animais.

3.1. OBJETIVO ESPECÍFICO

-Avaliar a porcentagem de células T apoptóticas no baço e no sangue periférico de cães infectados, e comparar ao observado em animais saudáveis.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ÁREA DE ESTUDO

O município de Araçatuba, (21° 12' 32" S; 50° 25' 38" W), com área total de 1.167.3311 Km², estado de São Paulo Brasil, uma área endêmica para leishmaniose visceral canina.

Os ensaios foram desenvolvidos no Laboratório de Imunologia do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista da Foa – UNESP.

4.2. TRIAGEM DOS ANIMAIS

Treze cães adultos, machos e fêmeas, entre 2 e 5 anos de idade, de várias raças e pesos, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba (CCZA), foram selecionados para o estudo. Os cães se mostraram soropositivos para o antígeno *L. (L.) chagasi* testados por ELISA indireto (LIMA *et al.*, 2003) e para o antígeno rK39. As reações de PCR de amostras de baço apresentaram amplificação positiva para o gênero *Leishmania* spp.

Os animais selecionados eram sintomáticos e apresentavam pelo menos três sinais clínicos de LV canina (febre, dermatite, linfadenopatia, onicogribose, perda de peso, caquexia, problemas de locomoção, conjuntivite, epistaxe, hepatoesplenomegalia, edema e apatia).

Foi também incluído no estudo um grupo controle composto por 6 animais saudáveis, machos e fêmeas, de várias raças e pesos, provenientes de área não endêmica (Londrina, Paraná, Brasil). Eram soronegativos para *L. (L.) chagasi*, testados por ELISA indireto (LIMA *et al.*, 2003) e apresentaram reação negativa ao antígeno rK39, com amostras de baço negativas na reação de PCR para DNA do parasita. Esses

animais apresentaram hemograma normal, indicando ausência de processo infeccioso. Este estudo teve aprovação do comitê de ética em experimentação animal.

4.3 COLHEITA DAS AMOSTRAS

Os cães naturalmente infectados foram eutanasiados pelo seguinte processo: inicialmente tranquilizados com 0,05 mg/Kg de maleato de acepromazina iv; após 15 minutos de intervalo fez-se uma injeção rápida (20 s) de 15 mg/Kg de tiopental sódico iv seguida de 10 ml de cloreto de potássio 19,1% pela mesma via. Após a eutanásia os fragmentos de baço foram coletados e mantidos em meio de cultura celular RPMI-1640 (Sigma, USA). As amostras de baço do grupo controle foram retiradas por excisão cirúrgica após sedação. O sangue foi obtido por punção venosa, e coletado em tubos contendo EDTA. As amostras foram processadas imediatamente após a coleta.

4.4. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA LVC.

4.4.1. DETECÇÃO DE ANTICORPO *LEISHMANIA (L.) CHAGASI* POR ELISA INDIRETO.

Os soros dos cães foram analisados por ELISA indireto, utilizando como antígeno, lisado total de promastigota *Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR00/MER02). Para a preparação do antígeno, os parasitas foram mantidos em cultura a 26°C em Meio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis U.S.A.) (LIMA *et al.* 2003).

A placa de poliestireno foi coberta com 20 µg/mL de antígeno total do parasita *L. (L.) chagasi* (LIMA *et al.* 2003), em 5 mL de tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6. Após incubação a 4°C por toda a noite. A placa foi lavada com PBS - 0,05% Tween 20 e bloqueada por 1 hora à temperatura ambiente, com 150 µL por poço de uma solução de PBS contendo 10% de soro bovino fetal. Após nova lavagem com PBS - 0,05% Tween 20, as amostras de soro, diluídas 1:400 em PBS - 10% de soro fetal bovino e 0,05% Tween 20, foram adicionadas a cada poço, em duplicata, e incubadas por 3 horas à temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente com PBS - 0,05%

Tween 20, e adicionado 100 µL por poço de anticorpo anti-IgG de cão conjugado à peroxidase (Sigma, St. Louis, U.S.A.), na diluição de 1:1000, lavada novamente e adicionado 100mL da solução, contendo 0,4 mg/mL O-phenylenediamine (Sigma, St. Louis, U.S.A.), e H₂O₂ 0,4 µL/mL em 0.1M ácido cítrico, 0.2M fosfato de sódio dibásico. A reação foi bloqueada com 50µL de HCl. A densidade óptica (DO) foi avaliada utilizando o leitor Spectra Count TM (Packard Bio Science Company, U.S.A.). O ponto de corte (*Cut-off*) de 0,270 foi estabelecido utilizando como referência à média mais 3 vezes o desvio padrão obtido no grupo (VOLLER *et al.*, 1980).

4.4.2. DETECÇÃO DE ANTICORPO *LEISHMANIA (L.) CHAGASI* PELO TESTE RÁPIDO ANTI-rK39.

Foi utilizado o Kit Kalazar Detect^{MT} Rapid Test (InBios Inc-Seattle, WA-USA), de acordo com as instruções do fabricante. Este é um teste rápido para diagnóstico da leishmaniose visceral, caracterizado por um ensaio imunocromatográfico qualitativo realizado em fita de papel de imunocromatografia para a detecção de anticorpos anti-k39, em amostras de soro de animais. A fita é pré-coberta com o antígeno recombinante K39 na posição de realização do teste, chamada linha de teste e com anticorpo anti-proteína A na posição chamada linha controle do teste. Durante o teste a amostra reage com o conjugado proteína A /ouro coloidal, também adsorvido à fita. Esse complexo então, migra na fita por capilaridade até reagir com o antígeno recombinante, se houver anticorpos específicos, gerando uma linha vermelha. A presença desta linha indica resultado positivo e a ausência indica resultado negativo. Independente da presença de anticorpos específicos para *L. (L) chagasi*, como o complexo antígeno/anticorpo continua a migrar e reage com o anticorpo anti-proteína A, uma linha vermelha na região controle sempre aparecerá. Este teste foi empregado utilizando-se 20 µL de soro dispensados na região de aplicação da amostra na fita teste, que por sua vez foi colocada em tubo contendo duas ou três gotas (100 – 150 µL) de tampão que acompanha o Kit, aguardando-se até 10 minutos para ocorrer a reação imunocromatográfica positiva ou negativa

4.4.3. EXTRAÇÃO DE DNA E REAÇÃO DE PCR.

O DNA foi obtido de fragmentos do baço de aproximadamente 1cm², após homogeneização do tecido em homogeneizador de tecidos (Ultraturrax T8, Alemanha) na velocidade máxima do aparelho, por aproximadamente 5 minutos, mantidos em gelo e lavadas sucessivamente em solução tampão 1x SSC (NaCl 3M, citrato de sódio 0,3M, pH 7,0). Para a digestão enzimática adicionaram-se 300 µl de solução de lise (10% SDS em 0,2M de acetato de sódio) e 20 µg/ml proteinase K, por 1 hora a 56 °C.

O DNA foi extraído pelo método do fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), (SAMBROOK, 1989). Após a extração, o DNA foi resuspenso em 50 µl de TE (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA pH 8,0) e incubado por 10 minutos a 60°C. O material foi mantido a -20°C.

Para a reação de PCR, foram utilizados os iniciadores 13A (3'GTG GGG GAG GGG CGT TCT5') e 13B (3'ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT5') (RODGERS *et al.*, 1990), que amplificam um fragmento com 120pb de uma região conservada do minicírculo do cinetoplasto do gênero *Leishmania* spp., cada reação da PCR foi obtida em 60 µl contendo 30 pmol de cada iniciador (Invitrogen®), 0,2 mM de DNTPs (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 5U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®), 50nM de solução buffer, H₂O milliQ e 1 µl de DNA.

A amplificação foi realizada em Termociclador Mastercycler gradiente (Eppendorf®) com aquecimento inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 33 ciclos de: 95°C por 1,5 minutos para desnaturação, 57°C por 1,5 minutos para o anelamento e 72°C por 2 minutos para extensão. A extensão final foi a 72°C por 10 minutos e o produto final armazenado a -20°C até análise.

