

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA E CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS NO
BAÇO E SANGUE DE CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS COM *Leishmania* spp.

Fausto de Souza
Farmacêutico

ARAÇATUBA – SP
2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA E CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS DO
BAÇO E SANGUE DE CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS COM *Leishmania* spp.

Fausto de Souza

Orientadora: Prof. Adj. Dra. Valéria Marçal Félix de Lima

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia – UNESP, Curso de Medicina Veterinária, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

ARAÇATUBA – SP

2010

Catalogação na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S729q Souza, Fausto de.
Quantificação de células T regulatórias no baço e sangue de cães naturalmente infectados com *Leishmania* spp. / Fausto de Souza. - Araçatuba : [s.n.], 2010
42 f. : il. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2010
Orientadora: Profa. Valéria Marçal Félix de Lima

1. *Leishmania* 2. Citometria de fluxo 3. Cão 4. Células T CD4+ Foxp3+

CDD 636.0896

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FAUSTO DE SOUZA – Nascido na cidade de São Paulo, em 19 de Janeiro de 1981, formado em Farmácia com Habilitação em Análises Clínicas pela Universidade Estadual de Londrina – PR em 2004, Farmacêutico concursado pela Prefeitura Municipal de Araçatuba desde 2005, Coordenador da Farmácia Popular do Brasil, unidade de Araçatuba – SP,

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Rubens e Elicinia e irmãos Fabio e Fernanda, pelo esforço e dedicação para me deixarem em vida a maior herança que posso ter que é a educação tanto acadêmica quanto com o trato com as pessoas com que convivemos.

Ao Prof. Dr. Phileno Pinge Filho, Prof. Vera Lucia Hideo Tatakihara, Prof. Dr. José Victor Jankevicius, Aparecida Malvezi, Pedro e Zui, todos funcionários do Departamento de Patologia da Universidade Estadual de Londrina – PR com quem iniciei, ainda na graduação em projetos de iniciação científica, a tomar gosto pela pesquisa científica e sair de um nível “-10” segundo Prof. Phileno, para um nível “0” que estou hoje, e isto me motiva a um dia chegar ao nível “10” destes mestres com quem aprendi muito.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre iluminar os caminhos certos que devo seguir.

Aos meus pais e irmãos, por se sacrificarem muitas vezes para que eu tivesse oportunidades que eles mesmos nunca tiveram na vida.

À Grazielle, minha namorada, pelo companheirismo, paciência, amor e até mesmo pelas vezes que me ajudou a tratar dos hamsters do biotério.

Agradeço muitíssimo à minha orientadora, Profa. Adj. Dra. Valéria Marçal Félix de Lima, por ter me dado mais um voto de confiança ao me aceitar pela segunda vez para o programa de pós-graduação, pela dedicação, sabedoria e todo o suporte necessário para o desenvolvimento das pesquisas da melhor maneira possível.

Aos meus amigos-irmãos, Gabriel, Betão, Piuí, Narigão, Ivo, Elo, Jacaré e Geléia, pelo apoio nas horas difíceis longe da família, assim como nos momentos alegres e pelas discussões, debates e estudos compartilhados em Londrina, no centro acadêmico, congressos e principalmente nos bares, que muito fizeram crescer meu senso crítico sobre o mundo e aprendi saber encarar melhor e não ter medo dos desafios da vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Odontologia – Unesp, Câmpus de Araçatuba, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Aos funcionários do CCZ, principalmente ao Julio, pela ajuda incondicional na coleta de material dos cães com leishmaniose.

Aos amigos de laboratório Marília, Karina e Luiz, pela colaboração durante os experimentos e nas discussões sempre construtivas, e às novas colegas de laboratório Mariana, Larissa e Denise, que darão continuidade na busca do

conhecimento científico reiniciando um ciclo de pesquisadores no laboratório de imunologia.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	9
CAPÍTULO 1.....	
1 REVISÃO DA LITERATURA.....	
1.1 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	10
1.2 ASPECTOS GERAIS E EPIDEMIOLÓGICOS.....	13
1.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA ADAPTATIVA CANINA E CÉLULAS T REGULATÓRIAS NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	15
REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO 2	
1 ARTIGO CIENTÍFICO.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CCZ	Centro de Controle e Zoonoses
CD4	Linfócito T auxiliar
CD8	Linfócito T citotóxico
D.O.	Densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FcR	Receptor da porção constante do anticorpo
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
Foxp3	Forkhead box p3
IFN- γ	Interferon gama
iv	Intravenoso
kDa	Quilodalton
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
p	Probabilidade
PBS	Solução Salina Tamponada com fosfato
PE	Ficoeritrina
RPMI	Meio de cultura celular desidratado, desenvolvido pelo Instituto Roswel Park Memorial
Th1	T <i>helper</i> (auxiliar) tipo 1
Th2	T <i>helper</i> (auxiliar) tipo 2
Treg	Linfócito T regulatório
UNESP	Universidade Estadual Paulista

CAPÍTULO 1

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

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

A transmissão de *Leishmania (L.) chagasi* se dá pela picada de fêmeas de insetos dípteros que medem 2-3 mm, bem adaptados ao ambiente peridomiciliar. Estes flebotomíneos distribuem-se por toda a América Latina e são conhecidos popularmente como mosquitos-palha ou birigui e pertencentes à família Psychodidae. No Brasil, o principal vetor do protozoário no continente americano é o *Lutzomyia longipalpis*. Recentemente, *Lutzomyia cruzi* foi também incriminado como vetor da doença no Estado do Mato Grosso do Sul (CAMARGO-NEVES et al., 2001) na transmissão de *Leishmania (L.) infantum* (DOS SANTOS et al., 2003) e o vetor *Lutzomyia evansi* na Colômbia e Venezuela (BEJARANO et al., 2001). Estudos recentes indicam a possibilidade da transmissão por outros vetores invertebrados como *Ctenocephalides felis* (FERREIRA et al., 2009) e *Rhipicephalus sanguineus* (COUTINHO et al., 2005).

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

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

Um reservatório é um animal que serve de fonte para a infecção humana. O cão apresenta todas as características de um ótimo reservatório, pois vive em contato íntimo com humanos, apresenta uma área de distribuição sobreposta à humana, é suscetível ao agente patogênico, funciona como fonte de alimentação para o vetor, desenvolve alto parasitismo cutâneo apresentando alta taxa de infecção. Além disso, a doença no cão apresenta uma evolução crônica permitindo que o cão sobreviva pelo menos até o próximo período de transmissão (BRAY, 1982). O período de incubação pode variar de 3 meses até 2 anos (GENARO, 2000).

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

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

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

A confirmação do diagnóstico pode ser realizada por métodos diagnósticos diretos, tais como: citologia, isolamento e cultivo do parasita, e detecção molecular do parasita pela reação em cadeia da polimerase (PCR), em amostras de sangue, pele, linfonodos, conjuntiva ou medula óssea de cães infectados. A sensibilidade e especificidade da PCR dependem de diferentes fatores, incluindo tipos de iniciadores, número de cópias do DNA alvo, método de extração de DNA, biópsia do material e tipos de protocolo da PCR (GONTIJO; MELO, 2004; METTLER et al., 2005).

