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

EXPRESSÃO DAS QUIMIOCINAS MIP-1α E MCP-1 EM RELAÇÃO À CARGA PARASITÁRIA EM CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

Tatiane Aranha da Penha

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Setembro de 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

EXPRESSÃO DAS QUIMIOCINAS MIP-1α E MCP-1 EM RELAÇÃO À CARGA PARASITÁRIA EM CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

Tatiane Aranha da Penha

Orientadora: Profa. Ass. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos

Co-orientadora: Profa. Adjunto Valéria Marçal de Félix Lima

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Setembro de 2011

Penha, Tatiane Aranha da
P399e Expressão das quimiocinas MIP-1α e MCP-1 em relação à carga parasitária em cães com leishmaniose visceral / Tatiane Aranha da Penha. – – Jaboticabal, 2011
x, 53 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011
Orientador: Rosemeri de Oliveira Vasconcelos
Banca examinadora: Ana Lúcia Abreu Silva, Hélio Jose Montassier
Bibliografia

1. Quimiocinas. 2. *Leishmania chagasi*. 3. Cão. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619: 616.993.161:636.7

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

unesp **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EXPRESSÃO DAS QUIMIOCINAS MIP-1ALFA E MCP-1 EM RELAÇÃO À CARGA PARASITÁRIA EM CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

AUTORA: TATIANE ARANHA DA PENHA

ORIENTADORA: Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA , Área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS
Departamento de Patologia Veterinaria / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. ANA LÚCIA ABREU-SILVA
Centro de Ciencias Agrárias / Universidade Estadual do Maranhão / São Luís/MA

Prof. Dr. HELIO JOSE MONTASSIER
Departamento de Patologia Veterinaria / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 14 de setembro de 2011.

CONFIE SEMPRE

Não percas a tua fé entre as sombras do mundo.
Ainda que os teus pés estejam sangrando, segue para frente, erguendo-a por luz celeste, acima de ti mesmo.
Crê e trabalha.
Esforça-te no bem e espera Com paciência.
Tudo passa e tudo se renova na terra, mas o que vem do céu permanecerá.
De todos os infelizes os mais desditosos são os que perderam a confiança em Deus e em si mesmo, porque o maior infortúnio é sofrer a privação da fé e prosseguir vivendo.
Eleva, pois, o teu olhar e caminha.
Luta e serve.
Aprende e adianta-te.
Brilha a alvorada além da noite.
Hoje, é possível que a tempestade te amarfanhe o coração e te atormente o ideal, aguilhoando-te com a aflição ou ameaçando-te com a morte.
Não te esqueças, porém, de que amanhã será outro dia.

Chico Xavier

Dedico este trabalho ao grande amor da minha vida, minha avó, mãe e amiga,
Elizabeth Araújo Aranha.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço a minha co-orientadora e amiga Valéria Marçal Felix de Lima por toda a paciência, pelos ensinamentos, pela motivação e pelo otimismo durante a execução deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me proporcionar sempre saúde e força de vontade.

À minha orientadora, professora Rosemeri Vasconcelos pela oportunidade e dedicação durante a execução deste trabalho.

À Adriana Ibelli pelo desenho dos oligômeros iniciadores, os quais foram de essenciais para a realização desse trabalho.

A toda a equipe do Laboratório de Imunologia da FMVA/UNESP de Araçatuba e dos Laboratórios de Patologia e Parasitologia da FCAV/UNESP de Jaboticabal.

Às professoras Rita Seabra e Ana Lúcia Abreu Silva por terem me ensinado a dar os primeiros passos no mundo científico.

Às professoras Débora, Antonia, Maria do Socorro e Lúcia Alves por todo o auxílio dado enquanto estiveram em Jaboticabal.

À professora Rozângela Zacarias Machado pelo incentivo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos meus pais pelo amor incondicional, dedicação, apoio às minhas decisões e incentivo aos meus objetivos. Foi muito difícil ficar longe de vocês!

À minha avó por todo amor e por me colocar sempre em suas orações. Amo você incondicionalmente!

À minha irmã Fernanda Aranha e ao meu primo e irmão Flávio Júnior pelos momentos mais inesquecíveis da minha vida.

Às minhas madrinhas Christine Aranha e Rúbia Ribeiro pela amizade, amor e confiança.

Aos meus primos e filhos Thaís Aranha e Caio Adriel por todas as gargalhadas nos momentos que eu mais precisei.

Às amigas que estiveram presentes nas conquistas mais importantes da minha vida: Nayara Soares, Priscila Gomes, Andressa Borges, Jully Anny da Penha e Camyla Studer,

Às amigas Carolina Milhomem, Eudila Silva, Amanda Dias, Noelma Gonçalves e Camila Moura que me confortaram quando a saudade era inevitável:.

À Tiago Barbalho Lima, grande amigo, que está sempre ao meu lado haja o que houver.

Aos amigos Kaio Bezerra, Mayra Araguaia, Wilson Gomez, Diego Rodrigues pelas maravilhosas conversas nos momentos difíceis.

À Eduardo Beckman pela ajuda em um momento muito difícil da minha vida, pelo carinho e por cada minuto de diversão. És muito especial para mim!

Aos amigos que tornaram minhas férias divertidas nesses últimos 2 anos: Eduardo Gibran e Larissa Barbalho. Vocês são demais!!!

Aos amigos que conquistei em Jaboticabal: Tia Sonia, Andréa Belfort, Renata Fuverki, Juliana Bezerril, Guilherme Band, Felipe Silva, Thalita Ribeiro, Leonardo Leal, Nara Rodrigues, Carolina Bellodi, Jorge Filho, Caroline Aoki, Claudia Momo, Ana Paula Jachinto.

Às pessoas maravilhosas que conheci em Araçatuba e que tornaram os meus dias mais alegres, em especial, Khateleen Liezbeth, Daniele Silvano, Mariana Pereira, Simoni Vale, Aline Cardoso, Nair Almeida e Bianca Arnone.

Às minhas amigas e companheiras da República Mandacaru: Roberta Lomonte, Fabrícia Braga e Luciana Pontes. Muito obrigada pelos conselhos, pelas conversas e pelas piadas.

Aos demais familiares e amigos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

OBRIGADA!

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiii
SUMMARY	xv
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
CAPÍTULO 2 - EXPRESSÃO DAS QUIMIOCINAS MIP-1α E MCP-1 EM RELAÇÃO À CARGA PARASITÁRIA EM CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL	9
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1 Animais	13
2.2 Análise em microscopia de luz	14
2.3 Quantificação da carga parasitária e das quimiocinas MCP-1 e MIP-1α por qPCR	14
2.3.1 Extração de DNA e quantificação da carga parasitária	14
2.3.2 Extração de RNA e avaliação da expressão das quimiocinas MCP-1 e MIP-1α	15
2.4 Análise estatística	16
3 RESULTADOS	17
3.1 Animais	17
3.2 Análise histológica	17
3.3 Determinação da carga parasitária	22
3.4 Expressão das quimiocinas MCP-1 e MIP-1α	23
4. DISCUSSÃO	27
5. CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS	35
APÊNDICE 1	51
APÊNDICE 2	52

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Fotomicrografias do baço de cães com leishmaniose visceral. (A) Reatividade linfóide na polpa branca esplênica (*, grupo GSS). (B) Centro germinativo não reativo (*), metaplasia mielóide (setas, Obj. 40x) e no detalhe observa-se presença de macrófagos parasitados (seta, Grupo GCS, obj. 100x). Hematoxilina e Eosina.....	19
Figura 2	Fotomicrografias de baço de cães com leishmaniose visceral. (A) Distorção da arquitetura esplênica, devido a presença de reação granulomatosa difusa, que no detalhe corresponde a granuloma com raros linfócitos. (B) Outro cão mostrando o mesmo aspecto de A, com presença de septos de tecido fibroso entre a reação granulomatosa (detalhe). Hematoxilina e Eosina. Obj. 20x.....	20
Figura 3	Fotomicrografias de fígado de cães com leishmaniose visceral. (A) Notar a distribuição da reação inflamatória (*) nas regiões portal (seta), intralobular e controlobular. (B) Presença de granuloma adjacente a veia centrolobular (seta), rico em linfócitos (detalhe). Hematoxilina e Eosina. Obj. 40x.....	21
Figura 4	Curva-padrão para a quantificação de DNA de *Leishmania* spp.....	23
Figura 5	Quantificação da carga parasitária em baço (A) e fígado (B) de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi,* com (GCS) e sem sinais clínicos (GSS).....	25
Figura 6	Avaliação da expressão de MCP-1 no baço (A) e fígado (B) de cães de cães controle (GC) e naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, com (GCS) e sem sinais clínicos (GSS).....	26

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Intensidade de inflamação no fígado e baço de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*.....	22
Tabela 2	Mediana e Qui-Quadrado (x^2) obtidos para os parâmetros de expressão de MCP-1 (MCP) e carga parasitária (CP) no baço (b) e fígado (f) de cães com Leishmaniose Visceral.....	27

EXPRESSÃO DAS QUIMIOCINAS MIP-1α E MCP-1 EM RELAÇÃO À CARGA PARASITÁRIA EM CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO – A Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose de distribuição mundial. No Brasil foi descrita em várias regiões, mas na região sudeste vem ocorrendo de forma significativa desde 1998, na região de Araçatuba, SP. O cão é o principal reservatório doméstico do protozoário *Leishmania chagasi* e a principal fonte de contaminação para o homem. A resposta imune do hospedeiro canino frente ao parasito é variável e por este fato, os cães apresentam sinais clínicos acentuados ou ausência destes. Os animais que apresentam maior carga parasitária e sinais clínicos mais severos são considerados susceptíveis à infecção pelo parasito. Este padrão está associado ao perfil de citocinas produzidas, ou seja, na predominância de citocinas Th1 são resistentes ou Th2 susceptíveis. No entanto existem muitas variações neste padrão de resposta, ou seja, muitos animais apresentam a produção de citocinas Th1 e Th2, sugerindo um desequilíbrio na proporção de citocinas pró e antiinflamatórias, que favorecem a multiplicação e sobrevivência dos parasitos. Este desequilíbrio tem influência direta sobre a ativação de macrófagos e sobre sua capacidade microbicida e de apresentação antigênica, levando a uma anergia de linfócitos T e a manutenção e cronicidade da infecção. As quimiocinas são citocinas com potente atividade quimiotática sobre leucócitos. Na LV existem estudos no homem e em modelos experimentais, mas no cão apenas um estudo avalia o seu papel no baço. Existe muita controvérsia sobre o seu verdadeiro papel na LV, pois descreve-se tanto a sua ação pró-inflamatória quanto a sua ação deletéria, que favorece o parasito. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o papel das quimiocinas MIP-1α e MCP-1 no baço e fígado de 30 cães naturalmente infectados com *Leishmania* spp. e comparar este achados com a carga parasitária de cada órgão. Para isto amostras de fígado e baço foram submetidas à análise em microscopia de luz para a determinação das alterações morfológicas, bem como a técnica de qPCR, para a quantificação da carga parasitária e das quimiocinas. Os cães foram divididos nos grupos com sinais clínicos de LV (GCS), sem sinais clínicos de LV (GSS) e grupo controle

(GC) com cães sem a doença. O baço foi o órgão que apresentou a maior carga parasitária, a maior intensidade de inflamação, com formação de granulomas difusos e a maior expressão das quimiocinas MIP-1α e MCP-1, no grupo de cães GCS. No fígado as lesões foram discretas, os granulomas bem delimitados e ricos em linfócitos e a carga parasitária foi baixa no mesmo grupo. O grupo de cães GSS apresentou um número muito baixo de parasitos. Conclui-se, portanto que o baço é mais susceptível a infecção pelo parasito e que as quimiocinas produzidas neste órgão possivelmente não estão atuando de forma protetora. Avaliar o perfil de outras quimiocinas e citocinas presentes nestes dois compartimentos seria fundamental para entendermos os diferentes padrões de resposta destes cães.

Palavras-chave: resposta imune, quimiocinas, *Leishmania chagasi*, resposta compartimentalizada, cão.

EXPRESSION OF CHEMOKINES MIP-1α AND MCP-1 IN RELATION OF PARASITE LOAD IN DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS

SUMMARY - Visceral Leishmaniasis (VL) is a zoonosis of worldwide distribution. In Brazil has been described in several regions, but has been occurring in the Southeast significantly since 1998 in Araçatuba, SP. The dog is the main domestic reservoir of *Leishmania chagasi* and the main source of contamination for humans. The canine host immune response against the parasite is variable. Dogs have severe intensity or absence of clinical symptoms. Animals that have a higher parasite load and clinical signs are considered more susceptible to infection by the parasite. This pattern is associated with the profile of cytokines produced, in the predominance of Th1 they are resistant or in the predominance of Th2 they are susceptible. However there are many variations on this response pattern, many animals have the production of Th1 and Th2 cytokines, suggesting an imbalance in the proportion of pro and anti-inflammatory cytokines, which favor the multiplication and survival of parasites. This imbalance has a direct influence on the activation of macrophages and their microbicidal activity and antigen presentation, leading to anergy of T lymphocytes and the maintenance and chronicity of infection. Chemokines are cytokines with potent chemotactic activity on leukocytes. In the VL are studies in humans and experimental models, but the dog only one study assessing its role in the spleen. There is much controversy over its true role in VL, because it describes both its pro-inflammatory action and its deleterious effects, which favors the parasite. Therefore, the aim of this study was to evaluate the role of chemokines MIP-1α and MCP-1 in the spleen and liver of 30 dogs naturally infected with *Leishmania* spp. and compare the findings with the parasite load of each organ. For this purpose, samples of liver and spleen were analyzed under light microscopy for the determination of morphological changes, as well as the technique of qPCR for the quantification of parasite load and chemokines expression. The dogs were divided in groups with clinical signs of VL

(GCS), without clinical signs of VL (GSS) and the control group (CG) with dogs without the disease. In the GCS group of dogs, the spleen was the organ with the highest parasite load, the greater intensity of inflammation, with diffuse granuloma formation and increased expression of chemokines MIP-1α and MCP-1. In the liver, lesions were discrete and well defined granulomas rich in lymphocytes and parasite load was low in the same group. The GSS group of dogs showed a very low number of parasites. We conclude that the spleen is more susceptible to parasite infection and that chemokines produced in this organ is probably not acting protectively. Evaluate the profile of other chemokines and cytokines present in these two compartments would be essential to understanding the different patterns of response of these dogs.

Keywords: immune response, chemokines, *Leishmania chagasi*, response compartimentalized, dog.