Para cada reação, adicionou-se um controle negativo (com água ultrapura), um controle positivo contendo DNA extraído da cultura de promastigotas de *Leishmania* (*L.*) *chagasi* (MHOM/BR00/MER02).

O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, seguido por coloração com brometo de etídio e visualização em luz UV.

4.5. AVALIAÇÃO DA APOPTOSE.

A apoptose foi avaliada em células mononucleares de sangue periférico e células do baço dos cães portadores de LVC e cães saudáveis utilizando oS KitS Guava Nexin® Assay (Guava, Hayward, CA) e o MutilCaspase® (Guava, Hayward, CA). O procedimento do teste foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

Como controle positivo na avaliação da apoptose foi utilizado o indutor de apoptose Camptotecina (Sigma, EUA) (0,15 µg/ mL) em DMSO (Sigma) (TAO *et al.*, 2004). As células foram incubadas na presença do indutor por 1 hora em estufa de CO₂ a 37C°. Para avaliação da taxa de apoptose foi utilizados 1 x 10⁶ células/mL. O controle positivo foi utilizado como uma referência para delimitar a "gate" das células apoptóticas no citômetro de fluxo.

4.6. ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD3-FITC CANINO E CONTROLE ISOTIPO.

As células de sangue periférico foram marcadas após a separação de células mononucleares sobre gradiente de Ficoll-Paque (Amersham Biosciences). As células do baço foram processadas após a lise dos glóbulos vermelhos.

Para marcação de linfócitos T as células marcadas anteriormente com os Kits Guava Nexin® Assay ou MultiCaspase®, foram incubadas em PBS 1X com 1% de albumina sérica bovina, 0,1% azida e 20% de soro bovino fetal por 1 hora a 4°C para bloquear os receptores Fc (FCR). Logo após as células foram marcadas com anticorpo monoclonal anti-CD3-FITC canino e controle isotipo (Serotec®) por 15 minutos a 4°C. As células foram lavadas duas vezes em PBS e soro bovino fetal 2% e fixadas com PBS -formol a 2% e mantidas no escuro a 4°C até a aquisição.

A aquisição dos dados foi realizada no citômetro EasyCyte mini ® (Guava, Hayward, CA), e a análise dos dados adquiridos no Software Express Plus ® Guava.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por meio de teste não-paramétrico. As médias dos grupos foram comparadas utilizando-se o teste de Mann-Whitney. Resultados foram considerados como significantes quando $p < 0.05$. As análises estatísticas e os gráficos foram efetuadas utilizando o programa computacional GraphPad Prism 3 (GraphPad Software, Inc. CA. USA)

V. RESULTADOS

5.1. DIAGNÓSTICO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *LEISHMANIA (L.) CHAGASI* POR DIFERENTES MÉTODOS.

O diagnóstico para a triagem dos animais foi realizado através de dois métodos sorológicos: o ELISA indireto contra o antígeno total de *Leishmania (L.) chagasi* e a imunocromatografia com antígeno rK39; e também pelo método molecular da PCR.

No ensaio de ELISA indireto o ponto de corte de 0,270 foi estabelecido utilizando como referência à média mais 3 vezes o desvio padrão da densidade óptica obtida em cães saudáveis de área não endêmica. Os resultados obtidos nos métodos sorológicos estão expressos na tabela 1.

Tabela 1: Densidade óptica obtida no ensaio ELISA indireto contra antígeno de *L. (L.) chagasi* e do resultado do teste rápido k-39.

Animal	Sexo	ELISA (D.O.)	K39
4	F	0,541	Positivo
7	M	0,602	Positivo
8	F	0,583	Positivo
9	M	0,636	Positivo
11	M	0,529	Positivo
12	F	0,536	Positivo
13	F	0,581	Positivo
17	F	0,326	Positivo
18	M	0,506	Positivo
20	M	0,699	Positivo
21	F	0,732	Positivo
22	F	0,465	Positivo
23	F	0,520	Positivo
C1	M	0.105	Negativo
C2	F	0.112	Negativo
C3	M	0.090	Negativo
C4	M	0.108	Negativo
C5	F	0.159	Negativo
C6	M	0.142	Negativo

No diagnóstico pelo método molecular o DNA das amostras de baço dos cães infectados provenientes do CCZA mostrou amplificação de uma banda de tamanho esperado para o iniciador utilizado. Os cães saudáveis não mostraram amplificação positiva (Figura 1).

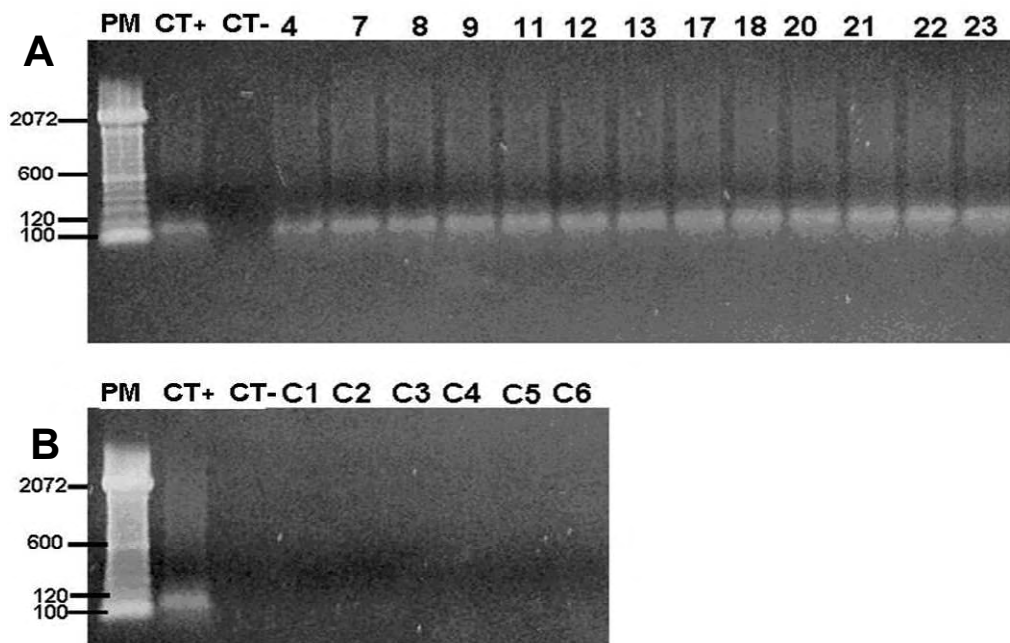


Figura 1: Amplificação de DNA para o gênero *Leishmania* de amostras de baço de animais infectados e saudáveis, eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. A - (PM) Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder); (CT+) Controle positivo utilizando DNA de promastigota de *L. (L.) chagasi*, (CT-) Controle negativo sem DNA; (4, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 17, 18, 20, 21, 22, 23) amostras de cães infectados com LVC; B - (PM) Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder); (CT+) Controle positivo utilizando DNA de promastigota de *L. (L.) chagasi*, (CT-) Controle negativo sem DNA (C1, C2, C3, C4, C5, C6) amostras de cães saudáveis.

5.2. ESTRATÉGIA DE ANÁLISE DA APOPTOSE DOS LINFÓCITOS T

Para a análise da apoptose dos linfócitos T inicialmente foi feita uma janela “gate” delimitando as células positivas para CD3 (Plot 2), em seguida essa população foi analisada para a marcação positiva para os dois marcadores indicativos do estado de apoptose (Plot 3). A estratégia de análise da apoptose de linfócitos T foi idêntica para os dois Kits utilizados (Guava Nexin[®] Assay e MultiCaspase[®]), conforme apresentado em anexo 1.