Devido às limitações dos métodos diagnósticos diretos, têm se pesquisado técnicas indiretas e não invasivas, especialmente aquelas relacionadas à detecção de anticorpos no soro do animal. Tais métodos devem ter sensibilidade e especificidade satisfatórias, não serem dispendiosos e serem de execução simples, especialmente para permitir seu uso em inquéritos epidemiológicos (BRASIL, 2008). O método sorológico ELISA tem sido empregado por ser um teste sensível, com facilidades técnicas e econômicas (LIMA et al., 2003). O teste ELISA indireto utiliza antígenos totais de *Leishmania* spp. Ele é comumente empregado para diagnóstico, por apresentar sensibilidade de 90% e especificidade de 93,3% em cães sintomáticos (CÂNDIDO et al., 2008).

Outro importante avanço na área do diagnóstico indireto da LVC foi à identificação de antígenos imunodominantes e a produção de recombinantes (MOHAMMED et al., 1985), entre esses o k39, uma proteína recombinante localizada no DNA do cinetoplasto de *Leishmania* spp., constituinte de uma proteína de 230 kDa da família Kinesina. A proteína rK39 apresenta seqüência idêntica em sete espécies de *Leishmania* spp. A conservação de uma seqüência de 39 aminoácidos repetitivos confere a esta proteína epítomos de alta densidade e identidade específica com as espécies *L. donovani* e *L. chagasi*. A reatividade com outros tripanossomatídeos mostrou-se negativa e a presença de anticorpos anti-rK39 indicaria a infecção ativa (MOLINA et al., 1994). A proteína recombinante k39 tem sido utilizada em testes imunocromatográficos rápidos (*dipsticks*) no diagnóstico sorológico da LVC em campo e em laboratório na África e na Índia (NAKATANI et al., 2001; QUINNELL et al., 2001). Seu uso no Brasil mostrou excelente performance no diagnóstico com 93% de sensibilidade e 97% de especificidade (DE ASSIS et al., 2008).

As leishmanioses são um problema de saúde pública e demandam diversos mecanismos para o seu controle. Primeiramente, o diagnóstico e tratamento dos doentes. Nos casos humanos as principais drogas utilizadas são a anfotericina B, miltefosine e pentamidina (OKWOR; UZONNA, 2009). No caso dos cães preconiza-se a eutanásia dos mesmos.

Os impactos no controle da LVC com a remoção e eutanásia dos cães soropositivos têm sido discutidos por se mostrar trabalhosa e de eficácia duvidosa. De acordo com estudos controlados, a propagação da leishmaniose visceral americana (LVA) não é afetada exclusivamente pela eliminação de cães soropositivos (DIETZE et al., 1997). Recentemente, com o advento de vacinas com potencial proteção aos cães frente à *Leishmania* spp., tem se estudado o impacto do uso deste método profilático na disseminação da doença (DA SILVA, et al., 2001).

Com isso, o controle do vetor ainda é o principal meio de prevenir a disseminação da leishmaniose.

1.2 ASPECTOS GERAIS E EPIDEMIOLÓGICOS

Existem cerca de 20 espécies de *Leishmania* patogênicas ao homem, mais de 30 espécies de flebotomíneos (insetos vetores), muitas espécies de mamíferos, susceptíveis e além do ciclo zoonótico, apresentam também ciclos enzoótico e antroponozoonótico (LAINSON; SHAW, 1987).

Desde 1990, os limites da distribuição geográfica das leishmanioses tem se expandido significativamente. Estima-se que mais de 2 milhões de novos casos ocorrem no mundo todo ano e que mais de 12 milhões possivelmente estejam infectadas, número provavelmente subestimado, pois só há comunicação compulsória em 32 dos 88 países endêmicos para esta doença (WHO, 2006). Em 2006, mais de 5000 casos de leishmaniose visceral foram reportados à Organização Pan-Americana de Saúde, a maioria deles no Brasil (PAHO, 2007).

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

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

A LV possui ampla distribuição no Velho e no Novo Mundo situando-se entre as sete endemias prioritárias da Organização Mundial da Saúde. A LV afeta 500 mil pessoas por ano e aproximadamente 90% de todos os casos notificados no mundo provém de Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão. A doença atinge principalmente as populações mais pobres desses países, associada à desnutrição, saneamento básico e à ocupação desordenada do ambiente (WHO, 2007). No Novo Mundo a doença é conhecida como Calazar neo-tropical ou LVA.

Entre 2001 e 2005, foram notificados 15.340 casos de LV em humanos no Brasil, a maior incidência ocorreu no Nordeste, com 92% do total de casos, seguida pelo Sudeste (4%), Norte (3%) e Centro-Oeste (1%) (BRASIL, 2008). Ocorre em zonas rurais, porém encontra-se também em centros urbanos, estando em franca expansão no estado de São Paulo. O primeiro relato de ocorrência de leishmaniose visceral canina no estado de São Paulo ocorreu em 1998 e a leishmaniose visceral humana em 1999, na cidade de Araçatuba (GALIMBERTTI et al., 1999). Desde então a doença vem se disseminando, totalizando 40 municípios com transmissão canina nesta região (SÃO PAULO, 2010).

Em 2004 foram notificados 130 casos humanos. Já em 2005, foram 140 casos novos registrados. Destes, 51% na região de Araçatuba. Em 2006, a transmissão humana ou canina havia sido registrada em 49 municípios. Cerca de 5,3% destes municípios apresentam transmissão humana e canina, sendo Araçatuba um deles. Em 2007 a 2009 registrou-se 200 casos de leishmaniose visceral humana, com 18 óbitos (CAMARGO-NEVES et al., 2001; CAMARGO-NEVES, 2007; SÃO PAULO, 2010).

Existe uma grande polêmica em torno da origem da LV no Novo Mundo – se ela foi introduzida recentemente, na época da colonização européia e causada pela espécie *L. infantum*, ou há vários milhões de anos, juntamente com a introdução dos canídeos, devendo a espécie ser classificada como *L. chagasi* (GONTIJO; MELO, 2004). Os achados de altas taxas de infecção em canídeos originários da Amazônia sugerem a origem autóctone (LAINSON et al, 1987). Entretanto, estudos utilizando

técnicas bioquímicas e moleculares consideram a *L. chagasi* e a *L. infantum* uma única espécie e aceitam a hipótese de origem recente nas Américas (MAURICIO et al., 2000).

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

A constante migração do homem, com seus cães infectados, de áreas altamente endêmicas para aquelas nas quais a LVA não é endêmica, explicaria a introdução do agente etiológico e a manifestação de novos focos, sendo o risco maior para a população humana residente que convive com *L. longipalpis* e com as raposas e/ou outras fontes silvestres locais (SERVICE, 1989).

1.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA ADAPTATIVA CANINA E CÉLULAS T REGULATÓRIAS NA LEISHMANIOSE VISCERAL

No cão, a infecção por *Leishmania (L.) chagasi* não necessariamente indica o desenvolvimento da doença. Alguns cães infectados conseguem controlar a expansão do parasita e curar a infecção, em outros a infecção permanece subclínica por um longo período (assintomáticos). Em outros cães que não têm a capacidade de controlar o parasita, a doença progride e depois de 2 a 4 meses de incubação os sintomas aparecem (MORENO; ALVAR, 2002). Na resposta adaptativa, as células T são de fundamental importância na regulação da imunidade ao parasita. A resistência à infecção está associada à baixos níveis de anticorpos específicos e a existência de imunidade celular com ativação de células T CD4⁺ Th1 específicas para *Leishmania* spp., com produção de IL-2, IFN- γ e TNF- α que ativam os macrófagos (PINELLI et al., 1994).