CAPÍTULO I: CONSIDERAÇÕES GERAIS

A leishmaniose ainda é uma das doenças mais negligenciadas do mundo, afetando principalmente os países em desenvolvimento. Aproximadamente 350 milhões de pessoas estão em risco de contrair a doença e cerca de dois milhões de novos casos são relatados anualmente (WHO, 2010).

Na América Latina, a doença já foi descrita em 12 países e 90% dos casos são provenientes do Brasil. No Brasil já há registro de Leishmaniose Visceral (LV) em 19 das 27 Unidades da Federação, com aproximadamente 1600 municípios apresentando transmissão autóctone (BRASIL, 2006).

Mudanças no comportamento humano e desequilíbrio ambiental exercem forte impacto na prevalência e padrão da transmissão da doença (MISSAWA e DIAS 2007), caracterizando-a como uma enfermidade emergente em diferentes áreas urbanas brasileiras. Este fato pode explicar porque até duas décadas atrás a LV era considerada uma doença rural e, atualmente no Brasil, registra-se sua presença tanto em áreas rurais quanto urbanas (MENDES et al. 2002; RANGEL e VILELA, 2008).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são agentes que infectam eventualmente o homem nas regiões tropicais e subtropicais do Velho e Novo Mundo (REY, 2008).

A LV é uma zoonose causada pela infecção de fagócitos mononucleares pelo protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao complexo *Leishmania donovani*, denominado *L. chagasi/L. infantum*, os quais são considerados espécies singulares por apresentarem relações genotípicas estreitas (MAURICIO et al., 2000). A transmissão da LV ocorre pela picada de fêmeas de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*. No Brasil, duas espécies têm sido incriminadas neste ciclo de transmissão: *L. longipalpis* e *L. cruzi* (GALATI et al., 1997; SANTOS et al.,1998), entretanto, pesquisas recentes têm sugerido carrapatos e pulgas como potenciais vetores (FERREIRA et al., 2009; PAZ et al., 2010; DANTAS-TORRES et al., 2011). O cão doméstico é o principal reservatório, apesar de canídeos silvestres e mesmo alguns marsupiais terem sido diagnosticados com infecção natural (MELLO et al., 1988; GOMES et al., 2007; SANTIAGO et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2008; ROSYPAL et al., 2010; SOUZA et al., 2010).

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas de flebotomíneos ingerem a forma amastigota do protozoário, presente nos macrófagos do mamífero hospedeiro. No trato digestório do inseto vetor, o parasito se reproduz por divisão binária e diferencia-se na forma promastigota (flagelada). Ao realizar um novo repasto sanguíneo no hospedeiro, os flebotomíneos liberam o parasito, o qual é fagocitado pelos macrófagos e passa a forma amastigota (BRASIL, 2006).

Três medidas são preconizadas pelo programa brasileiro de controle de LV: detecção e tratamento de casos humanos, controle dos reservatórios domésticos e dos vetores. No entanto, os resultados não têm sido satisfatórios (BRASIL, 2006). Segundo Dantas-Torres e Brandão-Filho (2006), a prevalência da LV ainda é subestimada, visto que nos últimos 20 anos houve um aumento significativo da incidência da enfermidade no Brasil. Cerca de 3000 casos clínicos humanos da doença são notificados no país por ano, com mortalidade média entre 8 a 10% (GONTIJO e MELO, 2004).

A progressão da LV é muito variável entre os cães infectados. Alguns animais não apresentam sinais clínicos e outros apresentam um quadro clínico severo, que evolui para a morte (ALVAR et al., 2004). A infecção latente é típica nesses animais e pode durar toda a vida, o que contribui para a manutenção do parasito por longo prazo em regiões endêmicas (MANNA et al., 2006). Os cães infectados são classificados em três grupos, conforme a apresentação dos sinais clínicos: assintomáticos, oligossintomáticos (poucos sinais clínicos) e sintomáticos ou polissintomáticos (com mais de três sinais clínicos) (BRASIL, 2006).

A infecção usualmente causa doença sistêmica crônica. As manifestações clínicas da doença no cão e no homem são similares. Observam-se sinais inespecíficos, tais como, febre, anemia, perda progressiva de peso no estágio final, vômitos, poliúria e polidipsia (ASHFORD et al., 2000; FEITOSA et al., 2000; TAVARES et al., 2003; REIS et al., 2006). A linfadenopatia generalizada, hepatomegalia, esplenomegalia e a onicogrifose também são descritas. As alterações dermatológicas são bastante freqüentes (FEITOSA et al., 2000). A deposição de imunocomplexos nos rins pode resultar em glomerulonefrite proliferativa e nefrite intersticial, levando a um quadro de insuficiência renal. As leishmanias também se multiplicam em macrófagos do

fígado, produzindo uma hepatite crônica. Alguns animais apresentam diarréia e melena, devido à presença de úlceras gástricas e intestinais (ASHFORD et al., 2000; TAVARES et al., 2003; REIS et al., 2006).

No homem descreve-se que a ocorrência de hiperplasia do sistema fagocítico mononuclear, que segue a infecção por *L. chagasi*, afeta o baço, o fígado, a mucosa intestinal, a medula óssea, linfonodos e outros tecidos linfóides. No baço, há atrofia da polpa branca e infiltrado severo de plasmócitos. A vida útil de leucócitos e eritrócitos é reduzida, causando granulocitopenia e anemia. O fígado pode apresentar função normal ou alterada. Posteriormente, ocorre a diminuição da protrombina e juntamente com a trombocitopenia pode resultar em hemorragia severa das mucosas (WHO, 2010).

A leishmaniose pode ser considerada uma doença imunomediada, porque o parasita tem a capacidade de modificar o sistema imune do hospedeiro (BARBIERI, 2006), pois tem a habilidade de escapar da destruição extracelular e penetrar em fagócitos, onde resiste a sua atividade antimicrobiana, sobrevivendo e multiplicando-se dentro do citoplasma do macrófago (BOGDAN et al., 1996; CUNNINGHAM, 2002).

A infecção por *Leishmania* é dependente da capacidade do parasito, na forma promastigota, em se fixar especificamente no macrófago, para posteriormente ser fagocitado. Essa interação se dá principalmente pelo glicolipídeo lipofosfoglicano (LPG), presente na parede celular do parasito. O LPG tem a capacidade de inibir a fusão dos vacúolos parasitóforos com o sistema endossomal dos macrófagos, rico em enzimas hidrolases lisossômicas. Este fato permite a sobrevivência das formas promastigotas e sua transformação em amastigotas dentro dos macrófagos. O LPG também pode inibir a produção de óxido nítrico nesta célula (ALEXANDER et al., 1999). Em cães susceptíveis a LV, a produção de inibidores do gene indutor de iNOS está relacionada a redução no controle da multiplicação do parasito em macrófagos. Estas células também apresentam redução da habilidade fagocítica, quando comparadas as de animais saudáveis (MACHADO et al., 2007).

A presença de lesões sistêmicas em cães com LV está diretamente relacionada com a resposta imune do hospedeiro e a evolução da doença. Cães susceptíveis possuem lesões mais exuberantes e isso se deve a capacidade de desenvolver

resposta de linfócitos T helper tipo 2 (Th2), com proliferação de células B e produção das interleucinas IL-4, IL-6 e IL-10. Esta resposta humoral leva a hipergamaglobulinemia, que não é imunoprotetora e contribui para a formação de imunocomplexos, principalmente no rim. A resistência para LV está associada com a ativação de linfócitos Th1 e produção das citocinas INF-y, IL-2 e TNF-α. O principal mecanismo efetor envolvido na resposta imune protetora de cães é a ativação de macrófagos por INF-γ e TNF-α, para destruir as formas amastigotas intracelulares (BARBIERI, 2006). Os macrófagos, as células dendríticas, os linfócitos e as citocinas (INF-y, IL-12, TNF-α) são cruciais para a resolução de infecções, com todas as espécies de *Leishmania* e para uma longa imunidade protetora (BOGDAN e ROLLINGHOFF, 1998).

A manifestação da doença requer mecanismos que permitam a replicação do parasito no hospedeiro. Entre eles, evitar a lise direta, por meio de glicoproteínas e açúcares da membrana do parasito (LPG e metaloproteinase gp63), que inativam componentes do sistema complemento (C3, C5 e C9) e inibem as vias clássica e alternativa. Desta forma, não ocorre o acesso do complexo de ataque à membrana (C5b-C9). A gp63 protege o parasito, por meio da acelerada conversão proteolítica na superfície do parasito, do C3b para C3bi, que funciona como uma opsonina, facilitando a ligação do parasito com os receptores do complemento tipo 3 (CR3) nos macrófagos (BOGDAN et al., 1996; BOGDAN e ROLLINGHOFF, 1998). Ao escaparem do meio extracelular, os parasitos irão penetrar nos macrófagos, via interação dos receptores dos macrófagos com moléculas da superfície do parasito (SACKS e SHER, 2002).

A *Leishmania* utiliza outros mecanismos que auxiliam nas estratégias de escape da defesa do hospedeiro, tais como: a modulação da produção de citocinas, por meio da inibição/desativação de macrófagos, pela supressão ou ausência da produção de citocinas, bem como, da inibição da apresentação de antígenos e da estimulação de células T. A ineficiente apresentação de antígenos se dá pela supressão, internalização e degradação de moléculas de MHC classe II (LEÃO et al., 1995; BOGDAN e ROLLINGHOFF, 1998; CUNNINGHAM, 2002). Alguns estudos têm mostrado que *L. donovani* inibe a apresentação de antígenos, por meio da inibição da expressão de

genes de MHC classe II (REINER et al.,1987). Por outro lado, macrófagos infectados com *L. amazonensis* expressaram níveis normais de MHC classe II (LANG et al., 1994), mostrando um comportamento diferenciado entre as diferentes espécies de *Leishmania.*

Cães sintomáticos apresentam alterações no perfil imunológico envolvendo células T, com ausência de hipersensibilidade do tipo tardia, diminuição de células mononucleares no sangue periférico e ausência de produção de INF-γ, TNF-α e IL-12 pelas células mononucleares do sangue periférico (LUNA et al., 1999; SOLANO-GALLEGO et al. 2000; SANTOS-GOMES et al., 2002; BARBIÉRI, 2006). A ativação de macrófagos por citocinas derivadas de linfócitos T CD4+ (Th1) leva a resistência à infecção, pela produção de INF-γ, TNF-α e IL-12 (PINELLI et al., 1994; PINELLI et al., 1995) ou a susceptibilidade quando predominam citocinas Th2, produzidas por linfócitos T CD4 ativados por *L. (L.) chagasi.* Neste caso ocorre a sobrevivência do parasito e a exacerbação das lesões, em razão das ações supressivas das citocinas TGF-β, IL-10 e IL-4, sobre os macrófagos (BARBIÉRI, 2006; CORRÊA et al., 2007; ALVES et al., 2009).

Os cães sintomáticos apresentam diminuição de linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) e diminuição de linfócitos B ($CD21^+$) e monócitos ($CD14^+$) (REIS et al., 2010). No fígado, as células TCD4+ têm importância no controle do crescimento do parasito na infecção aguda, enquanto que as células TCD8+ são responsáveis por impedir a reinfecção (STANLEY e ENGWERDA, 2007).

No fígado de pessoas infectadas por *L. donovani*, o desenvolvimento de resposta imune celular associada à formação de granulomas, auxilia a eliminação do parasito e promove a resistência a reinfecção. No baço há falha na formação de granulomas associada ao rompimento da microarquitetura do tecido linfóide, levando a infecção persistente (SMELT et al., 1997; ENGWERDA et al., 2002).

No baço de cães infectados por *L. infantum* há infiltrado de células mononucleraes na polpa vermelha e a substituição de linfócitos por macrófagos na polpa branca (REIS et al., 2010). Nos animais em que o parasitismo é elevado, há acúmulo da citocina IL-10, associada à produção de TNF-α, contribuindo para o estabelecimento da infecção (REIS et al., 2009).

O fígado de cães sintomáticos apresenta maior parasitismo que os cães assintomáticos. Este parasitismo está associado a uma intensa reação inflamatória (REIS et al., 2009).

As quimiocinas são um grupo de citocinas pertencente a uma superfamília de proteínas pequenas (8 a 10 kD) e algumas delas têm influenciado o padrão de resposta Th1 e Th2 de animais com LV. Além disso, constituem um grupo numeroso de citocinas e atuam primariamente na ativação e quimiotaxia de leucócitos, possuindo semelhanças em suas seqüências de aminoácidos. São classificadas em quatro classes principais (famílias), que têm atividades biológicas relativamente distintas, de acordo com o arranjo dos resíduos de cisteína em sua estrutura molecular (MARTINÉZ e PANDO, 1999; COTRAN, et al. 2000; MATSUKAWA et al., 2000; VASQUEZ et al., 2008).

Cerca de 50 quimiocinas expressas em vários tipos celulares foram identificadas no homem. Elas estão subdivididas em subfamílias: CXC (ação sobre neutrófilos) e CC (ação sobre monócitos, eosinófilos, linfócitos) e duas outras classes menos caracterizadas têm sido descritas, as famílias C e as CX3C. Uma das atividades biológicas destas quimiocinas é a ativação de leucócitos para mecanismos antimicrobianos, que está relacionada com as distinções estruturais das mesmas (ABBAS et al., 2008). Por exemplo, IL-8 (CXC) age predominantemente ativando e/ou recrutando neutrófilos e, MCP-1 (CC) atrai predominantemente linfócitos e monócitos (ABBAS et al., 2008; PINCHART et al., 2001).

A ativação de leucócitos nos linfonodos é essencial para promover a resposta do hospedeiro frente à infecção. As quimiocinas MCP-1, IP-10 e Ltn foram descritas como quimioatraentes e ativadoras de células natural “killer” em camundongos resistentes infectados por *L. major* (VESTER et al., 1999).

RANTES, MIP 1-α, INF-γ e TNF-α estão envolvidas na atividade leishmanicida mediada pelas células T CD8+ em camundongos BALB/c infectados por *L. infantum*. Nestes camundongos foi demonstrado que populações de linfócitos T CD8+ estimulam a produção de RANTES e MIP-1α (TSAGOZIS et al., 2003). Estas moléculas também

são responsáveis pela formação e manutenção de granulomas, por meio da interação com TNF-α (MACKAY, 2001).