5.3. APOPTOSE EM LINFÓCITOS T DE SANGUE PERIFÉRICO E TECIDO ESPLÊNICO

Para investigar a apoptose na infecção por *L. (L) chagasi*, nos avaliamos a morte celular em células T de sangue periférico e de amostras de baço imediatamente após a coleta. A apoptose dos linfócitos das amostras foi detectada utilizando dois kits: Guava Nexin[®] Assay e MultiCaspase[®] e simultânea marcação para CD3 com anticorpo monoclonal. A porcentagem de linfócitos T apoptóticos foi avaliada por dupla marcação positiva. O controle positivo apresentou taxas de apoptose nos diferentes experimentos acima de 45 % e foi utilizado como referência na análise dos dados da citometria.

Os resultados apresentados na figura 2 claramente indicam que os linfócitos T do sangue periférico e do tecido esplênico mostram um aumento significativo dos níveis de apoptose comparado com o observado em animais controles ($p < 0.05$, teste de Mann-Whitney).

Em animais saudáveis, a frequência da apoptose no sangue periférico e no baço foi similar. Nos animais infectados o kit MultiCaspase[®] mostrou um pequeno aumento da taxa de apoptose no baço quando comparado ao sangue, enquanto o Kit de Guava Nexin[®] mostrou valores similares. De maneira geral os valores de apoptose observados nos dois Kits foram muito próximos e não houve diferença estatística entre eles, como mostrado na tabela 2.

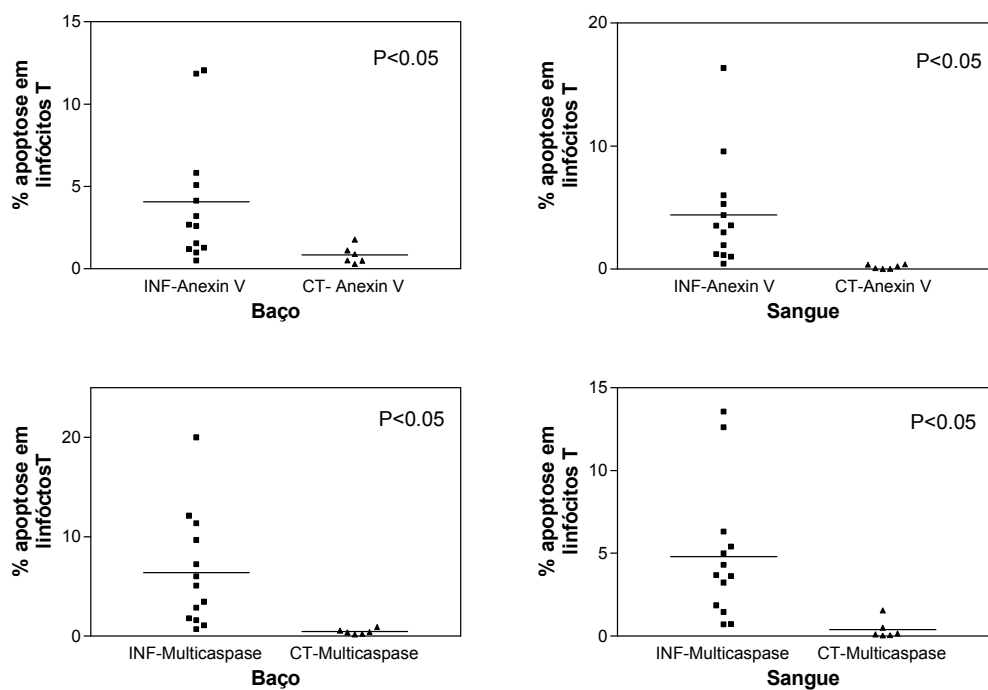


Figura 2. Valores de apoptose de linfócitos T em animais infectados e controles. Cada ponto representa um animal. As barras representam o valor médio de cada grupo. $P < 0.05$, diferença significativa dos valores médios na comparação dos animais infectados e saudáveis.

Tabela 2: Médias ($\bar{x}$) e desvios padrões (sd) da apoptose em linfócitos de sangue e baço.

Variável	Grupos	Tecidos ($\bar{x} \pm sd$)	
		Baço	Sangue
Guava Nexin® Assay	Infectados	4.070 $\pm$ 3.850 a	4.410 $\pm$ 4.381 a
	Controles	0,848 $\pm$ 0.547 b	0.180 $\pm$ 0.171 b
MultiCaspase®	Infectados	6.381 $\pm$ 5.642 a	4,805 $\pm$ 4.069 a
	Controles	0.438 $\pm$ 0.269 b	0.398 $\pm$ 0.594 b

Médias seguidas de letras distintas representam a comparação entre os grupos que diferiram de acordo com o teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

VI. DISCUSSÃO

Atualmente, em detrimento de intensa pesquisa na área de diagnóstico laboratorial da LVC, ainda não há uma definição quanto aos testes a serem empregados para o diagnóstico. Assim foram utilizados diferentes métodos para se assegurar do processo infeccioso do cão. Na triagem dos cães com LVC, os dois testes sorológicos (ELISA indireto e o imunocromatográfico em tiras com antígeno rK39) apresentaram uma alta concordância. As amostras positivas em somente um dos testes foram excluídas do estudo. O método molecular PCR foi utilizado para confirmação do diagnóstico sorológico. As amostras dos treze cães utilizados neste estudo obtiveram resultados positivos frente aos métodos utilizados e seis animais saudáveis (hemograma normal) oriundos de área não endêmica para LVC, foram negativos, indicando ausência de infecção para *Leishmania spp.*

Na triagem dos cães o antígeno total de promastigota foi utilizado no ELISA devido a sua facilidade de obtenção em grande quantidade e sob condições padronizadas, podendo constituir uma fonte relativamente estável de determinantes antigênicos. Sua limitação é a reatividade cruzada com outras doenças (ROSÁRIO *et al.*, 2005), por outro lado antígenos recombinantes apresentam alta sensibilidade e baixa reação cruzada com outros patógenos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008b, ROSÁRIO *et al.*, 2005).

Os resultados deste estudo demonstram que ambos os métodos sorológicos empregados, são ferramentas diagnósticas úteis para a detecção da LVC, podendo ser aplicadas com segurança e que, a escolha entre eles depende das condições presentes e da finalidade do estudo. Porém, o teste imunocromatográfico em tiras com antígeno rK39 apresentou-se como um ensaio simples, de baixo custo e rápido quando comparado com a PCR e o ELISA indireto, que são métodos de diagnóstico laboriosos e caros quando realizados em larga escala.

Em áreas endêmicas a disponibilidade dessas ferramentas diagnósticas é de fundamental importância para o acompanhamento das ações de saúde pública desenvolvidas com a finalidade de controlar a expansão desta zoonose.

O nível de apoptose em células T do baço e do sangue de cães de uma área endêmica de leishmaniose visceral foi avaliado para investigar o papel desse mecanismo na imunopatologia da doença. A apoptose é essencial para o controle homeostático do número de linfócitos, especialmente após o desenvolvimento da resposta imune a um microorganismo invasivo (SCAFFIDI *et al.*, 1999). Contudo, alguns microorganismos são capazes de manipular essa resposta, seja diretamente ou ter estratégias desenvolvidas para sobreviver no hospedeiro, até que tais mecanismos homeostáticos sejam ativados para reduzir número de células T efectoras (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000)

Mostramos que o nível de apoptose de células T do baço e do sangue periférico foi maior em cães infectados quando comparado com os saudáveis. Os maiores níveis de apoptose observados em cães infectados indicam que a presença de *Leishmania (L.) chagasi* induz apoptose de células T. Uma vez que a progressão da infecção está relacionada ao comprometimento da imunidade celular mediada (CARVALHO *et al.*, 1989) a detecção de apoptose de células T poderia contribuir para a ineficácia da resposta imune celular durante infecção por *L. (L.) chagasi*.

Nossos resultados confirmam resultados anteriores mostrando que o parasita *Leishmania* spp e constituintes de sua membrana induzem apoptose (WOLDAY *et al.*, 1999). Um estudo *in vitro* mostrou que a infecção de macrófagos por *L. donovani* aumentou o nível de FAS na membrana e sFASL no sobrenadante da cultura, este mecanismo pode contribuir para o aumento da sensibilidade a apoptose de células T específico para *Leishmania* spp (EIDSMO *et al.*, 2002). Embora a apoptose tenha sido observada seus mecanismos indutores não foram investigados e deverão ser esclarecidos em estudos futuros.