As células T CD8⁺ também parecem estar envolvidas com a resistência à infecção (BARBIÉRI, 2006). A ativação pelo parasita das células T CD4⁺ resulta no aumento da sobrevivência do parasita e no aparecimento das lesões, em razão das ações supressivas de suas citocinas nos macrófagos (ABBAS et al., 2000; BARBIÉRI, 2006).

A imunossupressão celular constitui o aspecto mais importante na patogênese e progressão da doença canina. A supressão da resposta das células T é observada pela ausência da resposta linfoproliferativa “*in vitro*” a antígenos de

Leishmania spp. e reação de hipersensibilidade do tipo tardia negativa para *Leishmania* spp (DOS SANTOS et al. 2008). Em cães infectados com *Leishmania infantum* observa-se uma redução no número de linfócitos T CD4⁺ e concomitante proliferação do parasita nos macrófagos, seguida da disseminação do parasita para vários órgãos (BOURDOISEAU et al., 1997; HERVÁS et al., 1996). Há uma correlação direta entre os níveis das células T CD4⁺ e a resposta celular ao parasita. A recuperação do animal doente, após o tratamento, é acompanhada pelo aumento da porcentagem das células T CD4⁺ (ALVAR et al., 2004).

Alguns experimentos demonstraram que as células T CD4⁺ podem prevenir, em certas circunstâncias, reações do sistema imune, prejudiciais ao próprio organismo (POWRIE; MASON, 1990; SAKAGUCHI et al., 1982). Este reconhecimento da população de células T com papel regulador da resposta imune começou a ser desvendado com a co-expressão de CD25, uma cadeia do receptor de IL-2, pelas células T CD4⁺ (SAKAGUCHI et al., 1995). A descoberta que células T CD4⁺ CD25⁺ podiam suprimir a proliferação de células T *in vitro* levou à adoção deste ensaio como meio de estudar a função das células T regulatórias (Treg) em populações de linfócitos.

Em estudos com camundongos portadores de diversas imunopatologias associou-se o desenvolvimento de uma síndrome autoimune a uma mutação no gene do fator de transcrição Foxp3, necessário para que células T CD4⁺ se tornassem células Treg (CHANTILA et al., 2000; FONTENOT et al., 2003; HORI et al., 2003). A expressão do fator transcricional Foxp3 parece ser o único fator essencialmente associado às células T regulatórias naturais. Tanto humanos quanto camundongos deficientes da proteína funcional Foxp3 sofreram sintomas de doença autoimune severa (RAMSDELL, 2003). Até o presente momento, a avaliação da expressão de Foxp3 é o melhor método disponível para quantificação da população de células Treg em cães, devido seu papel crítico no desenvolvimento e função das células Treg, além do fato de a sequência do Foxp3 ser altamente conservada em diversas espécies (BILLER et al., 2007).

Células T CD4⁺ que expressam o fator de transcrição Foxp3 (forkhead Box p3) representam uma população de linfócitos que agem como mediadores da tolerância, cuja função supressora é vital para a manutenção da homeostase do sistema imune. Estas células Treg suprimem a resposta imune através de diversos mecanismos incluindo contato célula-a-célula, produção de citocinas

antiinflamatórias e modulando o estado de ativação e função das células apresentadoras de antígenos (APC) (SHEVACH, 2009).

Um dos principais mecanismos pelo qual as células Treg podem suprimir diretamente a ação das células T Foxp3⁻ é o consumo competitivo de IL-2, por apresentarem receptores de alta afinidade por esta citocina (SHEVACH, 2009).

As células Treg compõem 5-10% da população de linfócitos T CD4⁺ sanguíneos e são caracterizadas pela expressão constitutiva de CD25 e baixa expressão de CD45RB (BLUESTONE; ABBAS, 2003). Além destes marcadores de superfície, diversos outros já foram encontrados como CD134 (OX 40), GITR (TNFRSF18), CD152 (CTLA-4) e CD103, mas nenhum com especificidade para esta população celular.

Outros pesquisadores já estudaram o papel das células Treg em diversas patologias e espécies encontrando variações no padrão de citocinas produzidas e na quantidade destas células, dependendo do agente infeccioso, do hospedeiro, do órgão alvo estudado e da fase evolutiva da doença (CAMPANELLI et al., 2006; MENDEZ et al., 2004; OLDENHOVE et al., 2009)

As células Treg podem estar correlacionadas a outros mecanismos regulatórios. Em modelo experimental murino C57BL/6 infectado com *Toxoplasma gondii* as células T Foxp3⁺ diminuíram a produção da molécula antiapoptótica Bcl-2, além de expressarem grandes quantidades do marcador de apoptose anexin-V e caspase-3 (OLDENHOVE et al., 2009), indicando uma possível interação desses mecanismos.

Em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum* observou-se um aumento da população de células Treg no sítio da infecção, na fase aguda da doença (RODRIGUES et al., 2009). Já em pacientes humanos com leishmaniose visceral não se observou diferença estatística na população de células Treg sanguíneas quando comparado ao grupo controle sadio (NYLÉN et al., 2007). Em cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp., com sinais clínicos compatíveis com a leishmaniose visceral, nenhum estudo avaliou a presença ou a função dessa subpopulação celular.

Estudos relacionando células Treg, citocinas produzidas localmente e a influência delas na resposta imune frente à *Leishmania* spp. irão elucidar questões sobre a patogenia, evolução da doença e relação parasita-hospedeiro na leishmaniose visceral canina. Com isso, estudou-se se a infecção natural canina por

Leishmania spp. influencia na quantidade de células Treg que se diferenciam no baço e sangue periférico destes animais.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and molecular Immunology**. 4.ed. Philadelphia : W.B. Saunders. p. 553, 2000.

ALENCAR, J.E. Leishmaniose Visceral no Brasil. **Rev. Med. Univ. Fed. Ceará**. p. 17-18: 129-148, 1978.

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

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

BEJARANO, E.E. ; URIBE, S. ; ROJAS, W. ; VELEZ, I.D. Presence of *Lutzomyia evansi*, a vector of American visceral leishmaniasis, in a urban area of the Colombian Caribbean coast. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 95, p. 27-28, 2001.

BILLER, B.J., ELMSLIE, R.E., BURNETT, R.C., AVERY, A.C., DOW, S.W. Use of FoxP3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 116, p.69-78, 2007.

BLUESTONE, J.A.; ABBAS, A.K. Natural versus adaptative regulatory T cells. **Nat. Rev. Immunol.** v. 3, p. 253-257, 2003.

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; MAGNOL, J.P.; SAINT ANDRE, I.; CHABANNE, L. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 56, p. 345-35, 1997.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27082>. Acesso em 10 de junho de 2010.

BRAY, R.S. The zoonotic potential of reservoirs of leishmaniasis in the Old World. **Ecol. Dis.** v.1, p. 257-267, 1982.

BRITO, F.L.C.; ALVES, L.C.; ORTIZ, J.P.D.; MAIA, F.C.L.; SILVA JUNIOR, V.A.; LAUS, J.L. Uveitis associated to the infection by *Leishmania chagasi* in dog from Olinda city, Pernambuco, Brazil. **Cienc. Rural.** v. 34, p. 925-929, 2004.

CAMARGO-NEVES, V.L.F. DE; KATZ, G.; RODAS, L.A.C.; POLETTO, D.W.; LAGES, L.C.; SPINOLA, R.M.F.; CRUZ, O.G. Use of spacial analysis tools in the epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis, Araçatuba, São Paulo, Brazil, 1998 – 1999. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.17 (5), p. 1263-1267, 2001.