A maioria dos estudos experimentais com *Leishmania* spp. requer a determinação da carga parasitária em diferentes tecidos. A técnica de PCR em tempo real (qPCR) tem demonstrado maior sensibilidade do que as demais estudadas (ROLÃO et al., 2004; CAVALCANTI et al., 2009). Esta técnica foi mais sensível quando comparada ao PCR-ELISA em baço e fígado de cães infectados por *L. infantum*, detectando um único parasita e permitindo a quantificação ampla (ROLÃO et al., 2004). A PCR em tempo real oferece uma abordagem viável para acompanhar o tempo de infecção da *Leishmania* spp., assim como, quantificar a parasitemia e tropismo tissular (SVODOVÁ et al., 2003; FRANCINO et al, 2006). Teixeira-Neto et al. (2010) avaliaram cães naturalmente infectados por *L*. *chagasi* e observaram que a maioria dos cães assintomáticos apresentava baixo parasitismo, tanto na pele quanto no baço, em relação aos cães sintomáticos.

Em cães com leishmaniose, a densidade parasitária na medula óssea, sangue, pele e urina foi correlacionada com a severidade dos sinais clínicos de LV (MANNA et al., 2006; SOLANO-GALLEGO, 2007).

O cão tem um importante papel no ciclo de transmissão da *Leishmania* spp. para o homem, mas sua eliminação ainda é uma medida paliativa, visto que é adotada de forma isolada e que o número de casos humanos e caninos vem aumentando anualmente. Os aspectos imunológicos desse hospedeiro frente ao parasito ainda não são bem conhecidos. Na literatura científica ainda não foram estabelecidos claramente marcadores de resistência e susceptibilidade para estes animais. Sabe-se que existe um desequilíbrio entre as respostas imunes com linfócitos T com perfil de citocinas do tipo Th1 e Th2. Este desequilíbrio é benéfico para o parasito. Estudos recentes descrevem esta resposta em diferentes órgãos e denominam-a em compartimentalizada, ou seja, alguns órgãos são susceptíveis e outros resistentes a multiplicação do protozoário. Este é o caso do baço e do fígado, que são órgãos freqüentemente citados na literatura como susceptível e resistente, respectivamente. Quanto ao papel das quimiocinas na resposta imune dos cães, ainda existem escassos

relatos a respeito do envolvimento destas em cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. Os estudos que existem no homem e nos modelos experimentais mostram resultados contraditórios quanto ao papel protetor ou prejudicial das quimiocinas no hospedeiro. Não está claro se elas têm ação pró-inflamatória ou se o parasito poderia utilizá-las a seu favor, para multiplicar-se e sobreviver no organismo do hospedeiro. Portanto, o estudo dessas moléculas poderia contribuir para o entendimento da complexa patogenia da LV, bem como, permitir o estudo de novos métodos terapêuticos ou o uso de vacinas eficazes.

Portanto, estudar o papel das quimiocinas MIP-1α e MCP-1 em cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi* e comparar a sua expressão com a carga parasitária nos compartimentos hepático e esplênico seria essencial para entendermos a compartimentalização da resposta imune nestes órgãos e determinarmos um possível perfil de resistência ou susceptibilidade destes órgãos no cão.

CAPÍTULO 2 – EXPRESSÃO DAS QUIMIOCINAS MIP-1α E MCP-1 EM RELAÇÃO À CARGA PARASITÁRIA EM CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

EXPRESSION OF CHEMOKINES MIP-1α AND MCP-1 IN RELATION TO THE PARASITE LOAD IN DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS

Resumo – As quimiocinas são potentes substâncias quimiotáticas. Na Leishmaniose Visceral (LV), elas têm um papel pró-inflamatório importante no controle da proliferação do parasito. No cão existem escassos relatos sobre o papel destas citocinas especializadas na LV. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o papel das quimiocinas MIP-1α (CCL3) e MCP-1 (CCL2) no fígado e baço de cães com LV e comparar estes resultados com a densidade de parasitos em cada tecido. Amostras destes órgãos foram analisadas em microscopia de luz e submetidas à técnica de qPCR para a quantificação da carga parasitária e da expressão das quimiocinas. Os cães com LV (n=30), oriundos de Araçatuba (SP), foram divididos nos grupos com sinais clínicos (n=21 / GCS) e sem sinais clínicos (n=9 / GSS). Um grupo controle foi formado por cães de área não endêmica (n=05 / GC). No baço, a reação inflamatória foi mais intensa que no fígado, caracterizada pela formação de granulomas pobremente delimitados, com elevado parasitismo, predominantes na polpa vermelha. Não foram observadas diferenças significativas para o perfil celular predominante de macrófagos, linfócitos e plasmócitos nos grupos de cães infectados (P>0,05). Nos casos mais graves havia depleção linfóide na polpa branca (GCS). No fígado o processo inflamatório foi discreto e ocorreu nas regiões portal, centrolobular e intralobular. As células predominantes foram macrófagos e plasmócitos. Os linfócitos estavam associados aos granulomas. Tanto no grupo GCS quanto no GSS, o baço esteve mais parasitado que o fígado (P<0,05). Para a expressão de MCP-1 verificou-se que as diferenças ocorreram somente entre os grupos GCS e GC (P<0,05), tanto no baço quanto no fígado. A maior expressão foi observada no baço. Para MIP-1α, não foram observadas diferenças na sua expressão tanto no baço quanto no fígado. O baço é mais susceptível

a infecção por *Leishmania chagasi*, pela elevada carga parasitária. As quimiocinas MCP-1 e MIP-1α não foram capazes de conter a multiplicação do parasito.

Palavras-chave: quimiocinas pró-inflamatórias, *Leishmania chagasi*, inflamação, resposta imune hepática e esplênica.

Abstract – Chemokines are potent chemotactic substances. In Visceral Leishmaniasis (VL), they have an important proinflammatory role in controlling the proliferation of the parasite. In the dog there are few reports on the specialized role of these cytokines in LV. Therefore, the aim of this study was to evaluate the role of chemokines MIP-1α (CCL3) and MCP-1 (CCL2) in the liver and spleen of dogs with VL and compare these results with the density of parasites in each tissue. Samples of these organs were examined under light microscopy and subjected to qPCR technique for the quantification of parasite load and chemokines's expression. Dogs with VL (n = 30), from Araçatuba, were divided in groups with clinical signs (n = 21 / GCS) and without clinical signs (n = 9 / GSS). A control group was comprised of dogs from non endemic area (n = 05 / CG). In the spleen, the inflammatory reaction was more intense than in the liver, characterized by the formation of granulomas poorly defined, with high parasitism, predominant in splenic red pulp. No significant differences were observed for the predominant cellular profile of macrophages, lymphocytes or plasma cells in groups of infected dogs (P> 0.05). The lymphoid depletion was observed in more severe cases (GCS). In the liver, the inflammation was discrete and occurred in portal, intralobular and centrilobular regions. The predominant cells were macrophages and plasma cells. The lymphocytes were associated with granulomas. Both in the GCS and GSS groups, the spleen was the most parasitized than liver (P <0.05). The expression of MCP-1 showed that differences occurred only between the GCS and CG groups (P <0.05), in both the spleen and liver. The greatest expression was observed in the spleen. The expression of MIP-1α no showed significant differences in both the spleen and liver. The spleen is more susceptible to infection with *Leishmania chagasi*, due to high parasite load. The

chemokines MCP-1 and MIP-1 α were not able to contain the multiplication of the parasite.

Key words: proinflammatory chemokines, *Leishmania chagasi*, inflammation, hepatic and splenic immune response.

1. Introdução

As quimiocinas regulam a resposta imune inata e adaptativa, por coordenarem o tráfego de leucócitos e a diferenciação de células do sistema imune. Como resultado, elas e seus receptores atuam no desenvolvimento da imunidade contra muitos patógenos (CONRAD et al., 2007).

MIP-1α (CCL3), assim como outras quimiocinas pertencentes à família MIP-1, induzem respostas inflamatórias agudas e crônicas no local de injúria, pelo estímulo a produção de citocinas pró-inflamatórias. Elas são cruciais para a quimiotaxia de células T da circulação para o tecido inflamado e, também participam da regulação da migração transendotelial de monócitos, células dendríticas e células natural “killer” (MAURER, 2004).

MCP-1 (CCL2) é uma quimiocina CC conhecida por atrair e/ou ativar monócitos, células dendríticas, células natural “killer”, basófilos e linfócitos T. Ela exerce um efeito quimioatraente sobre populações de linfócitos T $CD4^+$ com perfil Th1 e Th2. MCP-1, em altas concentrações, pode ativar mecanismos que eliminam espécies de *Leishmania* em macrófagos, pela indução de reativos intermediários do oxigênio ou via a produção de óxido nítrico, pelo macrófago ativado. Este aspecto foi descrito em camundongos resistentes à infecção por *L. major,* que tornaram-se susceptíveis quando perderam o receptor CCR2 de MCP-1 (CONRAD, et al., 2007).

Quimiocinas CC impedem a sobrevivência intracelular de *L. donovani,* devido aos mecanismos de ativação e produção de óxido nítrico. A utilização destas quimiocinas como método terapêutico poderia ter uma aplicação eficiente no tratamento de pacientes imunocompetentes e/ou imunocomprometidos com LV. MIP-1α e MCP-1

orquestram um arsenal leishmanicida, via regulação de óxido nítrico, para controlar o crescimento intracelular e multiplicação do protozoário (BHATTACHARYYA et al., 2002). Brandonisio et al. (2002) estudaram o efeito das quimiocinas MCP-1 e MIP-1α na liberação de óxido nítrico e na capacidade de eliminação parasitária em macrófagos humanos infectados por *L. infantum* e sugeriram que estas moléculas estão envolvidas na contenção da infecção por *Leishmania*.

Dey et al. (2007) analisaram as quimiocinas MIP-1α e MCP-1 na indução da resposta imune Th1 e na supressão da resposta Th2, em camundongos infectados por *L. donovani* e propuseram um efeito promissor da imunoprofilaxia por estas quimiocinas contra a infecção pelo protozoário *Leishmania*.

Na infecção por *L. donovani* em camundongos *knockout* para CCR5 e MIP-1α, observaram-se crescentes níveis de INF-γ antígeno-específico, acompanhados de baixa carga parasitária no baço e fígado. Os autores sugeriram que a produção de MIP-1α teria um efeito deletério, pois tornaria o hospedeiro susceptível à infecção por *L. donovani* (SATO et al., 1999).

Steigerwald e Moll (2005) estudaram o perfil de quimiocinas e receptores expressos por células dendríticas em camundongos infectados por *L. major* e observaram que a expressão de CCR2 e CCR5 e sua adequação aos respectivos ligantes, MCP-1e MIP-1α foram reprimidas.

Em camundongos imunocompetentes, infectados por *L. donovani,* foi observada inflamação hepática crônica, com a formação de granulomas. A infecção induziu o acúmulo hepático de mRNA de MIP- 1α, MCP-1 e IP-10 (COTTERELL et al., 1999).

Strauss-Ayali et al. (2007) estudaram a resposta imune esplênica de cães com LV e observaram que a resposta imune Th1 foi dominante. A expressão elevada de várias quimiocinas como RANTES, IP-10, MIP-1α e MCP-1, teve papel na ativação de células T, na diferenciação e no recrutamento de leucócitos. Este foi o único artigo encontrado na literatura que avalia o papel das quimiocinas em cães.

Vários estudos têm se dedicado ao esclarecimento de fatores responsáveis pela resistência ou susceptibilidade de cães à infecção por *L. chagasi*. O baço está associado a um maior parasitismo em relação ao fígado. O fígado é considerado um

órgão resistente à infecção. A carga parasitária em diferentes tecidos está associada a uma deficiente resposta imunológica e a progressão clínica da doença. Portanto, os objetivos deste estudo foram comparar a expressão das quimiocinas MIP-1α (CCL3) e MCP-1 (CCL2) com a carga parasitária do baço e fígado de cães com e sem sinais clínicos de LV, para determinar o tipo de resposta de cada órgão.

2. Material e Métodos

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA, Protocolo nº. 020372/09), FCAV – UNESP do Campus de Jaboticabal.

2.1 Animais

Foram selecionados 30 cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba (SP), com diagnóstico positivo para LV, por meio do teste ELISA. Os animais foram submetidos à eutanásia, por meio de anestesia barbitúrica (Tiopental, Cristália Itapira, SP), seguida da injeção intravenosa de cloreto de potássio a 19,1%, em cumprimento ao Decreto no. 51.838 do Ministério da Saúde do Brasil, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores de leishmaniose visceral devem ser submetidos à eutanásia. O método de eutanásia empregado segue as recomendações da Resolução n°. 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

A necropsia foi realizada imediatamente após o óbito dos cães e no exame externo dos cadáveres foram avaliadas as alterações macroscópicas que permitiram classificá-los nos grupos sem sinais clínicos (GSS) e com sinais clínicos de LV (GCS).

Um total de cinco animais livres de doenças infecciosas, provenientes da rotina de necropsias do Departamento de Patologia Veterinária (FCAV-UNESP, Campus de Jaboticabal, SP), área não-endêmica para LV, foram selecionados como grupo controle (GC).

2.2 Análise em microscopia de luz

Os órgãos colhidos na necropsia foram submetidos à análise histológica no Laboratório de Imunopatologia, FCAV-UNESP, Campus de Jaboticabal, SP. Os fragmentos de fígado e baço foram fixados em solução de formol a 10%, tamponada com fosfatos (pH 7,2), incluídos em parafina, cortados em micrótomo na espessura de 5µm e corados com Hematoxilina e Eosina, para a análise das alterações morfológicas. Estes órgãos foram avaliados de acordo com o padrão e intensidade da resposta inflamatória. Esta avaliação foi feita por escores: discreta (1); moderada (2) ou acentuada (3), bem como foram avaliados os tipos celulares predominantes no infiltrado inflamatório esplênico e hepático (plasmócitos, macrófagos, linfócitos).

2.3 Quantificação da carga parasitária e das quimiocinas MCP-1 e MIP-1α por qPCR

A análise molecular foi realizada no Laboratório de Imunologia, da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA-UNESP, Campus de Araçatuba, SP).

Fragmentos de cerca de 25mg do baço e do fígado foram colhidos de forma asséptica, acondicionados em tubos de microcentrifuga de 1,5mL contendo solução comercial que preserva o RNA (RNAlater, RNA stabilization reagent, Qiagen, cód. 76104) e acondicionados imediatamente em freezer a -80ºC. Estes fragmentos foram processados para extração do DNA, para a determinação da carga parasitária e para a extração do RNA total, para avaliação da expressão do mRNA das quimiocinas de interesse.

2.3.1 Extração de DNA e quantificação da carga parasitária

Na extração do DNA utilizou-se um kit comercial (DNeasy mini kit, QIAGEN, cód. 69581), segundo recomendações do fabricante (APÊNDICE 1).