Nos cães a infecção natural reproduz o que é observado nos modelos experimentais. *In vivo* a infecção intravenosa por *L. donovani* em camundongos induz apoptose significativa nas células T no baço (ALEXANDER *et al.*, 2001).

Em outros modelos o aumento da apoptose de linfócitos T também já foi estudada. Em muitas doenças crônicas infecciosas, incluído as causadas por *T. cruzi* (NUNES *et al.*, 1997), *T gondii* (KHAN *et al.*, 1996), *L. donovani* (DAS *et al.*, 1999) e *L. major* (CONCEIÇÃO-SILVA *et al.*, 1998), ocorre supressão da imunidade mediada por

células T e aumento da apoptose de linfócitos, o que pode contribuir para a persistência do parasita no hospedeiro. Tais resultados são similares ao observado em nosso estudo. Em infecção experimental pelo *T. cruzi*, células apoptóticas foram detectadas no baço, linfonodos mesentéricos e no coração de camundongos. O mesmo foi observado em corações de pacientes crônicos. Estudos prévios sugerem que a apoptose tem um papel patogênico na infecção pelo *T. cruzi* e que o bloqueio da apoptose pode ser alvo de intervenção terapêutica (REIS & LOPES, 2009).

Os maiores níveis de apoptose observados em cães infectados parecem ser uma resposta fisiológica a persistente ativação imune, os mecanismos envolvidos ainda não estão estudados. O esgotamento das células T provavelmente reflete a depleção linfóide encontrada em cães sintomáticos. Esse mecanismo pode eventualmente se desenvolver em células T não-específicas levando a depleção de células T tornando os cães mais suscetíveis à infecção por agentes oportunistas. A infecção de *Leishmania* spp associada a tais agentes é um achado freqüente em levantamentos soroepidemiológicos (PRATA & SILVA, 2005). A desordem imunológica pode originar doenças oportunistas concomitantes a LVC como cistites, pneumonias bacterianas, piodermites, malasseziase, dermatofitoses, demodicose e ainda co-infecções com outros agentes, como *Babesia* spp e *Dirofilaria* spp (LUVIZOTTO, 2006).

Nossos resultados indicam que, em cães infectados a imunossupressão associada com a infecção crônica é devido à aceleração das taxas de apoptose de células T, esta imunossupressão também foi demonstrada por DAS et al., (1999) em LV experimental onde se observou a apoptose de células T CD4 durante a infecção.

O entendimento da resposta imune em cães infectados com *L. (L.) chagasi*, que pode levar ao desenvolvimento de medidas profiláticas ou preventivas para estes animais. Considerando que, em áreas endêmicas os cães domésticos são os principais hospedeiros do parasita e que elas podem transmitir para os seres humanos, qualquer nova medida ou tratamento que beneficie a população canina provavelmente irá beneficiar também os seres humanos. Estudos futuros serão importantes para esclarecer os mecanismos indutores de apoptose.

VII. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and molecular Immunology**. 4.ed. Philadelphia : W.B. Saunders. P. 553, 2000.
- ALENCAR, J.E. Leishmaniose Visceral no Brasil. **Ver. Med. Univ. Fed. Ceará.**, p. 17-18: 129-48, 1978.
- ALEXANDER, C.E.; KAYE, P.M.; ENGWERDA, C.R. CD95 is required for the early control of parasite burden in liver of *Leishmania donovani*-infected mice. **J. Immunology**, Euro, v. 31, p. 1199-1210, 2001.
- ALVAR, J.; CANĂVETE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine Leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 57, p. 1-88, 2004.
- BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 329-337, 2006.
- BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; MAGNOL, J.P.; SAINT ANDRE, I.; CHABANNE, L. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 56, p. 345-35, 1997.
- BRITO, F.L.C.; ALVES, L.C.; ORTIZ, J.P.D.; MAIA, F.C.L.; SILVA JUNIOR, V.A.; LAUS, J.L. Uveitis associated to the infection by *Leishmania chagasi* in dog from Olinda city, Pernambuco, Brazil. **Ciência Rural**, v. 34, p. 925-929, 2004.
- BUDIHARDJO, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X.; WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu Rev Cell Dev Biol.**, v. 15, p. 269-90, 1999.

CAMARGO-NEVES, V.L.F. DE; KATZ, G.; RODAS, L.A.C.; POLETTO, D.W.; LAGES, L.C.; SPINOLA, R.M.F.; CRUZ, O.G. Use of spacial analysis tools in the epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis, Araçatuba, São Paulo, Brazil, 1998 – 1999. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.17 (5), p. 1263-7, 2001.

CARVALHO, E.M.; BACELLAR, O.; BARRAL, A.; BADARÓ, R.; JOHNSON, W.D.JR. Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. **J. Clin. Invest.**, v. 83, p. 860–864, 1989.

CARVALHO-NETTO, E.F.; MARKHAM, C.; BLANCHARD, C.D.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; BLANCHARD, R.J. Physical environment modulates the behavioral responses induced by chemical stimulation of dorsal periaqueductal gray in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 7, p. 85:140, 2006.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA “PROF. ALEXANDRE VRANJAC”, SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO. Leishmaniose visceral americana humana – casos autóctones e óbitos de leishmaniose visceral americana, segundo município de residência, 1999-2005. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lvah_auto9904.htm> Acesso em 21 março de 2009.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; PERSECHINO, A.; GRADONI, L.; SCALONI, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Record**, v. 141, p. 539-543, 1997.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; HAHNE, M.; SCHROTER, M.; LOUIS, J.; TSCHOPP, J. The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, n.1, p. 237-45, 1998.

DAS, G.; VOHRA, H.; RAO, K.; SAHA, B.; MISHRA, G. C. *Leishmania donovani* infection of a susceptible host results in CD4⁺ T-cell apoptosis and decreased Th1 cytokine production. **Scand. J. Immunol.**, v. 49, n.3, p.307-10, 1999.

DAS, M.; MUKHERJEE, S.B.; SHAHA, C. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **J. Cell Sci.**, v.114, (Pt 13), p. 2461-9, 2001.

DEANE, L.M. Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos sobre os reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. **Serviço Nacional de Educação Sanitária**. Rio de Janeiro, 1956.

DESJEUX, P. The increase risk for leishmaniasis worldwide. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 95, p. 239-241, 2001.

DIETZE, R.; BARROS, G.B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clin Infect Dis.**, v. 25, p. 1240-2, 1997.

EIDSMO, L.; WOLDAY, D.; BERHE, N.; SABRI, F.; SATTI, I.; EL HASSAN, A.M.; SUNDAR, S.; CHIODI, F.; AKUFFO, H. Alteration of Fas and Fas ligand expression during human visceral leishmaniasis. **Clin Exp Immunol.** v. 130, p. 307-313, 2002.

FEITOSA, M.M. **Leishmaniose visceral: facetas da doença**. In: 6º Congresso Paulista de Clínicos Veterinários de pequenos animais, São Paulo, p. 57-58, 2006.

FERRER, L.M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. From canine leishmaniasis update (Ed. R. Killick-Kendrick). **Proceedings of a canine leishmaniasis forum**, Barcelona, 28-31 January, p. 6-10, 1999.

FREIRE-DE-LIMA, C.G.; NASCIMENTO, D.O.; SOARES, M.B.; BOZZA, P.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; DE MELLO, F.G.; DOSREIS, G.A.; LOPES, M.F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature**. v. 13, p. 199-203, 2000.

GALIMBERTTI, M.Z.; KATZ, G.; CAMARGO-NEVES, V.L.F.; RODAS, L.A.C.; CASANOVA, C.; COSTA, I.P. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 32(1 Suppl), p. 217-8, 1999.

GERNARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NIVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, p. 56-72, 2000.