CAMARGO-NEVES, V.L.F. Grupo de Estudos em Leishmanioses. Classificação epidemiológica dos municípios para a leishmaniose visceral Americana. **BEPA.** v. 4(39), p.27-39. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa39_lva.htm 2007.

CAMPANELLI, A.P. ; ROSELINO, A.M. ; CAVASSANI, K.A. ; PEREIRA, M.S. ; MORTARA, R.A. ; BRODSKYN, C.I. ; GONÇALVES, H.S. ; BELKAID, Y. ; BARRAL-NETTO, M. ; BARRAL, A. ; SILVA, J.S. CD4+ CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. **J. Infect. Dis.**v.193, p.1313-1322, 2006.

CÂNDIDO, T.C., PERRI, S.H.V., GERZOSCHKWITZ, T.O, LUVIZOTTO, M.C.R., LIMA, V.M.F. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on crude and purified antigen in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in symptomatic and oligosymptomatic dogs. **Vet. Parasitol.** v.157, p.175-181, 2008.

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

CHANTILA, T.A.; BLAESER, F.; HO, N.; LEDERMAN, H.M.; VOULGAROPOULOS, C.; HELMS, C.; BOWCOCK, A. M. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. **J. Clin. Invest.** v. 106, p. 75-81, 2000.

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

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

DA SILVA, V.O.; BORJA-CABRERA, G.P.; CORREIA PONTES, N.N.; DE SOUZA, E.P.; LUZ, K.G.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C.B. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). **Vaccine.** v. 19, p.1082–1092, 2001.

DE ASSIS, T.S.M.; BRAGA, A.S.C.; PEDRAS, M.J.; BARRAL, A.M.P.; SIQUEIRA, I.C. Validation of the rapid immunochromatographic test IT-LEISH for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. **Epidemiol. Serv. Saúde.** v. 17, p.110-116, 2008.

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

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

DIETZE, R.; BARROS, G.B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clin. Infect. Dis.** v. 25, p. 1240-1242, 1997.

DOS SANTOS, S.O., ARIAS, J.R., DE PAIVA, H.M., FURLAN, M.B., FERREIRA, W.F. The presence of *Lutzomyia longipalpis* in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*. Corumbá, Mato Grosso do Sul state. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 36, p. 633-634. 2003.

DOS SANTOS, W.L., JESUS, E.E., PARANHOS-SILVA, M, PEREIRA, A.M., SANTOS, J.C., BALEEIRO, C.O., NASCIMENTO, E.G., MOREIRA, E.D., OLIVEIRA, G.G., PONTES-DE-CARVALHO, L.C. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 123, p. 251-259, 2008.

FERREIRA, M.G.P.A.; FATTORI, K.R.; SOUZA, F.; LIMA, V.M.F. Potencial role of dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Vet. Parasitol.** (2009). doi:10.1016/j.vetpar.2009.06.026

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

FONTENOT, J.D.; GAVIN, M.A.; RUDENSKY, A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nat. Immunol.** v.4, p. 330-336, 2003.

GALIMBERTTI, M.Z.; KATZ, G.; CAMARGO-NEVES, V.L.F.; RODAS, L.A.C.; CASANOVA, C.; COSTA, I.P. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 32(1 Suppl), p. 217-218, 1999.

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

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

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

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science.** v. 299, p. 1057-1061, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

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

MENDEZ, S., RECKLING, S.K., PICCIRILLO, C.A., SACKS, D., BELKAID, Y. Role for CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. **JEM.** v.2, p.201-210, 2004.

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

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

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

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

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

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

NYLÉN, S., MAURYA, R., EIDSMO, L., MANANDHAR, K., SUNDAR, S., SACKS, D. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4⁺ CD25⁺ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **JEM.** v. 4 (204), p. 805-817, 2007.

OKWOR, I.; UZONNA, J.E. Immunotherapy as a strategy for treatment of leishmaniasis: a review of the literature. **Immunotherapy.** v. 1 (5), p. 765-776, 2009.

OLDENHOVE, G., BOULADOUX, N., WOKLFERT, E. A., HALL, J. A., CHOU, D., SANTOS, L., O'BRIEN, S., BLANK, R., LAMB, E., NATARAJAN, S., KASTENMAYER, R., HUNTER, C., GRIGG, M. E., BELKAID, Y. Decrease of Foxp3⁺ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. **Immunity.** v.31, p. 772-786, 2009.

PAHO (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION). Leishmaniasis: 2007 update. Disponível em <<http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/leish-2007.pdf>> Acesso em junho de 2010.

PINELLI, E.; ELLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; REAL, G. RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally

and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun.** v. 62(1), p. 229-235, 1994.

POWRIE, F.; MASON, D. OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. **J. Exp. Med.** v. 172, p.1701-1708, 1990.

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

RAMSDELL, F. Foxp3 and natural regulatory T cells: Key to a cell lineage? **Immunity.** v. 19, p.165-168, 2003.

RODRIGUES, O.R., MARQUES, C., SOARES-CLEMENTE, M., FERRONHA, M.H., SANTOS-GOMES, G.M. Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection. **Immunobiology.** v. 214, p.101-111, 2009.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J. Immunol.** v. 155, p. 1151-1164, 1995.

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

SÃO PAULO. CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO. Leishmaniose visceral americana humana – casos autóctones e óbitos de leishmaniose visceral americana, segundo município de residência, 1999-2005. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lvah_auto9904.htm>. Acesso em 13 maio de 2010.

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

SHEVACH, E.M. Mechanisms of Foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. **Immunity**. v. 30, p. 636-645, 2009.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Magnitude of problem, 2006. Disponível em: <www.who.int/en/>. Acesso em Junho de 2010.

CAPÍTULO 2

1. ARTIGO CIENTÍFICO

Quantificação de células T regulatórias no baço e sangue de cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp.

SOUZA, Fausto de ^a; FATTORI, Karina Reinaldo ^b; LIMA, Valéria Marçal Félix de ^{a,*}

^a Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus Araçatuba, SP, Brasil

^b Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus Jaboticabal, SP, Brasil

* Correspondência com autor: Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de Odontologia, UNESP, Campus Araçatuba, Rua Clovis Pestana, 793, Bairro Jardim Dona Amélia, CEP 16050-680, SP, Brasil. Tel.: +55 18 36361422

E-mail: vmflima@fmva.unesp.br (V.M.F. de Lima)

Quantificação de células T regulatórias no baço e sangue de cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp.

RESUMO - Os cães são o principal reservatório doméstico de *Leishmania* (*L.*) *chagasi*. No hospedeiro vertebrado, incluindo o homem, o parasita pode causar leishmaniose visceral, transmitida aos humanos. As células T regulatórias (Treg) estão envolvidas na indução de supressão de mecanismos efetores relacionados à imunidade celular. Para investigar a possível implicação das células Treg durante a infecção por *Leishmania* spp., a presença de Treg no baço e no sangue periférico foi avaliada em cães naturalmente infectados e com sinais clínicos compatíveis com a doença. Quinze cães adultos provenientes do Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Araçatuba - SP, Brasil, com reação sorológica positiva para antígenos de *Leishmania* (*L.*) *chagasi* determinada por ELISA indireto e teste rápido rK39 (Kalazar Detect™ Rapid Test, InBios Inc-Seattle, WA-USA). Cinco cães saudáveis, provenientes de área não endêmica foram incluídos no estudo. As células T regulatórias foram quantificadas em amostras de baço e em células mononucleares do sangue periférico utilizando-se anticorpos monoclonais e citometria de fluxo. No baço, menor número de células Treg foi observado em cães infectados do que nos controles ($p < 0,05$), enquanto que nenhuma diferença foi observada nas células mononucleares de sangue periférico. Esses resultados sugerem que as células Treg estão envolvidas na infecção por *Leishmania* spp. e que podem ter um papel na persistência do parasita e o estabelecimento da infecção crônica.