Para quantificação da carga parasitária foram utilizados os oligômeros iniciadores 13A: 5'TAGGGGCGTTCTGCGAA3' e 13B 5' ATTTTACACCAACCCCCAGTT3' (RODGERS et al., 1990), que amplificam um fragmento de 120 pares de base do minicírculo do cinetoplasto do gênero *Leishmania* spp, em uma concentração de 10pmol.

Uma curva de diluição seriada de DNA de *Leishmania* spp. foi usada para avaliação do limite de detecção do ensaio. Cada ponto da diluição foi feito em duplicata. Um teste de especificidade foi avaliado usando da amostra de DNA de isolados de *Leishmania* spp., provenientes da cultura do parasito padronizada no laboratório de Imunologia (FMVA/UNESP), nos meios de cultura Schneider e Bifásico. A especificidade (σ) foi definida pela equação $\sigma=(1+\varepsilon)^{\Delta Ct}$, onde a eficiência de amplificação (ε) foi definida como: $\varepsilon = [10^{(-1/slope)}] - 1]$.

A reação de PCR em tempo real foi realizada usando o equipamento Realplex^2 (Eppendorf). O volume final da reação foi 12µl, considerando 2µl de DNA, 10pmol de cada oligômero iniciador e 6,25µl de Quantifast SYBR green (Kit Quantifast SYBR green, QIAGEN, cód. 204054). A reação foi realizada com um passo inicial de desnaturação em 95ºC por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificação (95ºC por 30 segundos, 63ºC e 72ºC por 30 segundos) e extensão 72ºC por 5 minutos, com temperatura de *melting* de 83ºC (QUINTAL et al., 2011).

2.3.2 Extração de RNA e avaliação da expressão das quimiocinas

A extração de RNA total e obtenção de cDNA foi realizada através de kits comerciais (RNeasy mini kit, cód.74104 e Quantitec Reverse Transcription kit, cód. 205311, QIAGEN, APÊNDICE 2). O cDNA obtido das amostras de baço e fígado foi estocado a -20ºC, até o procedimento de amplificação.

A amplificação do cDNA foi realizada utilizando-se os oligômeros iniciadores para MCP-1 F: 5'AGCAAGTGTCCCAAAGAAGC3' e R: 5'GGCTTTTCTTGTCTAGGTGTGC 3' (NC_006591.2) e para MIP-1α F: 5'TCCACGCAAGTTCATAGTCG 3' e R: 5'AGATCGGCCACATATTCCTG 3' (NM_001005251.1), os quais foram obtidos

baseado na seqüência de mRNA tanto do NCBI quanto do ENSEMBL. A seqüência foi submetida ao software Primer 3 Plus e foram considerados todos os parâmetros para desenho de primers de qPCR. Um gene codificador de gliceraldeído 3-fosfato deidrogenase (G3PDH) canino foi utilizado como controle interno na reação, utilizando as sequências F: 5' TCAACGGATTTGGCCGTATTGG3' e R: 5'TGAAGGGGTCATTGATGGCG3' (PETERS et al., 2003)

A reação de PCR em tempo real foi realizada usando volume final de 12,5µl, incluindo 1,25µl de cDNA, 1 pmol de cada oligômero iniciador de MCP-1 e 6,25µl de Quantifast SYBR green (Kit Quantifast SYBR green, QIAGEN, cód. 204054). A reação foi realizada com um passo inicial de desnaturação em 95ºC por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificação e extensão (95ºC por 10 segundos, 60ºC 30 segundos), com temperatura de *melting* de 84ºC. Para expressão de MIP-1α utilizou-se 2 pmols de cada oligômero iniciador, 6,25µl de SsoFast EvaGreen Supermix (cód. 172-5200, Bio-Rad) e 1,25 µl de DNA em um volume final de 12,5µl de reação. O passo inicial de desnaturação ocorreu a 95ºC por 30 segundos, seguido de 40 ciclos de amplificação e extensão (95ºC por 5 segundos, 60ºC 20 segundos), com temperatura de *melting* de 86ºC.

A expressão gênica foi determinada por meio do softwere que acompanha o equipamento Realplex^2 (Eppendorf).

2.4 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando-se as variáveis expressão de MCP-1 e MIP-1α no fígado e baço, os grupos de cães infectados para LV (GCS, GSS) e o grupo controle. Os grupos foram comparados pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunn ($P<0,05$).

A determinação da carga parasitária nos tecidos hepático e esplênico foi feita pela determinação da diferença de carga entre estes órgãos, considerando somente os grupos com (GCS) e sem sinais clínicos (GSS). O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado, considerando $P<0,05$. Da mesma forma, para a determinação do

perfil de células inflamatórias predominantes no infiltrado foi utilizado o mesmo teste, com a comparação entre os grupos de cães infectados. As análises foram feitas no programa Graphpad Prism (versão 4.00, 2003).

3. Resultados

3.1 Animais

Dos 30 animais infectados, 21 apresentaram sinais clínicos de LV (16 sintomáticos e 5 oligossintomáticos) e nove eram aparentemente saudáveis (assintomáticos), possibilitando a formação de grupos GCS e GSS respectivamente. No grupo GCS, os sinais clínicos mais evidentes foram anemia (80,9%), caquexia (85,7%), lesões oculares (47,6%) e cutâneas (57,1%). As alterações macroscópicas do baço e fígado variaram do aspecto saudável (GSS) a alterações de volume, cor e consitência dos órgãos (GCS). As alterações específicas do baço corresponderam a esplenomegalia, áreas de espessamento da cápsula, evidenciação da polpa branca ao corte e congestão. No fígado os achados mais frequentes foram bordas arredondadas, coloração pálida a amarelada (degeneração) ou vermelho-escura (congestão) e padrão lobular evidente ao corte.

3.2 Análise histológica

Nos fragmentos analisados do fígado e baço, no grupo GCS, observou-se reação inflamatória, com graus variados de intensidade. O perfil celular predominante foi de linfócitos, plasmócitos e macrófagos. No baço, os cães apresentaram a formação de granulomas do tipo lepromatoso (grupo GSS), que correspondem a granulomas com bordas pobremente definidas, sem o padrão nodular característico do granuloma do tipo tuberculóide. Os cães do grupo GSS apresentaram poucos parasitos visíveis no interior de macrófagos da reação granulomatosa. A intensidade de inflamação do baço foi maior que a do fígado. Neste último órgão, a inflamação foi sempre mais discreta. No

entanto, estas diferenças não foram significativas pelo teste de Mann-Whitney (P>0.05), ou seja, não houve predominância dos tipos celulares linfócitos, macrófagos e plasmócitos, nos grupos de cães infectados tanto no baço quanto no fígado (Tabela 1).

No baço, a polpa branca apresentou reatividade linfóide, que variou de discreta a moderada (Figura 1A), comprovada pelo aumento da celularidade no centro germinativo e pela presença de figuras de mitose (GSS). Em cães do grupo GCS não foi verificada a ativação linfóide na polpa branca (Figura 1B) ou foi observada a atrofia linfóide, associada à presença de células linfóides em apoptose. A inflamação foi observada na cápsula e polpa vermelha, composta por infiltrado de macrófagos (granulomas) e plasmócitos, em graus variados.

Os granulomas esplênicos eram compostos predominantemente por macrófagos e alguns plasmócitos (Figura 2A). Na cápsula, o infiltrado apresentou distribuição focal discreta. Estes granulomas predominaram na polpa vermelha (Figura 2), mas em raras situações, nos cães do grupo GCS, verificou-se a infiltração granulomatosa nos centros germinativos ricos em linfócitos. Nos animais do grupo GCS foi possível verificar a presença de macrófagos parasitados (detalhe da Figura 1B). Juntamente com o infiltrado plasmocitário observou-se a presença de células mott associadas ao infiltrado inflamatório, que correspondem a plasmócitos com corpúsculos de Russell intracitoplasmáticos, produzindo imunoglobulinas.

Na polpa vermelha verificou-se a presença de metaplasia mielóide (Figura 1B), caracterizada por leucócitos imaturos, tais como, os linfoblastos, reticulócitos e megacariócitos. Nos animais com doença avançada do grupo GCS verificou-se distorção da arquitetura esplênica, pela presença de granulomas multifocais a coalescentes na polpa vermelha (Figura 2), que em raras ocasiões estiveram associados à fibrose (Figura 2B).

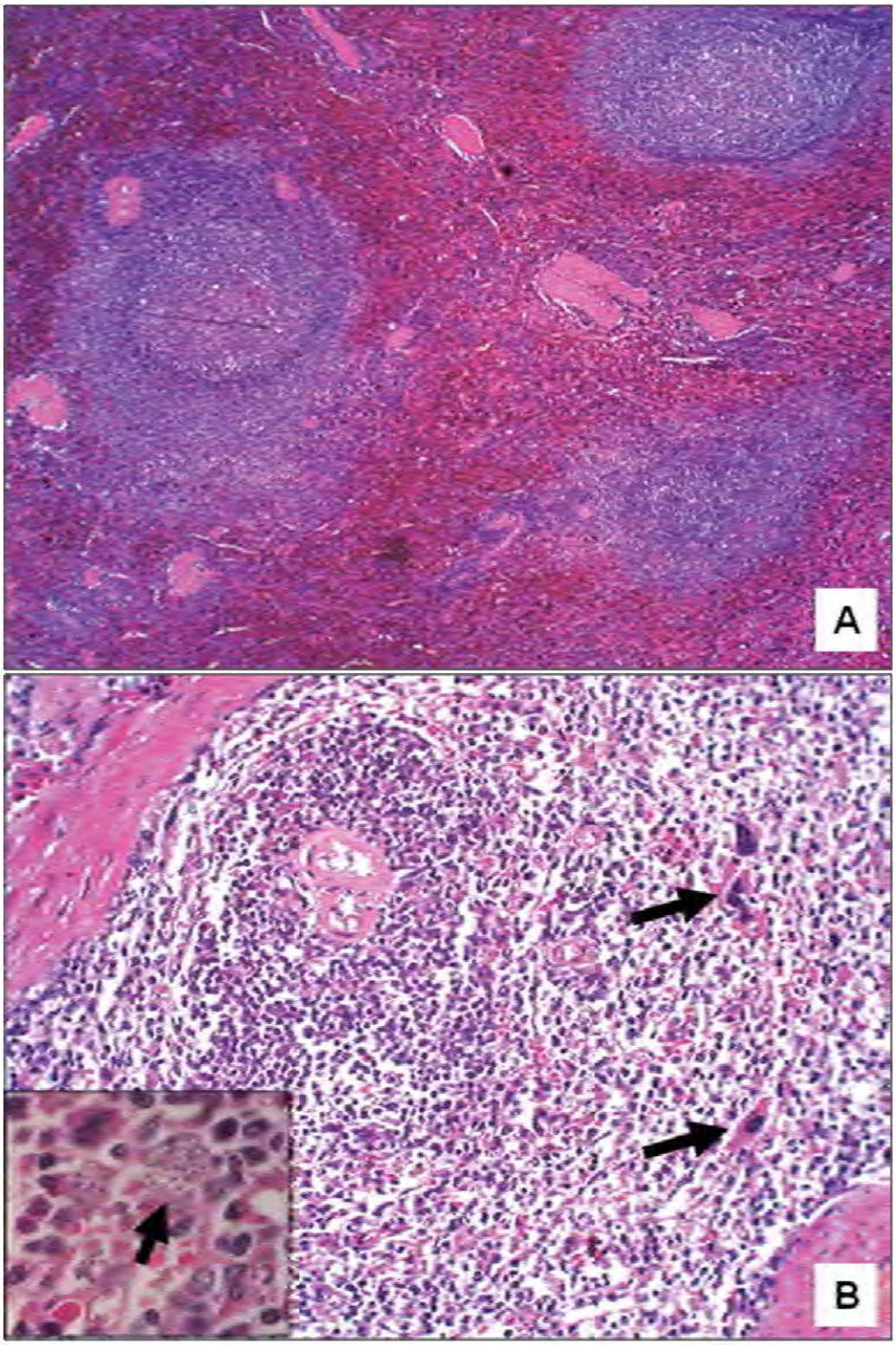


Figura 1- Fotomicrografias do baço de cães com leishmaniose visceral. (A) Reatividade linfóide na polpa branca esplênica (*, grupo GSS). (B) Centro germinativo não reativo (*), metaplasia mielóide caracterizada pela presença de megacariócitos (setas, Obj. 40x) e no detalhe observa-se presença de macrófagos parasitados (seta, Grupo GCS, obj. 100x). Hematoxilina e Eosina.

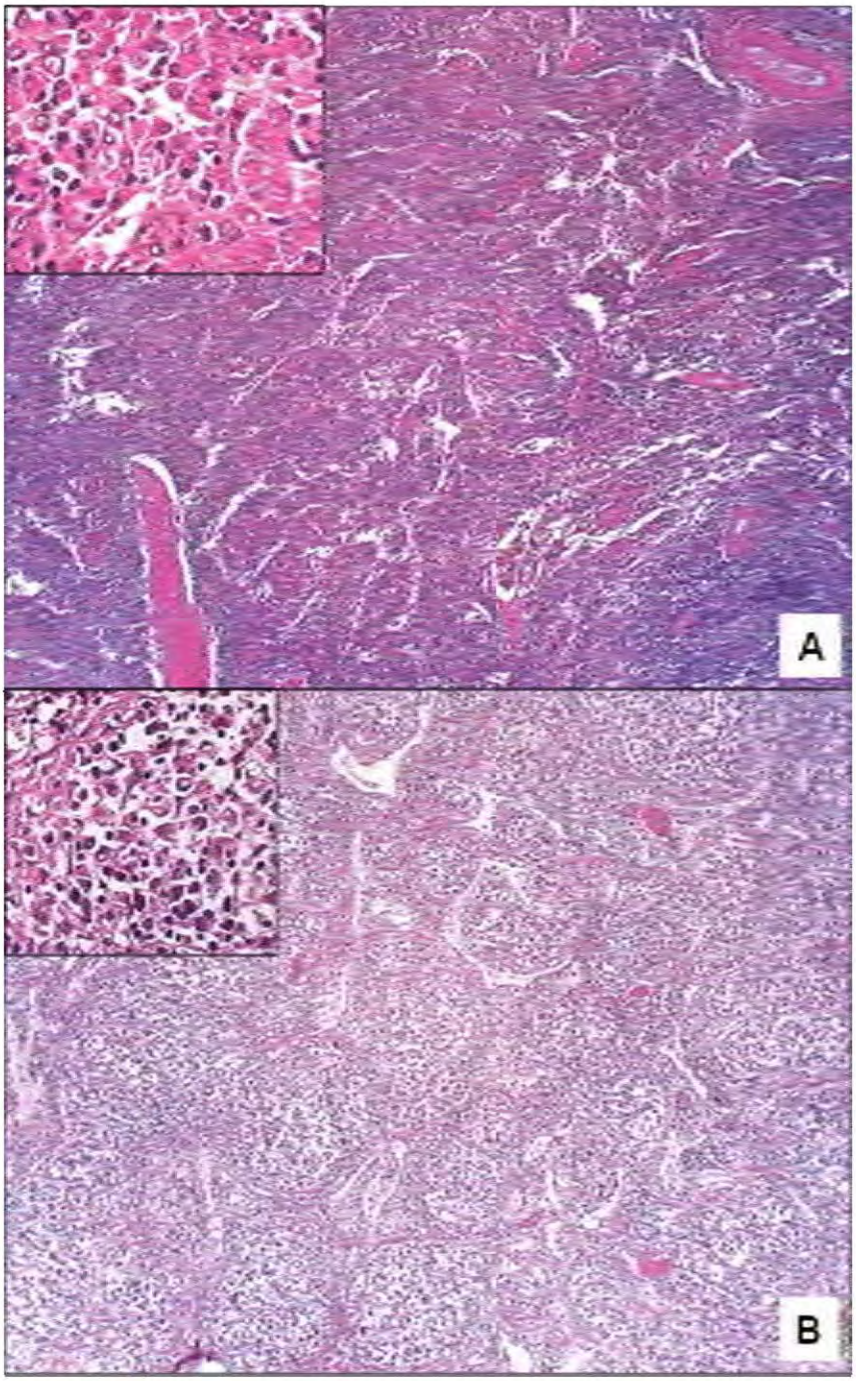


Figura 2 - Fotomicrografias de baço de cães com leishmaniose visceral. (A) Distorção da arquitetura esplênica, devido a presença de reação granulomatosa difusa, que no detalhe corresponde a granuloma com raros linfócitos. (B) Outro cão mostrando o mesmo aspecto de A, com presença de septos de tecido fibroso entre a reação granulomatosa (detalhe). Hematoxilina e Eosina. Obj. 20x.