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

HERVÁS, J.; MÉNDEZ, A.; CARRASCO, L.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.C.; Pathological study of visceral leishmaniasis in a jackal (*Canis aureus*). **Vet. Rec.**, v. 139, p. 293-295. 1996.

KERR, J.F.R., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.

KHAN, A.A.; SLIFER, T.; ARAUJO, F.G.; REMINGTON, J.S. Trovafloxacin is active against *Toxoplasma gondii* Antimicrob. **Agents Chemother.** v.40, p. 1855-1859, 1996.

KRAUSPENHAR, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; SILVA, A.A.; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.37, 2007.

LAINSON, R.; SHAW JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**, Vol 1, Academic Press Inc., London, p. 1-120. 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T.; BRAGA, R.R.. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**; v.81, p. 517, 1987.

LANGONI, H.; LUCHEIS, S.B.; SILVA, R.C.; CASTRO, A.P.B.; PAES, A.C. American visceral leishmaniasis: a case report. **The Journal of Venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 11, p. 361-372, 2005.

LEE, N.; BERTHOLET, S.; DEBRABANT, A.; MULLER, J.; DUNCAN, R.; NAKHASI, H. L. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. **Cell Death Differ.**, v. 9, n.1, p.53-64, 2002.

LI, H.J.; LIU, D.J.; CANG, M.; WANG, L.M.; JIN, M.Z.; MA, Y.Z.; SHORGAN, B. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 114, p. 89-98, 2009.

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

LIMA, V.M.F.; GONCALVES, M.E.; ILKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; FEITOSA, M.M. Anti-*leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research**, v. 36, p. 485-489, 2003.

LIMA, W.G.; MICHALICK, M.S.M.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta tropica**, v. 92, p. 43-53, 2004.

LINHARES, G.F.C.; CHAVES, N.S.T.; DUARTE, S.C.; FERNANDES, P.R.; AMARAL, A.V.C.; SOUZA, M.A. Relato de um caso clinico de leishmaniose visceral em um cão na cidade de Goiânia. Revista **de Patologia Tropical**, v. 34, p. 69-72, 2005.

LUVIZOTTO, M.C.R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. In: **Fórum Sobre Leishmaniose Visceral Canina, 1., Jaboticabal. Anais.**, FCAV/UNESP, 1974. p.15-22. 2006

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

MAURICIO, I.L.; STOHARD. J.R.; MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today**; v. 16, p. 188-9, 2000.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 5515–5519, 2005.

MICHALICK, M.S.M; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. (Ed) **Parasitologia humana**. 11o ed., Ed. Atheneu, São Paulo, p. 56-72. 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE: MS, 2008b. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27082>. Acesso em 17 de janeiro de 2008.

MOHAMMED, E.A.; WRIGHT, E.P.; KAGER, P.A.; LAARMAN, J.J.; PONDMAN, K.W. ELISA using intact promastigotes for immunodiagnosis of kalaazar. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**; v. 79, p.344-350. 1985.

MOLINA R, AMELA C, NIETO J, SAN-ANDRES M, GONZALEZ F, CASTILLO JA, LUCIENTES J, ALVAR J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 88, p. 491-493, 1994.

NAGATA, S. Apoptotic DNA fragmentation. Exp. **Cell Res.** v.256, p.12-18, 2000.

NAKATANI, M.; MIRANDA-BADARÓ, R.; MEIRELES. A.; TRIGO, J.; NETTO, E.M.; BADARÓ, R. Avaliação da sensibilidade do teste rápido (TRALd) para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* com o novo antígeno K26 adicionado ao K39. **Ver. Brás. Med. Trop.** Suplemento: 10, 2001.

NUNES, L.R. DE; CARVALHO, M.R.C.; BUCK, G.A. *Trypanosoma cruzi* strains partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader RNA and rRNA gene promoters. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 86, p. 211-224, 1997.

OLSON, M.; KORNBLUTH, S. Mitochondria in apoptosis and human disease. **Current Molecular Medicine.** v.1, p.91-122, 2001.

PARONLIN, M.B.; REASON, I.J. Apoptosis as a mechanism of tissue injury in hepatobiliary diases. **Arquivo Gastroenterologia**, São Paulo, v.38, n.2, p. 38-44, 2001.

PINELLI, E.; ELLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; REAL, G. RUITENBERG, J. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. **Infec Imm**, v. 62(1), p. 229-235, 1994.

POTESTIO, M.; D'AGOSTINO, P.; ROMANO, G.C.; MILANO, S.; FERLAZZO, V.; AQUINO, A.; DI BELLA, G.; CARUSO, R.; GAMBINO, G.; VITALE, G.; MANSUETO, S.; CILLARI, E. CD4⁺ CCR5⁺ and CD4⁺ CCR3⁺ lymphocyte subset and monocyte apoptosis in patients with acute visceral leishmaniasis. **Immunology**. v. 113, p. 260-268, 2004.

PRATA, A.; SILVA, L. A. Calazar. In: COURA, J. R. Dinâmica das Doenças infecciosas e Parasitárias, v. 1, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p. 713-732.

QUINNELL, R.J.O.; COURTENAY, S.; DAVIDSON, L.; GARCEZ, B.; LAMBSON, P.; RAMOS, J.J. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitol.** v. 122, p. 253–261, 2001.

REIS, G.A, LOPES, M.F. Apoptose e Doença de Chagas – um papel na imunoregulação?. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm>> Acesso em 01 de agosto de 2009.

RODGERS, M.R.; POPPER, S.J.; WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Exp Parasitol.**, v. 71(3), p. 267-75. 1990.

ROSÁRIO EY, GENARO O, FRANÇA-SILVA JC, COSTA RT, MAYRINK W, ET AL. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.100, p. 197–203, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold spring harbor laboratory press**. 1989.

SANTA ROSA, I.C.A.; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, v. 2, n. 11, p. 24-28, 1997.

SASTRY, P.S. & RAO, K.S. Apoptosis and the nervous system. **J. Neurochem.** v.74, p.1-20, 2000.

SCAFFIDI, C.; KIRCHHOFF, S.; KRAMMER, P.H.; PETER, M.E. Apoptosis signaling in lymphocytes. **Curr Opin Immunol.** v. 11, p. 277-85. 1999.

SERVICE, M.W. Demography and Vector-borne diseases. **Boca Raton: CRC Press**;1989.

TAO, D.; WU, J.I.; FENG, Y.; QIN, J.I.; HU, J.; GONG, J. New Method for the Analysis of Cell Cycle-Specific Apoptosis. **Cytometry Part A.** v. 57A, p. 70–74, 2004.

TAUIL, P.L. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, p. 3, 2006.

TIZARD, I.R. Imunologia Veterinária – Uma introdução. Edit. Roca; 8º ed. p. 204, 2009.

VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; BARTLETT, A. Enzyme-linked immunoasorbent assay, in: Rose N. & Friedman H. **Manual of Clinical Immunology.** ed **American Society for Microbiology**, South Carolina. V.932, p.359-371, 1980.

WELBURN, S.C.; MAUDLIN, I. Control of *Trypanosoma brucei* infections in tsetse, *Glossina morsitans*. **Med. Vet. Entomol.**, v.11, n.3, p. 286-9, 1997.