Palavras-chave: *Leishmania* spp., citometria de fluxo, células T CD4⁺ Foxp3⁺

Quantitation of regulatory T cell population in spleen and blood in *Leishmania* spp. naturally infected dogs

SUMMARY - Dogs are the main domestic reservoirs of *L. (L.) chagasi*. Once in the vertebrate host, the parasite may cause visceral leishmaniasis, which can also be transmitted to humans. Regulatory T cells (Treg) have been shown to be involved in the direct induction of immunosuppression of effector cellular immune response. To investigate the possible involvement of T reg cells during *Leishmania* infection, the presence of Treg cells from the spleen and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of dogs naturally infected with *L. (L.) chagasi*, and showing clinical signs, was quantified. A total of 15 adult dogs from the Center for Zoonosis Control of Araçatuba - SP, Brazil, positive for *Leishmania (L.) chagasi* by indirect ELISA and rapid test rK39 (Kalazar Detect™ Rapid Test, InBios Inc-Seattle, WA-USA), and 05 adult healthy dogs from non endemic area were included in the study. Samples from spleen and PBMC were used for quantification of Treg by flow cytometry using monoclonal antibodies. In spleen, Treg levels in infected dogs were lower than in control group ($p < 0.05$); in PBMC, no differences were observed between the two groups. These results suggest that Treg population is involved in *Leishmania* spp. infection and may play a role in promoting parasite persistence and establishment of chronic infection.

Keywords: Leishmaniasis, flow cytometry, CD4⁺ Foxp3⁺ T cells

1. Introdução

Leishmaniose visceral (LV) é uma doença crônica causada por diferentes espécies de *Leishmania* spp., pertencentes ao complexo *Leishmania* (*L.*) *donovani*. Esta doença atinge 65 países e a maioria dos casos humanos ocorre em cinco países, incluindo Brasil (DESJEUX, 2004). No Brasil, a maior incidência ocorre no Nordeste, com 92% do total de casos, seguido por Sudeste (4%), Norte (3%) e Centro-Oeste (1%) (BRASIL, 2008). Na cidade de Araçatuba, estado de São Paulo, a LV foi primeiro detectada em cães em 1998 e em seres humanos em 1999 (GALIMBERTTI et al., 1999).

Nos cães, as células T são de fundamental importância na regulação da resposta imunológica ao parasita. A resistência à infecção está associada à ativação de células T CD4⁺ Th1 específicas para *Leishmania* spp., que produzem IFN- γ ativando macrófagos (PINELLI et al., 1994). As células T CD8⁺ também parecem estar envolvidas com a resistência à infecção (BARBIERI, 2006). A ativação das células T CD4⁺ Th2 pelo parasita resulta no aumento da sobrevivência do parasita e no aparecimento das lesões, em razão das ações supressivas de suas citocinas nos macrófagos (PINELLI et al., 1994; ABBAS et al., 2000).

A supressão da imunidade celular constitui o aspecto mais importante na patogênese e progressão da doença canina. A supressão da resposta das células T é observada pela ausência da reposta linfoproliferativa “*in vitro*” a antígenos de *Leishmania* spp. assim como reação de hipersensibilidade do tipo tardia negativa (DOS SANTOS et al., 2008). Em cães infectados com *Leishmania infantum*, observa-se uma redução no número de linfócitos T CD4⁺ e concomitante proliferação do parasita nos macrófagos e disseminação do parasita para vários órgãos (BOURDOISEAU et al., 1997; HERVÁS et al., 1996). Há uma correlação direta entre os níveis das células T CD4⁺ e a resposta celular ao parasito, onde a recuperação do animal doente, após o tratamento, é acompanhada pelo aumento da porcentagem das células T CD4⁺ (ALVAR et al., 2004).

Células T com potencial regulatório ou imunossupressor são reconhecidamente importantes durante a resposta imune contra diversos patógenos, limitando a imunopatologia ao mesmo tempo em que facilitam a sobrevivência do patógeno no hospedeiro (MILLS, 2004). Esta capacidade dos patógenos de persistirem no sítio da infecção por longo tempo sem serem eliminados por células T

CD4⁺CD25⁻ efetoras, é mediada por mecanismos dependentes ou não de IL-10 expressa por células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ (Treg) que fazem o equilíbrio entre a resposta do hospedeiro e a sobrevivência do patógeno (BELKAID et al., 2002). Esta população de células T supressoras tem a capacidade de limitar a ação das células T efetoras e assim prevenir ou finalizar respostas imunes exageradas, ou no caso de células T autorreativas, diminuindo as respostas autoimunes (MITTRUCKER; KAUFMANN, 2004).

As células Treg compõem 5-10% da população de linfócitos T CD4⁺ do sangue periférico e são caracterizadas pela expressão constitutiva de CD25 e baixa expressão de CD45RB (BLUESTONE; ABBAS, 2003). Além destes marcadores de superfície, diversos outros já foram encontrados como CD134 (OX 40), GITR (TNFRSF18), CD152 (CTLA-4) e CD103, mas nenhum com especificidade para esta população celular. A expressão do fator transcricional Foxp3 (forkhead box p3), parece ser o único fator essencialmente associado à células Treg naturais, e tanto humanos quanto camundongos deficientes da proteína funcional Foxp3 sofreram sintomas de doença autoimune severa (RAMSDELL, 2003). Até o presente momento, a avaliação da expressão de Foxp3 é o melhor método disponível para quantificação da população de células Treg em cães (BILLER et al., 2007) e ainda não há estudos referentes a quantificação desta população celular em cães naturalmente infectados com *Leishmania* spp.

Portanto, com o intuito de estudar esta população celular no baço e sangue periférico do principal hospedeiro peridomiciliar com maior potencial de ser fonte de infecção para o homem, em uma região endêmica para LV, comparou-se a quantidade de células T CD4⁺ Foxp3⁺ presentes no sangue e no baço de cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp. com a de cães saudáveis.

2. Material e Métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista – UNESP, sob o protocolo nº 002232.

2.1. Critérios de inclusão

Utilizaram-se 15 cães (*Canis familiaris*), adultos jovens, de várias raças ou sem raça definida, de pesos e estados nutricionais diversos, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Araçatuba.

Como critério de inclusão adotou-se que os cães deveriam apresentar pelo menos três sinais clínicos característicos da leishmaniose visceral canina (LVC), tais como: perda de peso, caquexia, apatia, linfadenomegalia, hepato-esplenomegalia, alterações dermatológicas (queda de pêlos, lesões ulcerativas, prurido intenso, pelame opaco e dermatite seborréica), conjuntivite, uveíte, hipertermia, onicogribose, emaciação, êmese e diarreia. Posteriormente, estes cães foram diagnosticados como positivos para leishmaniose através de triagem prévia com o teste rápido com rK-39 e posteriormente por ELISA indireto em amostras de soro

Os 05 cães controles (não infectados) foram obtidos em áreas não endêmicas e apresentavam bom estado de saúde, hemograma normal e sorologia negativa para leishmaniose tanto por ELISA indireto quanto pelo teste rápido rK39.