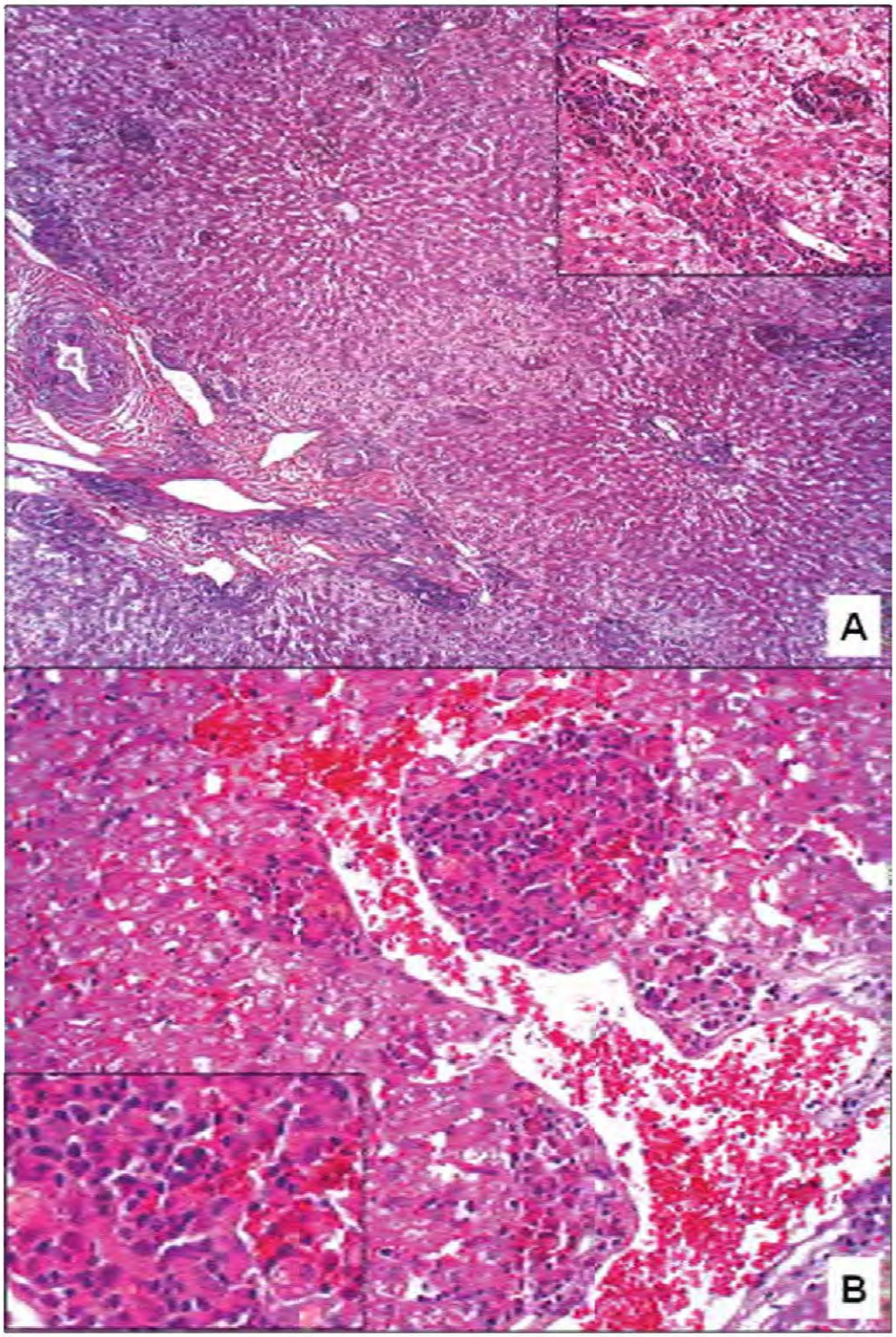


Figura 3 - Fotomicrografias de fígado de cães com leishmaniose visceral. (A) Notar a distribuição da reação inflamatória (*) nas regiões portal (seta), intralobular e controlobular. (B) Presença de granuloma adjacente a veia centrolobular (seta), rico em linfócitos (detalhe). Hematoxilina e Eosina. Obj. 40x.

No fígado o processo inflamatório foi mais discreto e ocorreu nas regiões centrolobular, peri-portal e intralobular (Figura 3A). As células predominantes foram os macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Na maioria dos animais (grupos GCS e GSS) predominavam as formações granulomatosas, compostas por estes três tipos celulares. No fígado os linfócitos apareciam em maior densidade, associados aos granulomas, quando comparado ao baço (detalhe das Figuras 2 e 3B). Na comparação entre grupos não houve diferença significativa entre estes tipos celulares, pelo teste de Mann-Whitney (P>0,05).

No restante do parênquima hepático havia degeneração hidrópica e congestão em graus variados de intensidade, bem como, a presença de células de Kupffer reativas e por vezes parasitadas e/ou com hemossiderina. Apenas um animal apresentou discreta fibrose portal e proliferação de ductos biliares (grupo GCS).

Tabela 1 – Intensidade de inflamação no fígado e baço de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*.

Tipo Celular	Grupos (mediana)	
	GCS	GSS
Linfócitos[b]	1,000	2,000
Linfócitos[f]	1,000	0,500
Macrófagos[b]	2,000	1,000
Macrófagos[f]	2,000	1,000
Plasmócitos[b]	1,000	1,000
Plasmócitos[f]	1,000	2,000

b = baço; f = fígado; GCS = grupo com sinais clínicos; GSS = grupo sem sinais clínicos. Os resultados da comparação do perfil celular nos grupos de cães infectados não foram significativos pelo teste de Mann-Whitney (P>0,05).

3.3 Determinação da carga parasitária

A sensibilidade do ensaio foi determinada pela diluição seriada da amostra de DNA do parasito (10 a 10^{-4} ng) obtida de cultura do parasito. A curva para quantificação de parasitos mostrou linearidade, com coeficiente de correlação igual a 1, coeficiente angular de -3.33 e eficiência de 100% (Figura 4). Todas as amostras analisadas foram

positivas para *Leishmania* spp., por meio da técnica de qPCR e apresentaram um único pico de *melting* (83ºC).

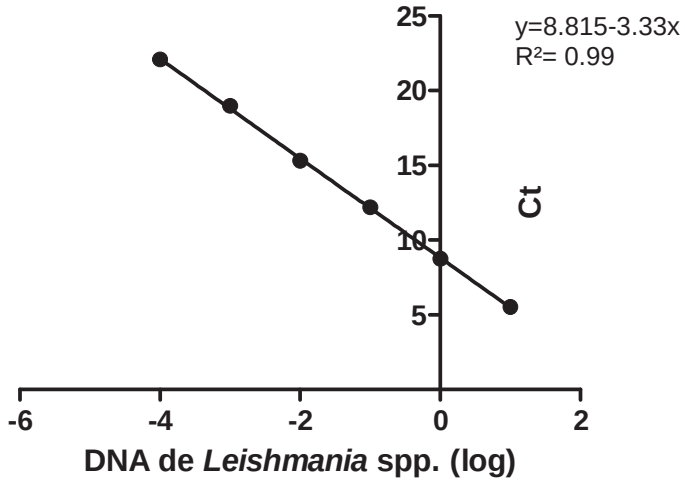


Figura 4 – Curva-padrão para a quantificação de DNA de *Leishmania* spp.

Para cada grupo clínico, os valores do parasitismo foram comparados para cada órgão (figura 5). No baço (P= 0,0002) e no fígado (P=0,0076), a mediana dos valores de parasitismo obtidos foi significativamente superior no grupo GCS. Tanto no grupo GCS quanto no GSS, o baço apresentou maior densidade de parasitas do que o fígado.

3.4 Expressão das quimiocinas MCP-1 e MIP-1α

Na curva-padrão obtida para G3PDH e MCP-1 observou-se linearidade com valor de r² próximo a 1 e eficiência de 99%, permitindo a quantificação das quimiocinas de interesse.

Todas as amostras amplificaram com os iniciadores G3PDH, confirmando a integridade do RNA extraído dos fragmentos de tecido. Os gráficos de dissociação temperatura-dependente para as quimiocinas e para G3PDH revelaram fluorescência

emitida apenas em uma temperatura, apresentando um único pico, o que significa que houve apenas um produto amplificado em cada reação.

Os níveis de expressão de MCP-1 foram avaliados nas amostras de baço e fígado, nos grupos clínicos (Figura 6) e MCP-1 mostrou maior expressão no baço, nos grupos infectados (GCS e GSS) em relação ao grupo controle (GC).

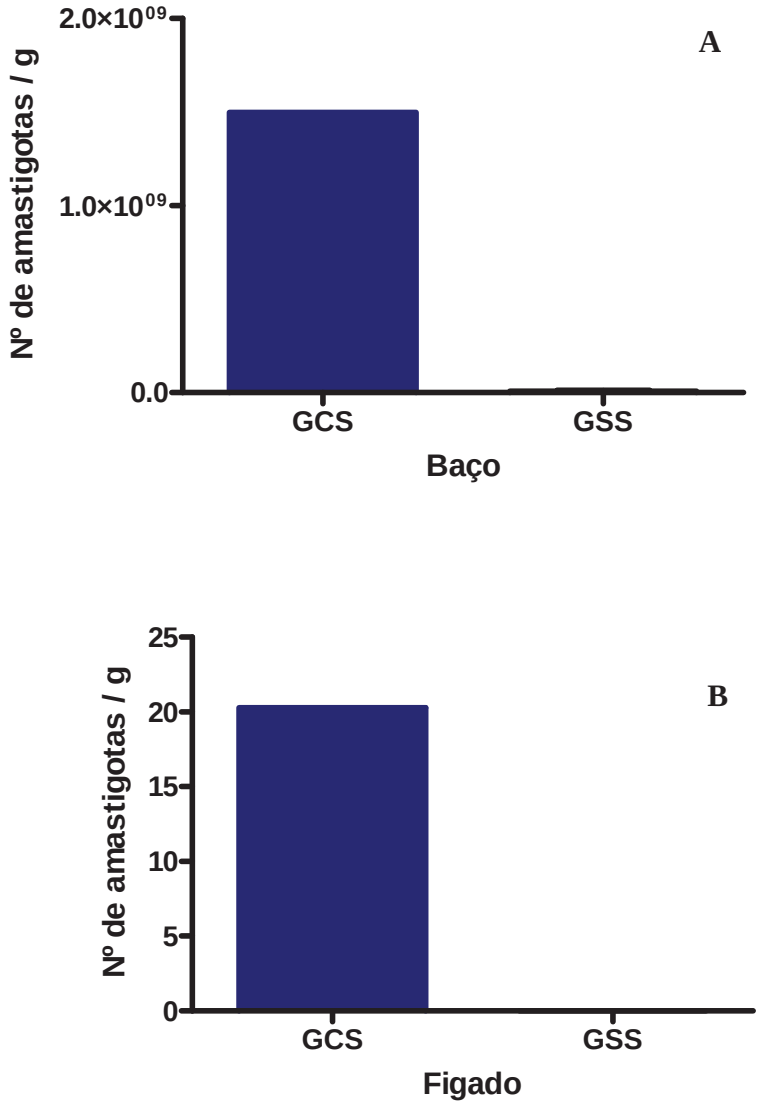


Figura 5 - Quantificação da carga parasitária em baço (A) e fígado (B) de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi,* com (GCS) e sem sinais clínicos (GSS).