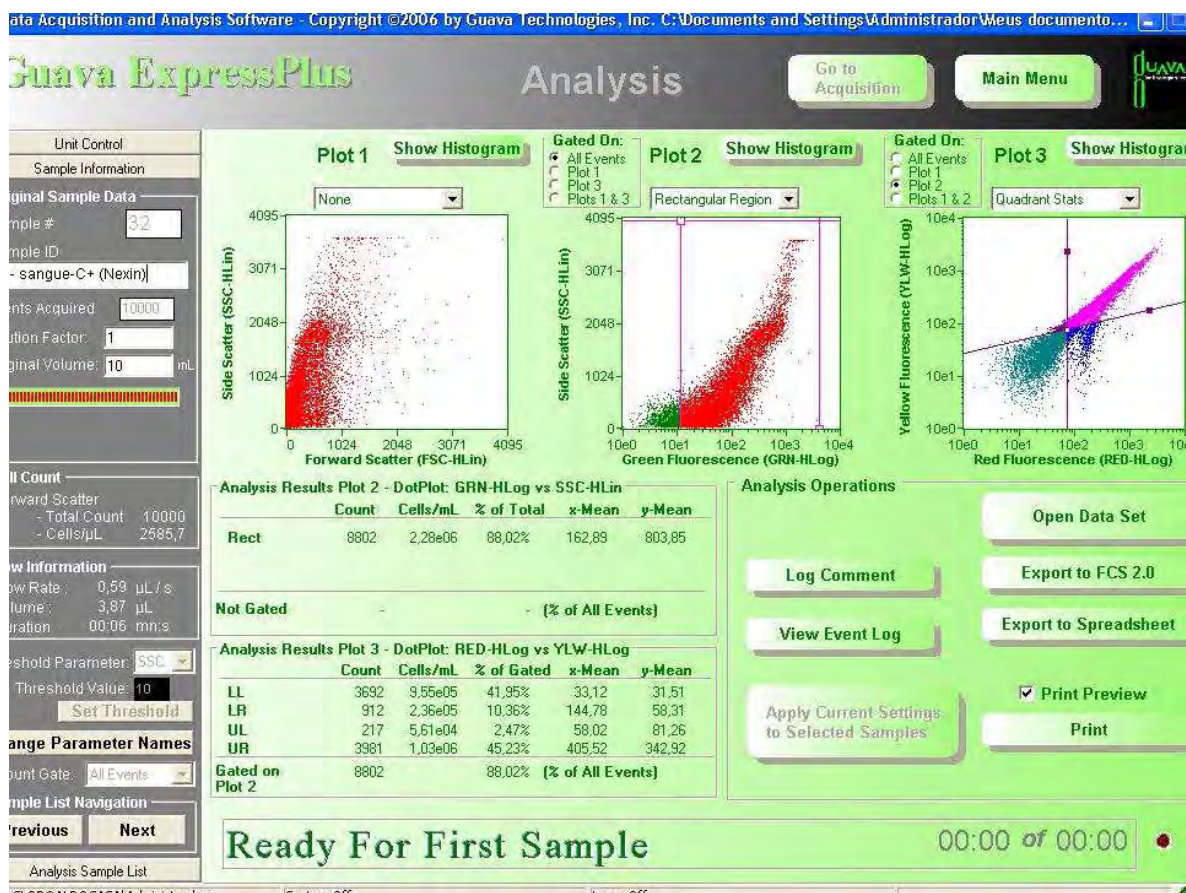
WOLDAY, D.; AKUFFO, H.; DEMISSIE, A.; BRITTON, S.; Role of *Leishmania donovani* and its lipophosphoglycan in CD4+ T-cell activation-induced human immunodeficiency virus replication. **Infect Immun.**, v. 67, p. 5258-64, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Magnitude of problem, 2006. Disponível em: <www.who.int/en/>. Acesso em: 09 Abr 2007.

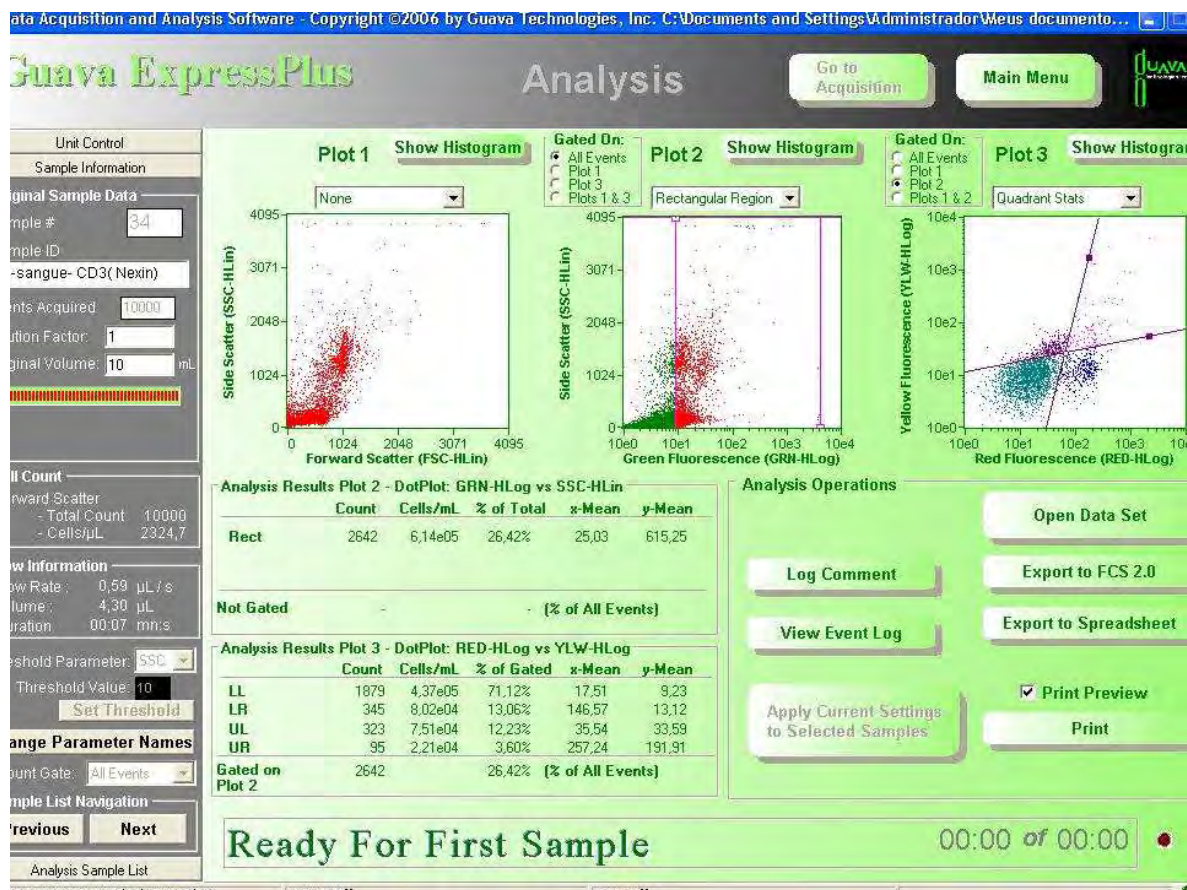
ANEXO

Exemplos de análises da apoptose de linfócitos T pelo Kit Guava Nexin[®] utilizando o software Express Plus[®] Guava.