2.2. Detecção de anticorpo anti *Leishmania (L.) chagasi* por ELISA indireto

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

A placa de poliestireno foi coberta com 20 µg/mL de antígeno total do parasita *L. (L.) chagasi* (LIMA et al., 2003), em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6. Após incubação a 4°C por toda a noite, a placa foi lavada com PBS - 0,05% Tween 20 e bloqueada por 1 hora, à temperatura ambiente, com 150 µL por poço de uma solução de PBS contendo 10% de soro fetal bovino. Após nova lavagem, as amostras de soro, diluídas 1:400 em PBS + 10% de soro fetal bovino + 0,05% Tween 20, foram adicionadas a cada poço, em duplicata, e incubadas por 3 horas à temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente, adicionaram-se 100 µL de anticorpo anti-IgG de cão conjugado à peroxidase (Sigma, St. Louis, U.S.A.) em cada poço, na diluição de 1:1000, a placa foi lavada novamente e adicionado 100 µL da solução reveladora, contendo 0,4 mg/mL O-phenylenediamine (Sigma, St. Louis, U.S.A.), 0,4 µL/mL H₂O₂, ácido cítrico 0,1M, e fosfato de sódio dibásico 0,2M. A

reação foi bloqueada com 50 μ L de HCl 16%. A densidade óptica (DO) foi avaliada utilizando o leitor Spectra CountTM (Packard Bio Science Company, U.S.A.) e o ponto de corte adotado foi de 0,270 (LIMA et al., 2003).

2.3. Detecção de anticorpo anti K39 pelo teste rápido

Foi utilizado o Kit Kalazar DetectTM Rapid Test (InBios Inc-Seattle, WA-USA) no soro dos cães, de acordo com as instruções do fabricante.

Os testes de triagem rK39 e ELISA indireto foram escolhidos devido alta sensibilidade e especificidade apresentada em cães sintomáticos naturalmente infectados com *Leishmania* (DE ASSIS et al., 2008, CANDIDO et al., 2008).

2.4. Obtenção das amostras

A colheita das amostras dos cães naturalmente infectados foi precedida pela eutanásia realizada com 0,05 mg/kg de maleato de acepromazina intravenosa (iv) e 15 mg/kg de tiopental sódico iv, seguida de 10 ml de cloreto de potássio 19,1% pela mesma via, segundo protocolo preconizado pelos órgãos e comitês de ética responsáveis do Estado de São Paulo. Após a eutanásia, os fragmentos de baço foram colhidos e mantidos em meio de cultura celular RPMI-1640 (Sigma,U.S.A.). O sangue foi obtido por punção venosa da veia cefálica ou pela punção cardíaca direta, imediatamente antes da eutanásia, coletado em tubos contendo EDTA e mantido sob refrigeração (4°C). As amostras foram processadas para imunomarcação logo após a colheita, não ultrapassando 30 min de intervalo.

Nos cães sadios (grupo controle negativo), provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) – UNESP, o procedimento de obtenção das amostras foi o mesmo, exceto pela eutanásia, o fragmento de baço foi retirado por excisão cirúrgica após sedação.

2.5. Avaliação da população de células T regulatórias

A avaliação da porcentagem da população das células Treg foi realizada pela marcação das células mononucleares do baço e sangue periférico com anticorpos monoclonais. A aquisição dos dados foi realizada no citômetro EasyCyteMini

(Guava, EUA), e a análise dos dados no programa CytoSoft 4.1 contando 10.000 células por amostra.

As células mononucleares do sangue periférico e do baço foram separadas em gradiente Ficoll–Paque (Amersham Biosciences®), seguindo as recomendações do fabricante. Quando houve muitas hemácias junto à população de células mononucleares, as células do baço foram processadas com 5mL de tampão de lise de hemácias contendo cloreto de amônio 7,46 g/L e tris (hidroximetil) aminometano 2,06 g/L a 4°C por 10 min, centrifugadas a 2000rpm por 5min e lavadas com PBS por 3 vezes. A imunodeteção de Foxp3 foi realizada após processo de permeabilização com uma solução de Triton® X-100 0,025% (Sigma-Aldrich) por 3min.

Para bloqueio dos receptores Fc (FcR), as células foram suspensas em PBS contendo 1% de albumina sérica bovina, 0.1% de azida sódica e 20% de soro bovino fetal. As células foram marcadas duplamente com anticorpos monoclonais específicos conjugados a fluorocromos: Anti-CD4-canino conjugado a isotiocianato de fluoresceína-FITC (AbD Serotec®) e anti-Foxp3-murino conjugado a ficoeritrina-PE (eBioscience) ou isotipos controles conjugados a FITC e PE por 30 minutos seguindo as recomendações do fabricante. É válida a reação cruzada entre anticorpo anti-Foxp3 murino para detectar Foxp3 canino e identificar células T regulatórias caninas *in vivo* (BELKAID et al., 2002).

2.6. Análise estatística

A comparação entre os grupos estudados foi analisada usando-se teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Resultados foram considerados como significantes quando $p < 0,05$. As análises estatísticas e os gráficos foram efetuados utilizando o programa computacional GraphPad Prism 3 (GraphPad Software, Inc. CA. USA).

3. Resultados e Discussão

Os sinais clínicos mais freqüentes nos cães positivos foram: emagrecimento (100%), onicogrifose (100%), dermatite seborreica (80%), lesões e úlceras (66,7%), hiperqueratoses (53,3%), alopecia periorbital (46,7%) e lesões oculares (46,7%).

Para a quantificação de células Treg primeiro foi feita a seleção da população de células mononucleares pelo tamanho e granulosidade desta população, selecionou-se as células $CD4^+$ marcadas com FITC (Fig. 1A), e por último quantificou-se a população duplamente marcada com FITC e PE (Fig. 1B). No baço, a comparação da porcentagem de células Treg em cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp. e em cães controles mostrou porcentagem 5 vezes maior no grupo controle (Fig. 1C).

O resultado do presente estudo confirmou a presença de células T $CD4^+$ expressando Foxp3 no baço. Tais resultados se assemelham aos observados por RODRIGUES et al. (2009) em infecção experimental de camundongos BALB/c por *Leishmania infantum*, quando também se observou a presença de células $CD4^+Foxp3^+$ nos órgãos linfóides, incluindo o baço.

Um dos mecanismos utilizados pelas células Treg para regular a resposta adaptativa é a secreção de IL-10 (ABBAS; LICHTMAN, 2005). No baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania* spp. é detectada alta produção de IL-10 quando comparado a cães controles (MANNA et al., 2006); a redução de Treg em cães infectados sugere que outras fontes celulares possam ser responsáveis pela alta produção de IL-10 observada nos cães infectados. Em humanos com leishmaniose visceral em processo agudo da doença, a principal fonte de IL-10 provém de células T $CD4^+$ que não exibem o padrão regulatório (NYLÉN et al., 2008), assim, é possível que em cães em processo crônico da doença, as células Treg também não sejam uma fonte importante dessa citocina, devido à baixa porcentagem destas células observada no tecido esplênico.

A quantidade de células Treg no baço pode ter influência da fase evolutiva da doença. Em infecção experimental de camundongos BALB/c por *Leishmania infantum*, Rodrigues et al. (2009) observaram tendência de diminuição das células Treg em linfonodos drenantes e baço na fase crônica da doença. Assim como observado em nosso estudo, onde os cães apresentavam sinais clínicos compatíveis com essa fase. Entretanto estes resultados divergem dos apresentados por Nylén et al. (2007) que não observaram diferenças na porcentagem de células Treg esplênicas entre pessoas com diagnóstico sorológico de LV no período agudo da doença e indivíduos controles.