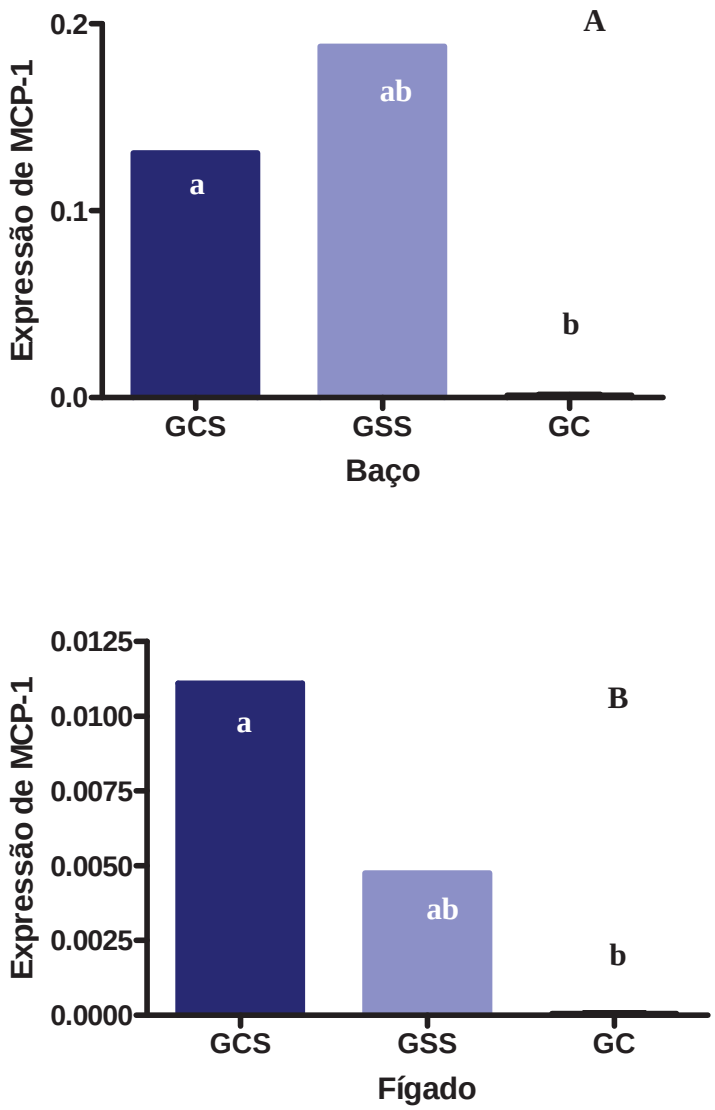


Figura 6 - Expressão de MCP-1 no baço (A) e fígado (B) de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* e de cães controle (GC) e naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, com (GCS) e sem sinais clínicos (GSS).

Na determinação da expressão de MCP-1 no fígado e no baço houve diferença significativa somente entre os grupos GCS e GC ($P<0,05$). Houve maior expressão dessa quimiocina em animais sem sinais clínicos (GSS), que nos do grupo GCS, mas sem diferenças significativas entre eles.

No fígado, as medianas dos valores de expressão de MCP-1 foram significativamente inferiores (Tabela 2) nos animais não infectados (GC) quando comparados aos do grupo GCS. Na comparação entre os grupos infectados, os animais do GSS apresentaram menor expressão que os GCS, no entanto, não houve diferença significativa entre esses grupos (Tabela 2).

A expressão de MIP-1α no baço foi maior no grupo GC do que nos grupos infectados (GCS e GSS). Quando comparados o grupos infectados, os animais do grupo GSS apresentaram maior expressão esplênica de MIP-1α. Não houve diferença significativa entre os grupos (P>0,05).

No fígado, houve maior expressão de MIP-1α nos grupos infectados (GSS e GCS) do que no grupo controle (GC), sem diferença significativa entre eles. Ao comparar os grupos infectados, foi observada maior expressão dessa molécula no grupo GSS.

Tabela 2 – Mediana e Qui-Quadrado (x^2) obtidos para os parâmetros de expressão de MCP-1 (MCP) e carga parasitária (CP) no baço (b) e fígado (f) de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*.

			Mediana		
Parâmetros	**X²**	**Valor de P**	**GCS**	**GSS**	**GC**
MCP-1[b]	08,38	0,0151	0,13100[a]	0,18800[ab]	0,00045[b]
MCP-1[f]	08,21	0,0165	0,01110[a]	0,00475[ab]	0,00002[b]
MIP1-α[b]	1,335	0,5131	0,6010[a]	0,7730[a]	1823000[a]
MIP1-α[f]	1,929	0,3811	0,0840[a]	0,2120[a]	0,00000[a]
CP[b]	18,73	0,0002	534023,39[a]	0,00141[b]	-
CP[f]	17,90	0,0076	20,276827[a]	0,01302[b]	-

GCS = grupo com sinais clínicos de LV; GSS = grupo sem sinais clínicos de LV; GC = grupo controle; b = baço; f = fígado; CP = carga parasitária; Letras diferentes na linhas são significativas pelo teste de Kruskal-Wallis e Teste de Comparação múltipla de Dunn (MCP-1, MIP1-α) e Mann-Whitney (CP), com P<0,05.

4. Discussão

Neste estudo, os animais do grupo GCS apresentaram com maior frequência anemia, caquexia, lesões oculares e cutâneas, os quais são sinais comumente

encontrados em cães com LV (ALVAR et al., 2004; REIS et al., 2006). A severidade destes sinais está associada ao parasitismo nos diferentes órgãos (REIS et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009; TEIXEIRA-NETO et al., 2010). No grupo GCS, a carga parasitária elevada estava relacionada à intensidade dos sinais clínicos. Na literatura relata-se que a manifestação clínica da doença depende da interação entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro. Alguns animais são mais susceptíveis e desenvolvem doença ativa, enquanto que outros são mais resistentes e permanecem sem sinais clínicos evidentes (BARBIÉRE, 2006).

No presente trabalho, os animais apresentaram baço com reatividade linfóide na polpa branca (grupo GSS) e inflamação da cápsula e da polpa vermelha, composta por infiltrado de macrófagos formando granulomas e por plasmócitos predominantemente (grupo GCS). Reis et al. (2009) e Tasca et al. (2009) também observaram inflamação esplênica nestes mesmos locais, associada à presença de formas amastigotas do parasito nos macrófagos.

No presente estudo, a atrofia linfóide da polpa branca foi um aspecto importante e em vários casos esteve associada à invasão granulomatosa da polpa vermelha, com distorção da arquitetura esplênica (grupo GCS). Em estudos paralelos com estes animais, verificou-se que a atrofia linfóide observada nestes cães estava correlacionada positiva e significativamente ($P<0,05$) com a presença de linfócitos apoptóticos nos cães com sinais clínicos de LV (dados não publicados). Moreira (2010) também observou atrofia linfóide e reação granulomatosa difusa, nos linfonodos periféricos de cães sintomáticos. A atrofia foi associada com a apoptose de linfócitos das regiões cortical e paracortical do linfonodo. No presente estudo, no baço de cães do grupo GCS, possivelmente estaria ocorrendo um fenômeno de evasão imune do parasito. A apoptose seria uma via de escape imunológico do parasito, tornando estes cães menos eficientes em responder a infecção, pela redução da população linfóide, similar ao que foi descrito por Moreira (2010).

A reação inflamatória granulomatosa foi mais intensa nos cães do grupo GCS. Bandarra (2010) verificou que a intensa reação granulomatosa observada nos linfonodos de cães sintomáticos para LV, estava correlacionada positivamente ($P<0,05$)

com a produção da citocina MIF (fator de inibição da migração de macrófagos) pelos macrófagos dos granulomas e com a carga parasitária elevada (grupo sintomático). Esta citocina possivelmente favorece a sobrevivência do parasito no hospedeiro, bem como, a invasão de novas células, pois algumas de suas funções são inibir a apoptose do macrófago e manter estas células no sítio de inflamação. No baço dos cães do grupo GCS é possível que esteja ocorrendo um processo similar ao descrito por este autor, pois a intensidade dos granulomas e a carga parasitária foram mais elevadas neste grupo. Seria interessante avaliar a presença de MIF no fígado e no baço e verificar se existe uma resposta similar a do linfonodo.

O aspecto morfológico dos granulomas no baço diferiu do fígado, ou seja, neste último os granulomas eram bem delimitados e ricos em linfócitos, ao contrário do baço. Ackermann (2009) descreve dois padrões morfológicos de granulomas. Um do tipo lepromatoso, que é difuso, pobremente delimitado, de distribuição sistêmica, com alta densidade de microorganismos associados a lesão, pobre em linfócitos e com predominância de citocinas do tipo Th2. Entretanto, os granulomas do tipo tuberculóide são nodulares, geralmente com necrose central, circundada por macrófagos, células epitelióides e gigantes, após por linfócitos e plasmócitos e tecido fibroso. O perfil predominante de citocinas é Th1 e o número de bactérias associados à lesão é escasso. No presente estudo, nos cães infectados, o granuloma esplênico foi do tipo lepromatoso, rico em parasitos e pobremente delimitado. Mariano (1995) afirma que os macrófagos são os principais componentes da inflamação granulomatosa, pois diferenciam-se em células epitelióides e em células gigantes, mas que a presença de linfócitos neste tipo de inflamação pode contribuir para a expansão ou para a resolução da lesão. Murphy et al. (2008) destacam que nos granulomas do tipo lepromatoso a resposta de linfócitos T está reduzida ou ausente. As observações destes autores podem ser aplicadas para o nosso estudo e, as diferenças no perfil celular dos granulomas poderiam ser associadas a um possível perfil alterado de citocinas nestes microambientes. Estudos futuros seriam necessários para confirmar a predominância de citocinas Th2 no baço. Correa et al. (2007) verificaram predominância de TGF-β e IL-10 em baços de cães com LV. A predominância destas citocinas influencia na produção

de IFN-γ, que em concentração insuficiente não ativa os macrófagos no sítio de injúria. IL-10 também tem uma ação supressiva sobre a ativação de macrófagos (STANLEY e ENGWERDA, 2007).

A metaplasia mielóide e a hemossiderose da polpa vermelha do baço foram observadas em cães dos grupos infectados (GCS e GSS). Em cães com LV é comum o envolvimento da medula óssea, embora existam escassos relatos na literatura científica descrevendo as alterações deste órgão nesta doença (NATAMI et al., 2000; FOGLIA-MANZILO et al., 2006). A hemossiderose pode estar relacionada a anemia imunomediada, já que na LV canina, a hipergamaglobulinemia é um aspecto importante em cães infectados. Os anticorpos anti-eritrócitos são descritos na literatura, como causa de anemia no homem. Possivelmente outros fatores também podem estar envolvidos, tais como, o aumento da permeabilidade da membrana do eritrócito, citocinas que interferem na ação da eritropoietina e o seqüestro de eritrócitos para o baço (MAHAJAN e MARWAHA, 2007).

Neste estudo, a metaplasia mielóide foi mais evidente nos cães do grupo GCS. Em estudos deste grupo de pesquisa, com a medula óssea de cães com LV, verificou-se um grande comprometimento deste órgão linfóide pela inflamação granulomatosa e plasmocitária multifocal a difusa. A displasia de megacariócitos, a redução de eritrócitos e a aplasia também foram observadas. A medula óssea usualmente está parasitada em cães infectados e ocorre um desequilíbrio na sua função, levando a uma diminuição da produção celular, com reflexo no quadro hematológico. Essa alteração ocorre por hiperplasia histiocitária, hipoplasia eritrocitária e evolui para aplasia (GENARO, 1993). Síndromes mielodisplásicas são mudanças de células-tronco hematopoiéticas de cães, gatos e homem. Estes distúrbios caracterizam-se por anemia e/ou leucopenia e trombocitopenia, com uma ou múltiplas mudanças displásicas na medula óssea (FOGLIA-MANZILO et al., 2006). No homem as mielodisplasias são síndromes encontradas na LV (YARALI et al., 2002). As alterações do baço, nos cães deste estudo, possivelmente devem-se ao mesmo ser um órgão linfóide secundário e quando há disfunção da medula óssea, a metaplasia mielóide é comumente observada neste órgão, na tentativa de suprir a deficiência funcional da medula óssea.

No presente estudo, o fígado apresentou inflamação discreta nas regiões centrolobular, peri-portal e intralobular. Segundo HAYES (2004), o fluxo de sangue dentro dos sinusóides é mais lento, para favorecer o contato do sangue com os hepatócitos, para absorção dos nutrientes oriundos do intestino. Esta velocidade de fluxo facilita o contato das células de Kupffer com patógenos, para remoção por fagocitose.

No fígado dos cães deste estudo, as células predominantes do infiltrado inflamatório foram macrófagos (granulomas), linfócitos e plasmócitos, além de evidenciação de células de kupffer. No fígado canino são descritas hiperplasia e hipertrofia das células de Kuppfer, formação de granulomas ricos em linfócitos, plasmócitos e células epitelióides, bem como, a presença ou não de formas amastigotas (GIUNCHETTI et al., 2008; MELO et al., 2008). As células de kupffer são fagócitos residentes do fígado e possivelmente iniciam a formação dos granulomas da LV. As mesmas podem secretar citocinas (TNF-α, IL-1, IL-6) e óxido nítrico, que induziriam a resposta imune e regenerativa do tecido hepático (HAYES, 2004). Possivelmente estas citocinas seriam as responsáveis pela migração dos demais tipos celulares que compõe o infiltrado inflamatório no fígado. Recentemente foi descrita uma célula residente dos sinusóides hepáticos, que tem origem de linfócitos granulares e que produz enzimas citotóxicas. Estas células, denominadas de células Pit ou células natural “killer” hepáticas, atuam na ativação de células de Kupffer, pela produção das citocinas IL-2 e IL-12 (LUO et al., 2000). Stanley e Engwerda (2007) descrevem a importância dos linfócitos B na formação dos granulomas hepáticos, ou seja, em camundongos infectados com *L. donovani*, estas células quando depletadas levaram a uma maior eficiência dos granulomas formados, com marcada redução da carga parasitária hepática e esplênica. No presente estudo foi evidente a presença do infiltrado plasmocitário associado aos granulomas e a elevada carga parasitária, em cães do grupo GCS.

No nosso estudo, a inflamação e a carga parasitária foram mais intensas no baço. O aspecto dos granulomas também diferiu quanto à composição celular e organização dos mesmos. Tafuri et al. (1996) observaram granulomas bem organizados

na região intralobular do fígado de cães infectados, independente da forma clínica da doença. Em nosso trabalho, tanto no baço quanto no fígado as alterações histológicas foram mais evidentes nos cães do grupo GCS, com sinais clínicos evidentes de LV. Na LV, resposta do hospedeiro pode ser diferenciada em cada compartimento ou órgão infectado pelo protozoário, mostrando sua susceptibilidade ou resistência à infecção (TAFURI et al., 1996; TAFURI et al., 2001; REIS et al, 2006; REIS et al., 2009).

No fígado, a carga parasitária também foi maior nos cães do grupo GCS, mas com uma densidade de parasitos muito inferior a do baço. Reis et al. (2009) revelaram padrões distintos de densidade parasitária nos tecidos de cães infectados por *L. chagasi* e apontaram a pele e o baço como os locais que apresentaram parasitismo elevado, durante o curso da doença. Em alguns estudos verificou-se maior parasitismo em tecidos de animais assintomáticos que em animais sintomáticos (XAVIER et al., 2006; GIUNCHETTI et al. 2008). Estes dados enfatizam a importância dos cães assintomáticos no ciclo epidemiológico da LV. No presente estudo a densidade de parasitos no fígado e baço de cães do grupo GSS foi muito baixa, diferindo destes autores.