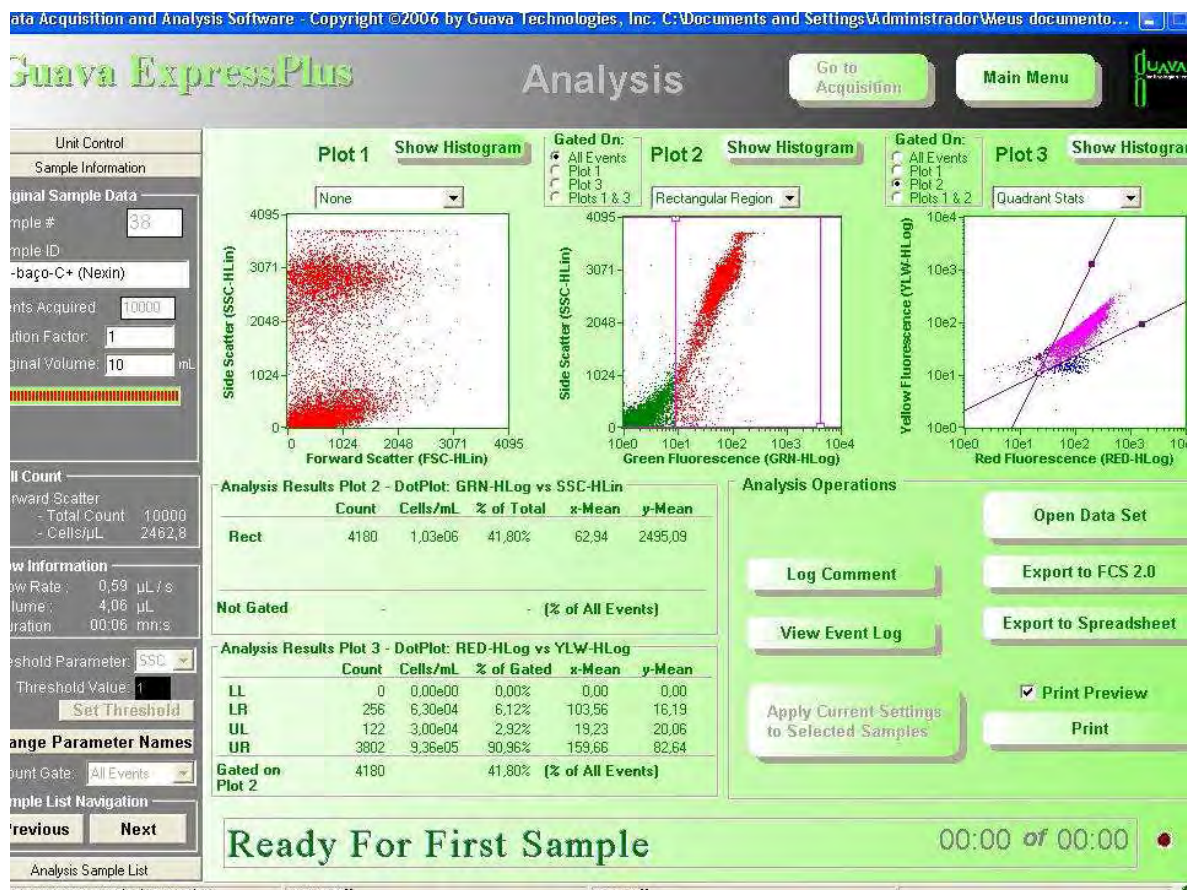
1. Animal C3: Contole+ (Sangue)



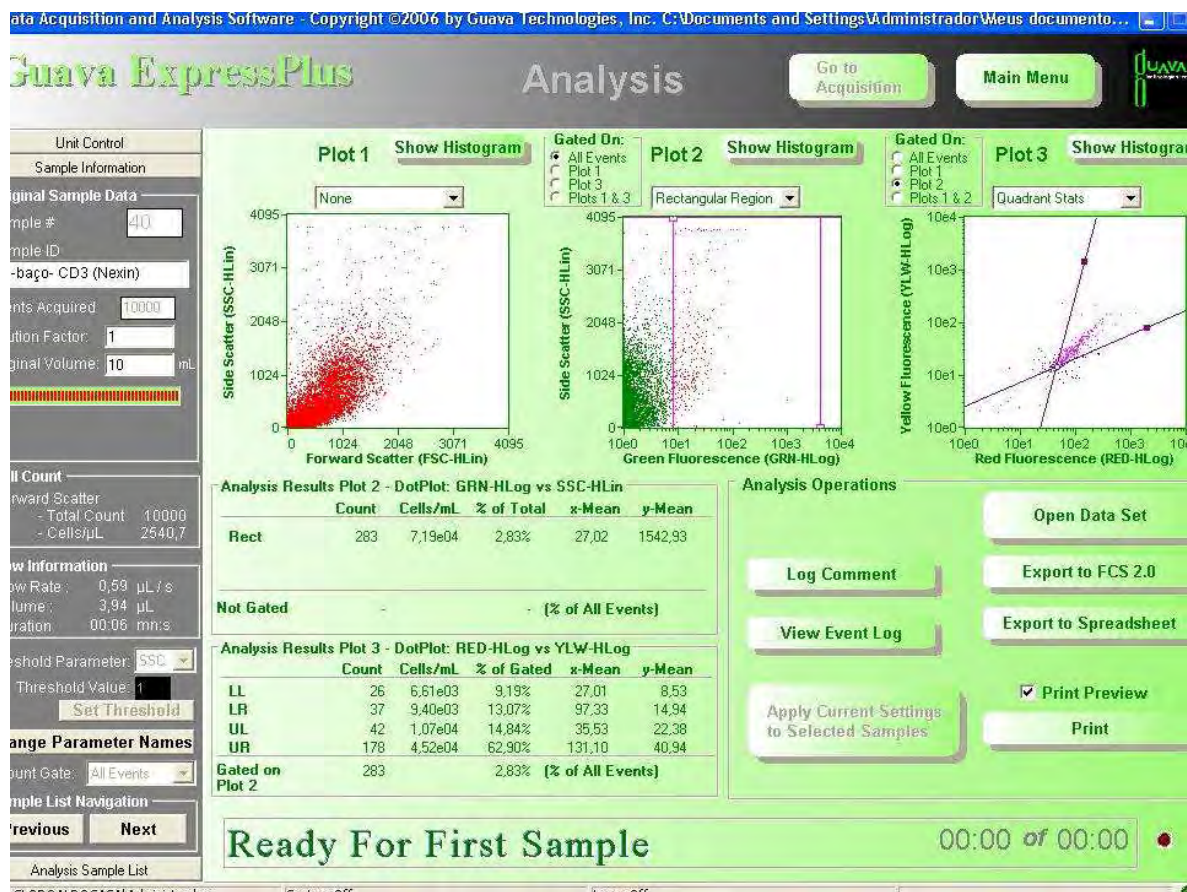
2. Animal C3: amostra (Sangue)



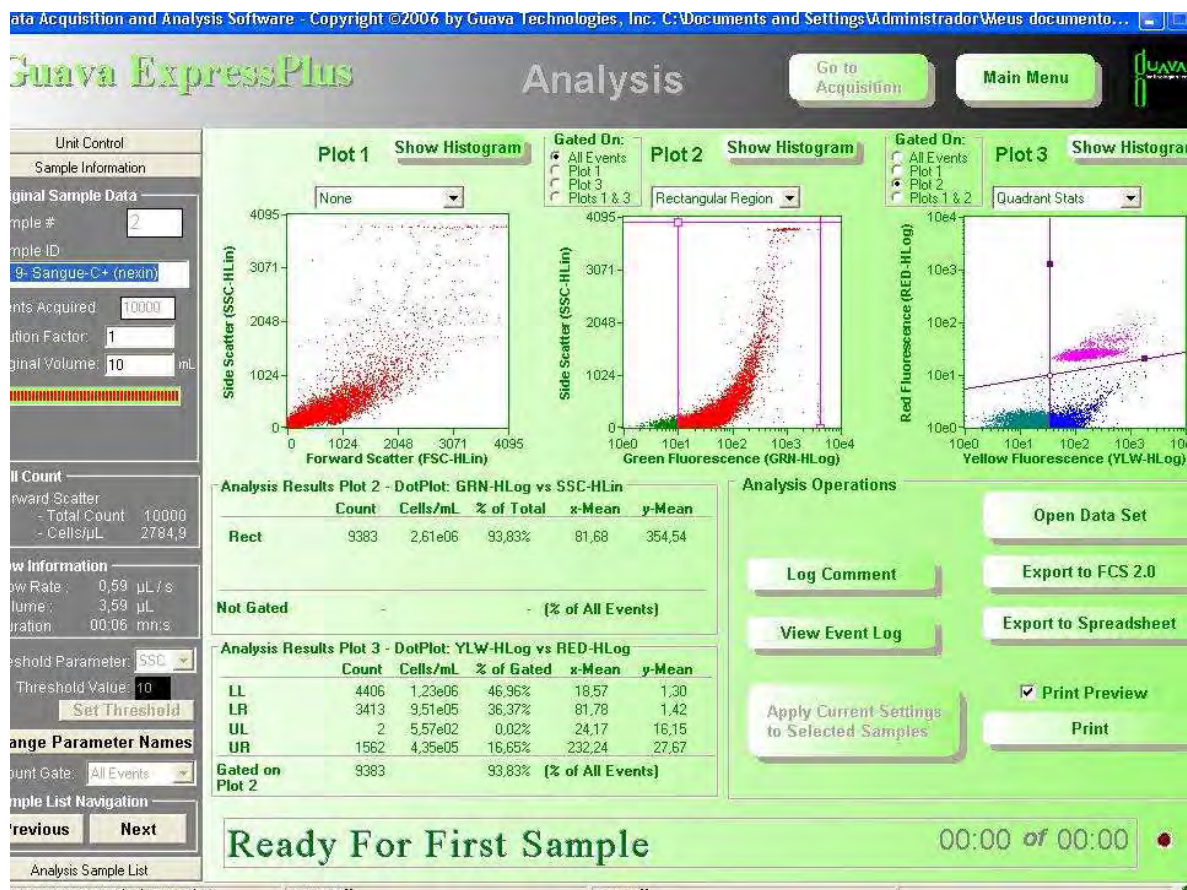
3. Animal C3: Controle+ (Baço)