A diminuição de células Treg no baço, órgão alvo da doença, é semelhante à observada por Oldenhove et al. (2009) em modelo experimental murino, onde

camundongos C57BL/6 infectados com *Toxoplasma gondii* apresentaram diminuição dessa população na mucosa do trato gastro-intestinal. Esta redução de células Treg mostrou estar relacionada a situações altamente patogênicas, onde a resposta imune está altamente polarizada levando à morte do hospedeiro infectado.

Embora tenhamos observado redução da população de células Treg em cães infectados, em outros estudos, tem-se observado o acúmulo ou proliferação de células Treg no sítio da infecção. Observou-se aumento das células Treg em linfonodos de pacientes HIV⁺ durante a fase crônica da doença (ANDERSSON et al., 2005), assim como em camundongos C57BL/6 infectados por via subcutânea com *Leishmania major* durante a fase aguda (MENDEZ et al., 2004), evidenciando que o comportamento dessa população celular é dependente do agente etiológico, dos fatores regulatórios envolvidos na resposta adaptativa e da evolução da doença.

A tendência de diminuição de células Treg em relação ao total de células T CD4⁺ em cães naturalmente infectados comparados aos controles, foi também observada no baço, onde se encontrou diferença estatística significativa, sendo 3 vezes maior no segundo grupo (Fig. 1D).

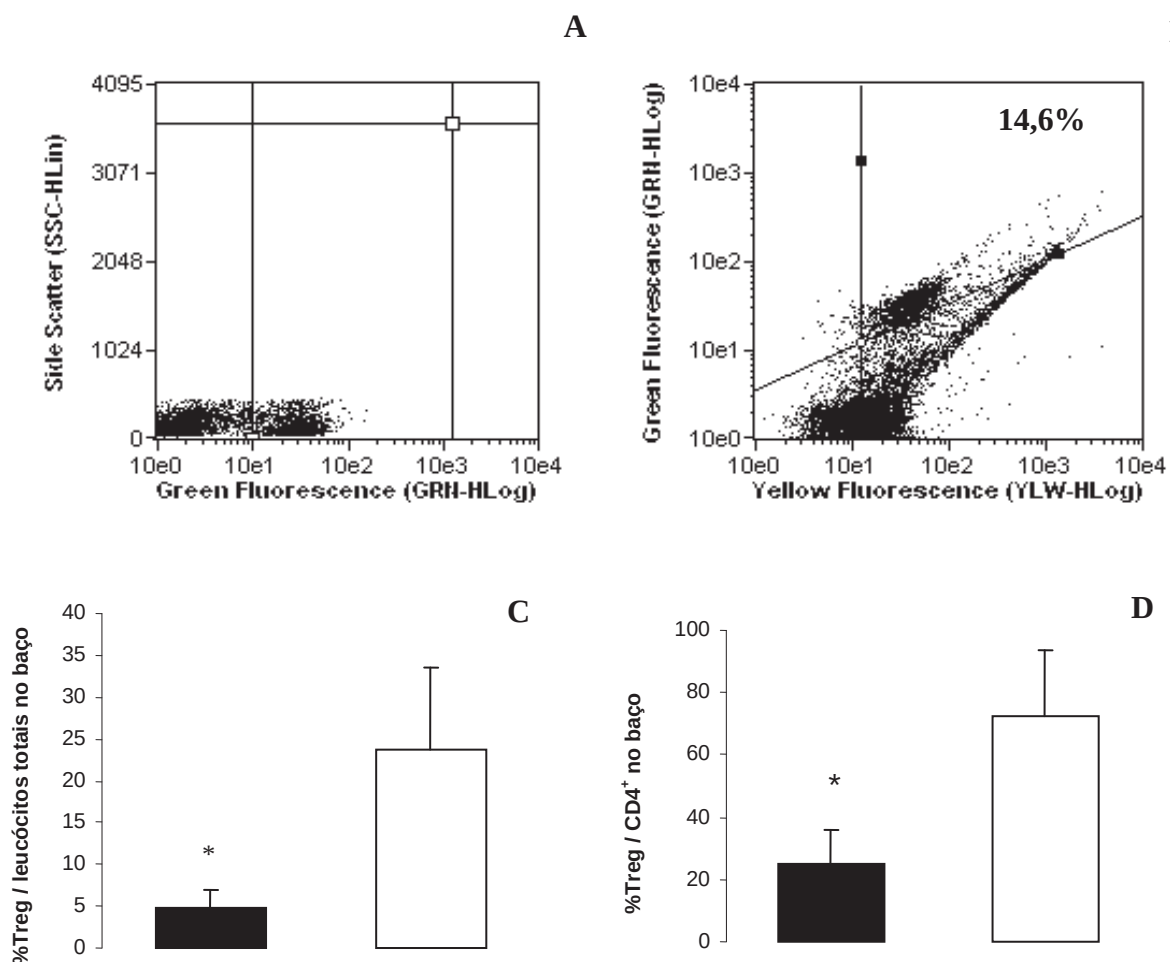


Figura 1. Dot-plot das populações celulares do baço de cão naturalmente infectado por *Leishmania* spp marcadas com anticorpo monoclonal anti-CD4 conjugado a FITC em (A) (a “gate” retangular delimita as células CD4⁺) e anticorpo monoclonal anti-Foxp3 conjugado a PE em (B) (no quadrante superior direito observa-se a população celular CD4⁺Foxp3⁺). Resultado representativo do grupo. Quantificação da porcentagem de células Treg no baço em relação aos leucócitos totais (C), e em relação às células T CD4⁺ (D) do grupo de cães naturalmente infectados com *Leishmania* spp. (■) e no grupo de cães controles (□). Valores representam a média $\pm$ desvio padrão, $p < 0.05$, teste de Mann-Whitney

No sangue as células Treg variaram entre 5-10%, resultado semelhante ao observado em outros estudos com cães saudáveis (KEPPEL et al., 2008; O’NEILL et al., 2009). Diferente do observado no baço, no sangue não foi observada diferença estatisticamente significativa na porcentagem de células T regulatórias entre os dois grupos tanto em relação aos leucócitos totais quanto em relação às células T CD4⁺ (Fig. 2). Resultados estes semelhantes aos encontrados em pacientes humanos com LV (NYLÉN et al., 2007).

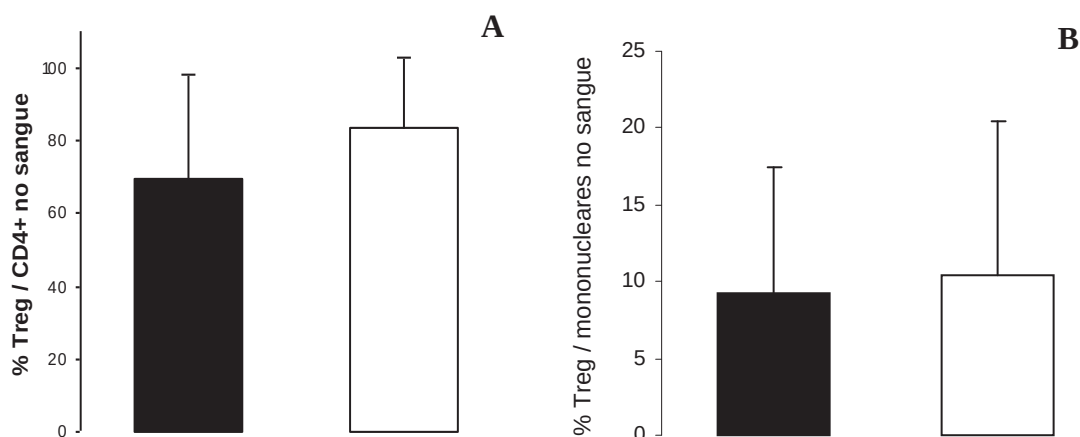


Figura 2. Quantificação de células Treg no sangue de cães naturalmente infectados (■) com *Leishmania* spp. e em cães controles (□). Comparação entre a porcentagem de células Treg em relação às células T CD4⁺ (A). Comparação entre a porcentagem de células Treg em relação às células mononucleares (B). Valores representam a média $\pm$ desvio-padrão, $p < 0,05$, teste de Mann-Whitney.