A expressão de MCP-1 no baço foi significativamente superior ($P<0,05$) nos cães do grupo GSS e, no fígado dos cães do grupo GCS. Na literatura descreve-se que esta quimiocina está envolvida na produção de óxido nítrico e eliminação do parasito do interior de macrófagos humanos infectados por *L. infantum* e de camundongos BALB/c infectados por *L. donovani* (BHATTACHARYYA et al., 2002; BRANDONISIO et al., 2002). No baço dos cães do grupo GSS possivelmente esta quimiocina esteja atuando na resposta eficaz do hospedeiro canino, pois neste mesmo grupo a carga parasitária foi muito baixa. Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos de cães infectados para esta expressão, talvez pela distribuição de animais em cada grupo não ser homogênea para mostrar estas diferenças (GCS = 21 e GSS =9). Strauss-Ayali et al. (2007) também verificaram em baços caninos que MCP-1 e outras quimiocinas pró-inflamatórias tiveram expressão aumentada em cães experimentalmente infectados por *L. infantum.* Estas quimiocinas estavam correlacionadas com a ativação de linfócitos T.

Bhattacharyya et al. (2002) descreveram que as quimiocinas MIP-1α e MCP-1 têm um importante efeito leishmanicida e regulam a produção de óxido nítrico nos macrófagos.

No presente estudo, a expressão de MCP-1 e a carga parasitária no fígado do grupo GCS foram maiores que nos cães do grupo GSS (P>0,05). No entanto a expressão da MCP-1 e a carga parasitária hepáticas foram muito inferiores as detectadas no baço. Neste caso, a atividade desta quimiocina parece favorecer o hospedeiro, mesmo nos cães com doença avançada (grupo GCS), pois houve um controle da multiplicação do parasito no fígado, quando comparado ao baço. Rousseau et al. (2001) verificaram que MCP-1 exerce um efeito quimiotático sobre populações de linfócitos T $CD4^+$ com perfil Th1 e Th2. Possivelmente exista uma predominância de citocinas do tipo Th1 no fígado dos cães deste estudo. Para confirmar esta hipótese seria necessário avaliar a predominância de outras citocinas e quimiocinas produzidas simultaneamente neste órgão, pois estas atuam em rede e um padrão de resposta isolado não explicaria completamente este mecanismo. Stanley e Engwerda (2007) relatam que no fígado o controle inicial da infecção pelo parasito *L. donovani* é feito por linfócitos T CD4. Os linfócitos T CD8 são cruciais no controle da reinfecção. As células de kupffer hepáticas são o principal alvo do parasito e possivelmente são elas que produzem quimiocinas (MIP-1α, MCP-1, IP-10) que irão recrutar leucócitos para o controle efetivo da multiplicação do protozoário no tecido hepático.

MIP-1α apresentou maior expressão no fígado e baço do grupo GSS, sem diferenças significativas para os grupos GCS e GC. Os valores de expressão desta quimiocina nos grupos infectados foram muito similares no baço, bem como foram muito superiores aos de MCP-1 no mesmo órgão. Portanto, a hipótese é que esta quimiocina estaria atuando de forma pró-inflamatória no grupo GSS e favorecendo o processo infeccioso pela *Leishmania* no grupo GCS, quando se considera a carga parasitária esplênica. Neste mesmo órgão, a reação granulomatosa foi maior. Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (BANDARRA, 2010; MOREIRA, 2010) sugere-se que os granulomas não sejam tão eficientes na contenção da multiplicação do protozoário no baço, pela ação de citocinas moduladas pelo parasito (MIF) e pela pobre apresentação antigênica (baixa expressão de MHC-II) e atividade microbicida

(baixa produção de iNOS) nos macrófagos destes granulomas (dados não publicados). Aliados a ineficiência dos macrófagos infiltrados no baço, existem resultados controversos na literatura quanto ao verdadeiro papel de MIP-1α. Mackay et al. (2001) descrevem que a interação de MIP-1α com TNF-α favorece a formação e a manutenção dos granulomas. Sato et al. (1999) verificaram que a depleção desta quimiocina e de seu receptor em camundongos *knockout* levou a redução da densidade de *L. donovani* nos tecidos e ao aumento da expressão de IFN-γ. Portanto, avaliar o perfil predominante de citocinas e quimiocinas no microambiente esplênico e hepático seria fundamental para o entendimento destas diferentes repostas nos grupos infectados.

As respostas diferenciadas observadas no baço quando comparado ao fígado podem ser similares ao que foi descrito em infecções experimentais em camundongos. Em estudos experimentais descreve-se um mecanismo para explicar a persistência da infecção por *Leishmania donovani* no baço. Na fase aguda, o baço é um sítio de formação da resposta imune, pois os macrófagos parasitados chegam a zona marginal do baço e entram em contato com os macrófagos deste local e da polpa vermelha. Após os antígenos destes parasitos são captados pelas células dendríticas, que migram para a polpa branca esplênica. As células dendríticas maduras expressam receptores de quimiocinas (CCR7), secretam IL-12 e apresentam antígenos do parasito para linfócitos T, resultando em resposta imune celular. Os linfócitos T ativados também produzem quimiocinas. Na infecção crônica, ocorre a alteração da arquitetura esplênica, devido ao comprometimento do sistema imune do hospedeiro. A citocina TNF é produzida por macrófagos altamente parasitados, localmente na polpa branca. Por este fato, ocorre perda dos receptores de citocinas, redução do recrutamento celular e regulação da produção de IL-10. A citocina IL-10 atua sobre células dendríticas e leva a subregulação da expressão de CCR7, inibindo sua habilidade em migrar dentro da polpa branca. Estas células dendríticas contribuem para a cronicidade da infecção e persistência do parasito no tecido esplênico (STANLEY e ENGWERDA, 2007).

O baço foi o órgão mais susceptível a infecção por *L. chagasi* possivelmente por apresentar um processo infeccioso de evolução crônica, com um microambiente de

citocinas favorável ao desenvolvimento do parasito. As quimiocinas pró-inflamatórias tiveram sua produção no tecido esplênico, no entanto, não foram eficientes no controle da infecção, possivelmente por sua interação ou inibição por um perfil desequilibrado entre as respostas Th1 e Th2, principalmente no grupo de cães com sinais clínicos (GCS). No fígado, a carga parasitária foi menor e a produção das quimiocinas, juntamente com uma resposta inflamatória mais eficiente, devido a formação dos granulomas bem organizados e ricos em linfócitos, contribuíram para o controle da multiplicação do protozoário. Estes resultados nos permitem afirmar que existe um padrão de resposta imune compartimentalizada no baço e no fígado, classificando-os como susceptível e resistente, respectivamente.

5. Conclusões

Nas condições do presente estudo foi possível concluir que:

- O baço é mais susceptível a infecção por *L. chagasi*, devido a maior carga parasitária e maior intensidade de lesões que o fígado, nos cães com doença avançada (grupo GCS).
- A resistência hepática deve-se a menor carga parasitária e a formação granulomas ricos em linfócitos.
- A expressão das quimiocinas MIP-1α e MCP-1 foram maiores no baço, nos cães do grupo GCS. Quando se considera a carga parasitária deste órgão, possivelmente existe um mecanismo de evasão imune do parasito.

REFERÊNCIAS

ABBAS, K. B.; LICHTMAN, A. H. PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2008, 564p.

ACKERMANN, M. R. Chronic inflammation and wound healing. In: MCGAVIN, M.D; ZACHARY, J. F. **Pathologic basis of veterinary disease**, 4 ed. Saint Louis: Editora Mosby Elsevier, 2009. cap. 4, p. 153–191.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.R.; RUSSEL, D.G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, Washington, v. 112, n.18, p. 2993-3002, 1999.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, London, v.57, p.1-88, 2004.

ALVES, C.F.; AMORIMB, I.F.G.; MOURA, E.P.; RIBEIRO, R.R.; ALVES, C.F.; MICHALICK, M.S.; KALAPOTHAKIS, E.; BRUNA-ROMERO, O.; TAFURI, W.L.; TEIXEIRA, M.M.; MELO, M.N. Expression of IFN-γ, TNF-α, IL-10 and TGF-β in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.128, p.349-358, 2009.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal of Parasitology**, Porto, v.30, p.1269-1281, 2000.

BANDARRA, M.B. **Análise da composição celular e imunodetecção de MIF em linfonodos de cães com Leishmaniose Visceral**. 2010. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Jaboticabal, 2010.

BARBIÉRI, C.L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology,** Oxford, v.28, p.329-337, 2006.

BHATTACHARYYA, S.; GHOSH, S.; DASGUPTA, B.; MAZUMDER, D.; ROY, S.; MAJUMDAR, S. Chemokine-induced leishmanicidal activity in murine macrophages via the generation of nitric oxide. **Journal of Infectious Disease**, Oxford, v.185, p.1704-1708, 2002.

BRANDONISIO, O.; PANARO, M.A.; FUMAROLA, I.; SISTO, M.; LEOGRANDE, D.; ACQUAFREDDA, A.; SPINELLI, R.; MITOLO, V. Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. **Clinical and Experimental Medicine**, v.2, p.125–129, 2002.

BRASIL - Ministério da Saúde. Secretária de vigilância em saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 120p.

BOGDAN, C.; GESSNER, A.; SOLBACH, W.; ROLLINGHOFF, M. Invasion, control and persistence of Leishmania parasites. **Current Opinion in Immunology,** n.8, p.517-525, 1996.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania* mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology**, Elmsford , n.28, p.121-134, 1998.

CAVALCANTI, M.P.; BRITO, M.E.F.; SOUZA, W.V.; GOMES, Y.M.; ABATH, F.G.C. The development of a real-time PCR assay for the quantification of Leishmania infantum DNA in canine blood. **The Veterinary Journal**, London, v.182, p.356-358, 2009.

CONRAD, S.M.; AYALI, D.S.; FIELD, A.E.; MACK, M.; MOSSER, D.M. *Leishamania*-derived Murine Monocyte Chemoattractant Protein-1 enhances the recruitment of a

restrictive population of CC chemokine receptor 2-positive macrophages. **Infection and Immunity**, Whashington, v. 75, n.2, p. 653-665, 2007.

CORRÊA, A.P.F.L.; DOSSI, A.C.S.; VASCONCELOS, R.O.; MUNARI, D.P.; LIMA, V.M.F. Evaluation of transformation growth factor-ß1, interleukin-10, and interferon-γ in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi. **Veterinary Parasitology,** Amsterdam, v.143, p.267-274, 2007.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e funcional**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000, p.64

COTTERELL, S.E.; ENGWERDA, C.R.; KAYNE, P.M. *Leishmania donovani* infection initiates T cell-independent chemokine responses, which are subsequently amplified in a T cell-dependent manner. **European Journal of Immunology**, Stockholm, v.29, p. 203-214, 1999.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by Leishmania. **Experimental and Molecular Pathology**, Amsterdam n. 72, p. 132-141, 2002.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.48, p.151-156, 2006.

DANTAS-TORRES, F. LATROFA, M.S.; OTRANTO, D. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in females, eggs and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, v.13, n.4, p.56, Apr, 2011.

DEY, R.; MAJUMDER, N.; BHATTACHARYYA MAJUMDAR, S.; BHATTACHARJEE, S.; BANERJEE, S.; ROY, S.; MAJUMDAR, S. Induction of Host Protective Th1 Immune

Response by Chemokines in *Leishmania donovani*-infected BALB⁄c Mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, Stockholm, v.66, p.671–683, 2007.

ENGWERDA, C.R.; ATO, M.; COTTERELL, S.E.; MYNOTT, T.L.; TSCHANNERL, A.; GORAK-STOLINSKA, P.M.; KAYE, P.M. A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. **The American Journal of Pathology**, Amsterdam, v.161, n.2, p.429-437, 2002.

FEITOSA, M.N.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Pulo, ano V, p.36-44, 2000.

FERREIRA, M.G.; FATTORI, K.R.; SOUZA, F.; LIMA V.M. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.165, n.1-2, p.150-154, Oct, 2009.

FIGUEIREDO, F.B.; GREMIÃO, I.D.; PEREIRA, S.A.; FEDULO, L.P.; MENEZES, R.C.; BALTHAZAR, D.A.; SCHUBACH, T.M.; MADEIRA, M.F. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,** Amsterdam, v.102, n.2, p.200-201, 2008.

FOGLIA-MANZILLO, V.; RESTUCCI, B.; PAGANO, A.; GRADONI, L.; OLIVA, G. Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis. **Veterinary Record**, London, v.158, n.20, p.690-694, May, 2006.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis**. Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.137, n.3-4, p.214-221, 2006.

GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.B.; REGO JR, F.A.; OSHIRO, E.T; CHANG, M.R. Estudos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.31:, p.378-90, 1997.

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

GOMES, R.B.; MENDONÇA, I.L.; SILVA, V.C.; RUAS, J.; SILVA, M.B.; CRUZ, M.S.; BARRAL, A.; COSTA, C.H. Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Amsterdam, v.101, n.2, p.127-133, 2007.

GONTIJO, C.M.F.; M.N. MELO. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, p. 338-349, 2004.

GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK,W.; CARNEIRO, C.M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; REIS, A.B.; Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitismand serumbiochemical changes in canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, Amsterdam, v.84, p.269–277, 2008.

HAYES, M.A. Pathophysiology of the liver. In: DUNLOP, R.H., MALBERT, C.H. **Veterinary Pathophysiology.** Blackwell Publishing : Iowa, cap. 11, p. 371-399, 2004.

LANG, T.; CHASTELLIER, C.; FREHEL, C.; HELLIO, R.; METEZEAU, P.; LEÃO, S.S.; ANTOINE, J.C. Distribution of MHc class I and of MHC class II molecules in

macrophages infected with Leishmania amazonensis**. Journal of Cell Science,** Washington, v.107, p.69-82, 1994.

LEÃO, S. S.; LANG, F.; PRINA, E.; HELLIO, R.; ANTOINE, J.C. Intracellular Leishmania Amazonensis amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. **Journal of Cell Science**, Washington, n.108, p. 3219-3231, 1995.

LUNA, R.; VUOTTO, M.L.; IELPO, M.T.L.; AMBROSIO, R.; PIANTEDOSI, D.; MOSCATIELLO, V.; CIARAMELLA, P.; SCALONE, A.; GRADONI, L.; MANCINO, D. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.70, p. 95-103, 1999.

LUO, D.Z.; VERMIJLEN, D.; AHISHALI, B.; TRIANTIS, V.; PLAKOUTSI, G.; BRAET, F.; VANDERKERKEN, K.; WISSE, E. On the cell biology of pit cells, the liver-specific NK cells. **World Journal of Gastroenterology,** Beijing, v. 6, n.1, p.1-11, 2000.

MACKAY, CR. Chemokines: immunology's high impact factors. **Nature Immunology**, v.2, p.95-101, 2001.