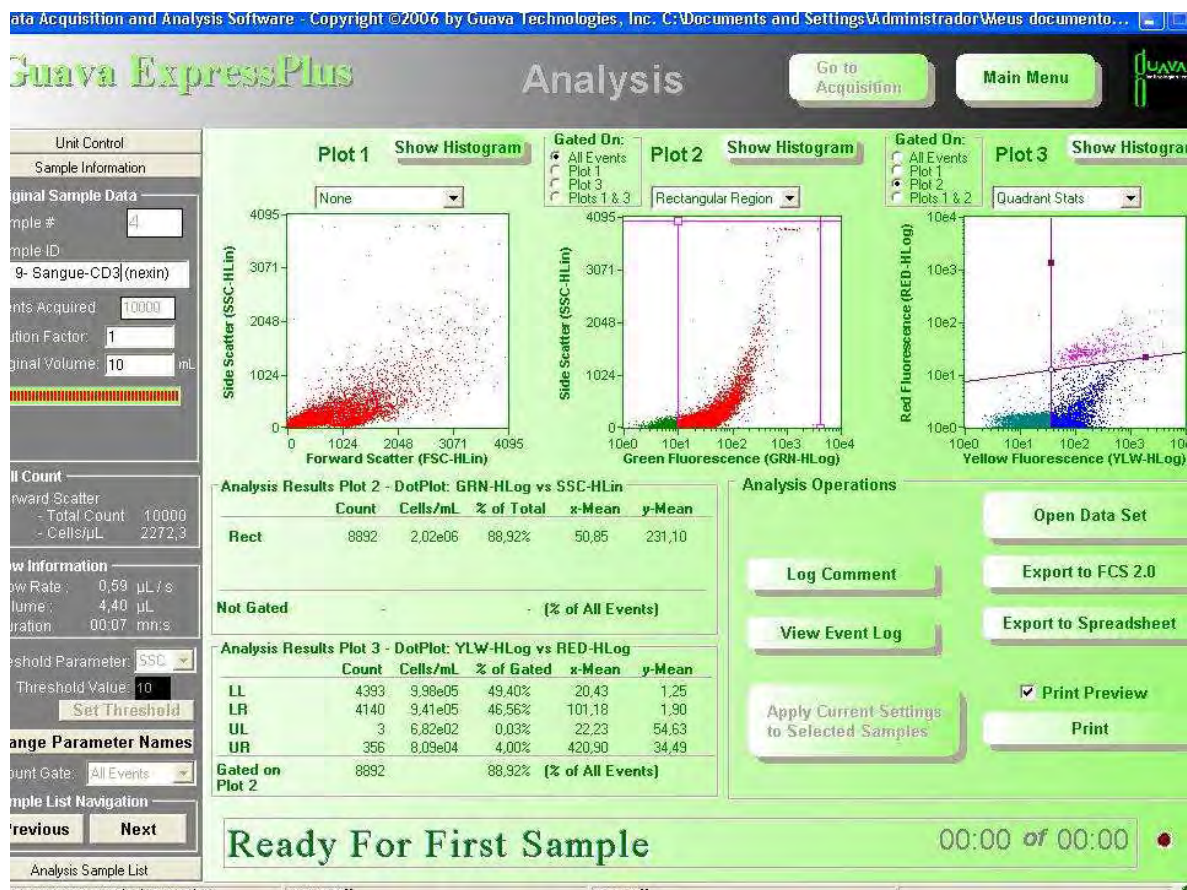
4. Animal C3: amostra (Baço)



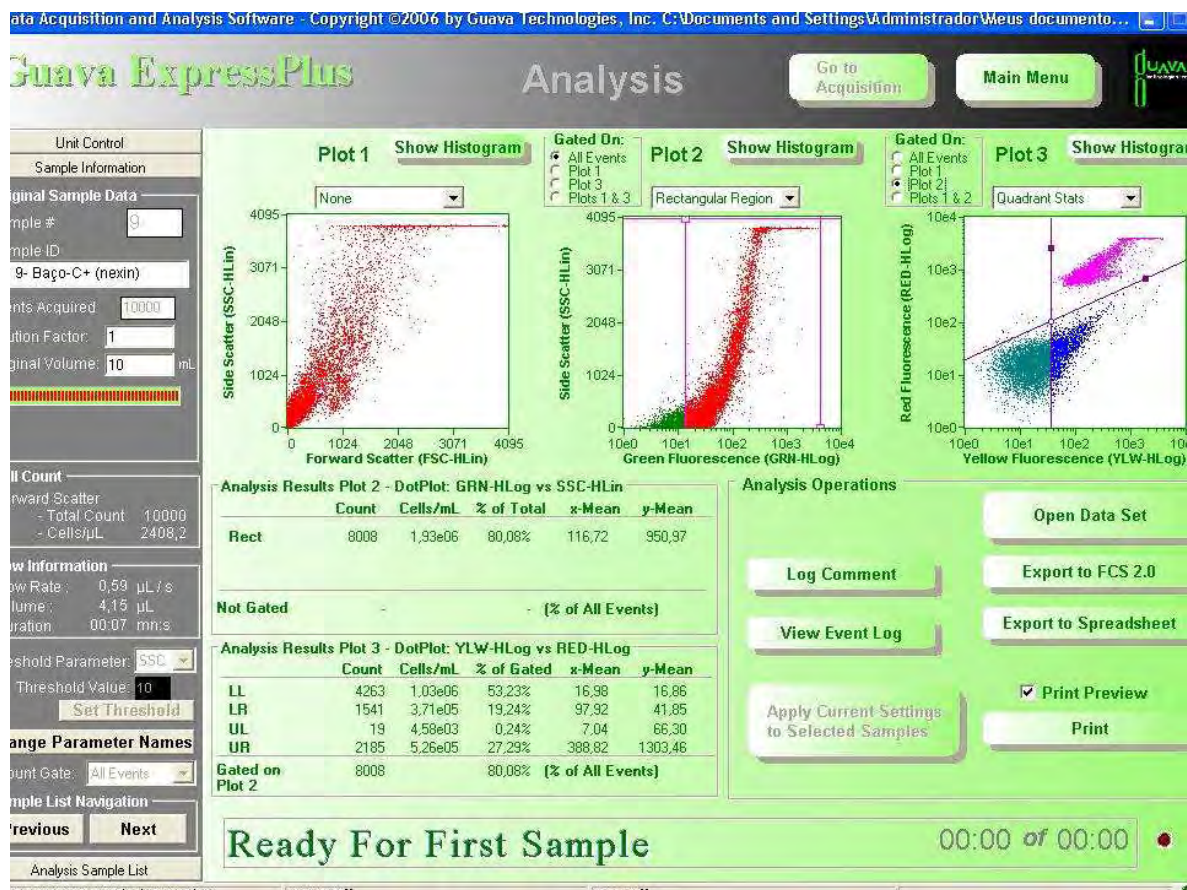
5. Animal Inf. 9: Controle+ (Sangue)



6. Animal Inf. 9: amostra (Sangue)



7. Animal Inf. 9: Controle+ (Baço)



8. Animal Inf. 9: amostra (Baço)