MACHADO J.G., HOFFMANN J.L., LAGONI H. Imunopatologia da Leishmaniose Visceral Canina. **Clínica Veterinária**. ano XII; n. 71, p. 50-58, 2007.

MAHAJAN, V.; MARWAHA, R.K. Immune Mediated Hemolysis in Visceral Leishmaniasis. **Journal Tropical Pediatrics**, Oxford, v.53, n.4, p.284-286, 2007.

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

MARIANO, M. The Experimental Granulma: a hypothesis to explain the persistence of the lesion. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.37, n.2, p.161-176, 1995.

MARTÍNEZ, C.M.M.; PANDO, R.H. Las quimiocinas, una nueva familia de citocinas en el reclutamiento de células inflamatorias. **Revista de Investigacíon Clinica**, Mexico, v.51, n.4, p.255-268, 1999.

MATSUKAWA, A.; HOGABOAM, C.M.; LUKACS, N.W.; LINCOLIN, P.M.; EVANOFF, H.L.; KUNKEL, S.L. Pivotal role of the CC chemokine, macrophage derived chemokine, in the innate immune response. **Journal of Immunology**, Boston, v.164, p.5362–5368, 2000.

MAURER, M.; STEBUT, E. Macrophage inflammatory protein-1. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biollogy**, Amsterdam, v. 36, p. 1882-1886, 2004.

MAURICIO, I.L.; STOHARD, J.R.; MILES, L.A. The stranger case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, Amsterdam, v.16, p.188-189, 2000.

MELLO, D.A.; REGO-JÚNIOR, F.A.; OSHOZO, E.; NUNES, V.L. *Cerdocyon thous* (*L*.) (Carnivora, Canidae) naturally infected with *Leishmania donovani chagasi* (Cunha & Chagas, 1973) in Corumbá (Mato Grosso do Sul State, Brazil). **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.83, n.2, p.259, 1988.

MELO, F.; AMARAL, M.; OLIVEIRA, P.; LIMA, W.; ANDRADE, M.; MICHALICK, M.; RASO, P.; TAFURI, W.; TAFURI, W. Diffuse intralobular liver fibrosis in dogs naturally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Nothkrook, v.79, n.2, p.198-204, Aug, 2008.

MENDES, W.S.; SILVA, A.A.M.; TROVÃO, J.R.; SILVA, A.R.; COSTA, J.M.L. Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luis, Maranhão, Brasil. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Salvador, v.35, n.3, p. 227-23, mai-jun, 2002.

MISSAWA, N.A.; DIAS, E.S. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the municipality of várzea grande: an area of transmission of visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso, Brazil. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.102, p.913-918, 2007.

MOREIRA, P.R.R. **Apoptose em linfonodos de cães com Leishmaniose Visceral**. 2010, 54f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal,.2010.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Janeway's Immunobiology**, 7 ed. New York : Garland Science, 2008, p.887.

NATAMI, A.; SAHIBI, H.; LASRI, S.; BOUDOUMA, M.; GUESSOUSS-IDRRISSI, N.; RHALEM A. Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with *Leishmania infantum* in the Khemisset province, Morocco. **Veterinary Research**, Paris, v.31, n.3, p.355-363, May-Jun, 2000.

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

PAZ, G.F.; RIBEIRO, M.F.; MAGALHÃES, D.F.; SATHLER, K.P.; MORAIS, M.H.; FIÚZA, V.O.; BRANDÃO, S.T.; WERNECK, G.L.; FORTES-DIAS, C.L.; DIAS, E.S. Association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies: A case-

control study in dogs from a Brazilian endemic area. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.97, n.2, p.131-133, Nov, 2010.

PETERS, I.R.; HELPS, C.R.; BATT, R.M.; DAY, M.J.; HALL, E.J. Quantitative real-time RT-PCR measurement of mRNA encoding alpha-chain, pIgR and J-chain from canine duodenal mucosa. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.275, n.1-2, p.213-22, 2003.

PINCHART, M.P.B.; PELLOUX, H.; GUERGOUR, D.D.; THOMASI, P.A. Chemokines in host-protozoan-parasite interactions. **Trends in Parasitology**, Amesterda, v.17, n.6, 2001.

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

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, Washington, v.62, n.1, p.229-335, 1994.

QUINTAL, A.P.; RIBEIRO EDE, S.; RODRIGUES, F.P.; ROCHA, F.S.; FLOETER-WINTER, L.M.; NUNES, C.M. *Leishmania* spp. in *Didelphis albiventris* and *Micoureus paraguayanus* (*Didelphimorphia: Didelphidae*) of Brazil. **Vetrinary Parasitology,** Amsterdam, v.176, n.2-3, p.112-119, Mar, 2011.

RANGEL, E.F.; VILELA, M.L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.24, n.12, p.2948-2952, Dec, 2008.

REINER, N.E.; Ng, W.; McMASTER, W. R. Parasite-acessory cell-interactions in murine leishmaniasis. 2. *Leishmania dononvani* suppresses macrophage expression of class-I and class II major histocompatibility complex gene-products. **The Jounal of Immunology,** Betheodo, v.138, p.1926-1932, 1987.

REIS, A.B.; GIUNCHETTI, R.C.; CARRILLO, E.; MARTINS-FILHO, O.A.; MORENO, J. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against anine leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v.26, p.341-349, 2010.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; FRANCA-SILVA, J.C.; GIUNCHETTI, R.C.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, Amsterdam, v.81, p.68-75, 2009.

REIS, A.B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A.M.; MARQUES, M.J.; GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GUERRA, L.L.; ANDRADE, R.A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.15, n.112 (3-4), p.102-16, Aug, 2006.

REY, L. **Parasitologia**, 4. ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 2008.

RODGERS, M.R.; POPPER, S.J.; WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of leishmania. **Experimental Parasitology**, Amsterdam, v.71, p.267-275, 1990.

ROLÃO, N.; CORTES, S.; RODRIGUES, R.; CAMPINO, L. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by Real-Time Polymerase Chain Reaction and Polymerase Chain Reaction-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **The Journal of Parasitology**, v.90, n.5, p.1150-1154, 2004.

ROSYPAL, A.C.; TRIPP, S.; LEWIS, S.; FRANCIS, J.; STOSKOPF, M.K.; LARSEN, R.S.; LINDSAY, D.S. Survey of antibodies to *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. in gray and red fox populations from North Carolina and Virginia. **Parasitology**, Cambridge, v.96, n.6, p.1230-1231, 2010.

ROUSSEAU, D.; DEMARTINO, S.; ANJUERE, 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. **European Cytocine Network**, vol.12, n. 2, p.340-347, 2001.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**, n.3, p.1041-1047, 2002.

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

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A.; HOFFMANN, M.P.; FREITAS, R.A.; MALACCO, M.A.F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as vector of american visceral leishmaniasis. **Medicine Veterinary Entomology**., 12: 325-317,1998.

SANTOS-GOMES, G.M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMÃO, P.; SILVEIRA, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by Leishmania infantum. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 88, p.21-30, 2002.

SATO, N.; KUZIEL, W.A.; MELBY, P.C.; REDDICK, R.L.; KOSTECKI, V.; ZHAO, W.; AHUJA, S.K.; AHUJA, S.S. Defects in the generation of INF-gamma are overcome to control infection with *Leishmania donovani* in CC chemokine receptor (CCR) 5, macrophage inflamatory protein-1alpha or CCR2-deficiente mice. **The Journal of Immunology**, Betheod, v.163, n.10, p. 5519-5525, 1999.

SMELT, S.C.; ENGWERDA, C.R.; Mc CROSSEN, M.; KAYE, P.M. Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, Betheod, v.158, p.3813-3821, 1997.

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.90, p.37-45, 2000.

SOLANO-GALLEGO, L.; RODRIGUEZ-CORTES, A.; TROTTA, M..; ZAMPIERON, C; RAZIA, L.; FURLANELLO, T.; CALDIN, M.; ROURA, X.; ARBEROLA, J. Detection of *Leishmania infantum* DNA by FRET-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.147, p.315-319, 2007.

SOUZA, N.P.; ALMEIDA, A.B.; FREITAS, T.P.; PAZ, R.C.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; SOUSA, V.R. *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* in wild canids kept in captivity in the State of Mato Grosso. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Salvador, v.43, n.3, p.333-335, 2010.

STANLEY, A.C.; ENGWERDA, C.R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, p. 138–147, 2007.

STEIGERWALD, M.; MOLL, H. *Leishmania major* modulates chemokine and chemokine receptor expression by dendritic cells and affects their migratory capacity. **Infection and Immunity**, Washington, v.73, n.4, p. 2564-2567, 2005.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETHA, G.; JAFFEC, C.L. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Resarch**, v. 38, p. 547–564, 2007.

SVODOVÁ, M; VOTÝPKA, J.; NICOLAS, L.; WOLF, P. *Leishmania tropica* in the black rat (*Rattus rattus*): persistence and transmission from asymptomatic host to sand fly vector *Phlebotomus sergenti*. **Microbes and Infection**, Amsterdam, v.5, p.361-364, 2003.

TAFURI, W. L.; TAFURI, W.L.; BARBOSA, .J.A. et al. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical,** São Paulo, v.38, p.81-89, 1996.

TAFURI, W.L.; DE OLIVEIRA, M.R.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case report from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.3, p.203–212, 2001.

TASCA, K.I.; BUZETTI, W.A.; TENORIO MDA, S.; PAULAN SDE, C.; LIMA, F.L.; DE QUEIROZ, N.M.; MACHADO, R.Z.; OLIVEIRA, T.M.; NEVES, M.F.; DE NORONHA AC JR.; DE ASSIS, J. Parasitological, immunohistochemical and histopathological study for Leishmaniachagasi detection in splenic tissues of dogs with visceral leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Carlos, v.18, n.1 p.27-33, 2009.

TAVARES, C.A.P.; FERNANDES, A.P.; MELO, M.N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. **Expert Review of Molecular Diagnose**, v.3, n.5, p.657-667, 2003.

TEIXEIRA-NETO, R.G.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; VITOR, R.W.; COURA-VITAL, W.; QUARESMA, P.F.; KER, H.G.; DE MELO, L.A.; GONTIJO, C.M.; REIS AB. Relationship of *Leishmania*-specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.169, n.3-4, p.248-257, May, 2010.

TSAGOZIS, P.; KARAGOUNI, E.; DOTSIKA, E. CD8+ T cells with parasite-specific cytotoxic activity and a Tc1 profile of cytokine and chemokine secretion develop in experimental visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v.25, p. 569–579, 2003.

VASQUEZ, R.E.; XIN, L.; SOONG, L. Effects of CXCL10 on dendritic cell and CD4+ T-cell functions during *Leishmania amazonensis* infection. **Infection and Immunity**, Washington, v.76, n.1, p. 161–169, 2008.

VESTER, B.; MULLER, K.; SOLDBACH, W.; LASKAY, T. Early gene expression of NK cell-activating chemokines in mice resistant to Leishmania major. **Infection and Immunity**, Washington, v.67, n.6, p.3155-3159, 1999.

WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, **Technical Report Series**, Geneva, 2010.

XAVIER, S.C.; CHIARELLI, I.M.; LIMA, W.G.; GONÇALVES, R.; TAFURI, W.L. Leishmaniose visceral canina: um caso inusitado de um animal assintomático proveniente de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n.6, p.994-1000, 2006.

YARALI, N.; FISGIN, T.; DURU, F.; KARA, A. Myelodyplastic features in visceral leishmaniasis. **American Journal of Hematology**, Stockholm, v.71, p.191-195, 2002.

APÊNDICE 1

Extração de DNA (DNeasy mini kit, Qiagen, cód.)

1. Em um microtubo de 1,5ml foi colocado 25mg de tecido e adicionado 180µL de *Buffer* ALT.
2. Adicionar 20µL de proteinase K Agitar e incubar por 3 horas a 56ºC no Thermo mixer (Eppendorf).
3. Agitar o produto lisado por 15 segundos e adicionar 200 µL de *Buffer* AL e 200 µL de Etanol a 96%.
4. Transferir o produto para uma coluna DNeasy mini spin e centrifugar a 6000 x g por 1 minuto.
5. Adicionar 500 µL de *Buffer* AW1 e centrifugar por 1 minuto a 6000 x g.
6. Adicionar 500 µl de *Buffer* AW2 e centrifugar por 1 minuto a 6000 x g.
7. Transferir a coluna DNeasy spin para um novo tubo de 1,5mL, adicionar 200 µL de *Buffer* AE e incubar por 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar a 6000 x g durante 1 minuto.
8. Acondicionar o DNA extraído a -20ºC.

APÊNDICE 2

Extração de RNA (RNeasy mini kit, Qiagen, cód. 74104).

1. Macerar os 25mg de tecido em nitrogênio líquido com auxílio de cadinho e pistilo.
2. Adicionar 600 µL de *Buffer* RLT, homogeneizar o material com auxílio da ponteira e transferir o produto para um tubo de 1,5mL.
3. Centrifugar o lisado por 3 minutos em rotação máxima e retirar o sobrenadante, transferindo-o para um novo tubo de 1,5mL.
4. Adicionar o mesmo volume do lisado, de etanol a 70% e homogeneizar.
5. Transferir até 700 µL da amostra para uma coluna RNeasy spin. Centrifugar por 15 segundos a 8000 x g e descartar o sobrenadante.
6. Adicionar 700 µL de *Buffer* RW1 e centrifugar a 8000 x g, durante 15 segundos. Descartar o sobrenadante.
7. Adicionar 500 µL de *Buffer* RPE, centrifugar por 2 minutos a 8000 x g.
8. Transferir a coluna para um novo tubo de 1,5 mL, adicionar 50 µL de água RNeasy free e centrifugar por 1 minuto a 8000 x g.
9. Estocar o RNA a -80ºC, até transcrição em cDNA.

Transcrição reversa

1. Descongelar gDNA Wipeout Buffer, Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT Buffer, RT Primer Mix e água RNase-free em temperatura ambiente (15 a 25ºC).
2. Colocar em um tubo de 1,5mL, 2µL de gDNA Wipeout Buffer, 1µg de RNA e água RNase-free (q.s.p), totalizando um volume final de 14µL. A reação deve ser feita no gelo.

3. Incubar por 2 minutos a 42 ºC e por no gelo.
4. Adicionar 1 µL de Quantiscript Reverse Transcriptase, 4µL de Quantiscript RT Buffer e 1 µL de RT Primer Mix.
5. Incubar por 15 minutos a 42 ºC
6. Incubar por 5 minutos a 95 ºC
7. Estocar o cDNA a -20 ºC até o processo de qPCR.