No grupo de cães naturalmente infectados, a comparação da porcentagem de células Treg em relação aos leucócitos totais do sangue e baço não apresentou diferença estatística significativa, entretanto, a porcentagem de Treg em relação às células T CD4⁺ deste grupo foi aproximadamente 3 vezes maior no sangue do que no baço ($p < 0.05$).

O grupo estudado vive em uma região endêmica e está sujeito a freqüentes reinfecções pelo parasita, o que poderia causar um desequilíbrio na diferenciação de células Treg do sangue periférico e baço, diminuindo em sítios onde o parasita já se estabeleceu e aumentando em regiões de infecção mais recente (MENDEZ et al., 2004), em infecção experimental por *L. major* em camundongos C57BL/6, observaram aumento de células Treg no local da infecção mais recente e uma diminuição no sítio da primeira infecção.

Na LVC, o parasita é inoculado na pele do hospedeiro, e posteriormente irá infectar células do sistema fagocítico-mononuclear sanguíneas, indo finalmente se alojar em órgãos alvo, principalmente o baço, onde se replica. Possivelmente a ausência de alteração na porcentagem de Treg no sangue periférico dos cães infectados comparados aos cães controle se deve ao fato do parasita utilizar tal via somente para atingir os órgãos alvos onde faz a sua replicação assim, o que ocorre no sangue periférico não seria representativo dos órgãos linfóides.

Sabe-se que a leishmaniose visceral canina está associada a diversas alterações secundárias à infecção com características autoimunes, entre elas a glomerulonefrite (GINEL et al., 2008). É possível que a diminuição das células Treg desencadeadas pelo processo infeccioso tenha relação com a ativação policlonal das células B, indução de hipergamaglobulinemia e produção de auto-anticorpos, pois em diversos modelos experimentais a alteração em número ou na atividade das células Treg causa doença autoimune (MITTRUCKER; KAUFMANN, 2004).

Apesar da clara redução de células Treg no tecido esplênico, o mecanismo responsável por essa diminuição não foi elucidado e o mecanismo apoptótico poderia estar relacionado. A infecção intravenosa por *L. donovani* em camundongos BALB/c induz apoptose significativa nas células T no baço (ALEXANDER et al., 2001), fenômeno também observado em cães naturalmente infectados (FATTORI, 2009). Além disso, foi demonstrado em camundongos infectados com *Toxoplasma gondii* que as células T Foxp3⁺ diminuem a produção da molécula antiapoptótica Bcl-2, além de expressarem grandes quantidades do marcador de apoptose anexin-V e

caspase-3 (OLDENHOVE et al, 2009). Como cães com leishmaniose visceral apresentam altas taxas de apoptose nos linfócitos T (FATTORI, 2009), é possível que a apoptose tenha relação com essa redução na população de células Treg.

A diminuição da quantidade de células Treg pode ocasionar uma desregulação das células T efectoras e conseqüentes falhas imunológicas, o que pode proporcionar a infecção por outros agentes. Este processo pode se desenvolver eventualmente devido a depleção não específica de células T fazendo com que os cães se tornem mais suscetíveis a infecções, especialmente, erlichiose e babesiose (OLIVEIRA et al., 2008), e ocasionalmente com doenças neoplásicas, principalmente tumores hematopoiéticos (FOGLIA MANZILLO et al., 2008).

Os resultados indicam que, em cães infectados por *Leishmania* spp., há uma diminuição de células Treg no baço que poderia criar um microambiente favorável para a instalação e persistência do parasita. Futuros estudos serão necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos na redução da população de células Treg. Esses resultados contribuem para o entendimento da resposta imune em cães infectados com *Leishmania* spp., podendo auxiliar no desenvolvimento de medidas preventivas para esses animais.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K., LICHTTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5.ed. Elsevier , 2005.

ALEXANDER, C.E., KAYE, P.M., ENGWERDA, C.R. CD95 is required for the early control of parasite burden in liver of *Leishmania donovani*-infected mice. **Euro J. Immunol.** v.31, p.1199-1210, 2001.

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

ANDERSSON, J., BOASSO, A., NILSSON, J., ZHANG, R., SHIRE, N.J., LINDBACK, S., SHEARER, G.M., CHOUGNET, C.A. Cutting edge: the prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients. **J. Immunol.** v.174, p.3143-3147, 2005.

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

BELKAID, Y., PICCIRILLO, C.A., MENDEZ, S., SHEVACH, E.M., SACKS, D.L. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature.** v.420, p.502-507, 2002.

BILLER, B.J., ELMSLIE, R.E., BURNETT, R.C., AVERY, A.C., DOW, S.W. Use of FoxP3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.116, p.69-78, 2007.

BLUESTONE, J.A., ABBAS, A.K. Natural versus adaptative regulatory T cells. **Nat. Rev. Immunol.** v.3, p.253-257, 2003.

BOURDOISEAU, G., BONNEFONT, C., MAGNOL, J.P., SAINT ANDRE, I., CHABANNE, L. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.56, p.345-35, 1997.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27082>. Acesso em 10 de junho de 2010.

CANDIDO, T.C., PERRI, S.H.V., GERZOSCHKWITZ, T.O, LUVIZOTTO, M.C.R., LIMA, V.M.F. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on crude and purified antigen in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in symptomatic and oligosymptomatic dogs. **Vet. Parasitol.** v.157, p.175-181, 2008.

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

CORRÊA, A.P., DOSSI, A.C., DE OLIVEIRA VASCONCELOS, R., MUNARI, D.P., DE LIMA, V.M. Evaluation of transformation growth factor β 1, interleukin-10, and

interferon- γ in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet. Parasitol.** v.143, p.267-274, 2007.

DAS, G., VOHRA, H., RAO, K., SAHA, B., MISHRA, G. C. *Leishmania donovani* infection of a susceptible host results in CD4⁺ T-cell apoptosis and decreased Th1 cytokine production. **Scand. J. Immunol.** v.3, p.307-310, 1999.

DE ASSIS, T.S.M., BRAGA, A.S.C., PEDRAS, M.J., BARRAL, A.M.P., SIQUEIRA, I.C. Validation of the rapid immunochromatographic test IT-LEISH for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. **Epidemiol. Serv. Saude.** v. 17, p.110-116, 2008.

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

DOS SANTOS, W.L., JESUS, E.E., PARANHOS-SILVA, M., PEREIRA, A.M., SANTOS, J.C., BALEEIRO, C.O., NASCIMENTO, E.G., MOREIRA, E.D., OLIVEIRA, G.G., PONTES-DE-CARVALHO, L.C. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.123, p.251-259, 2008.

FATTORI, K.R. Apoptose em linfócitos T esplênicos e do sangue periférico em cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*. **Dissertação (mestrado)** – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias , 2009.

FOGLIA MANZILLO, V., PAGANO, A., GUGLIELMINO, R., GRADONI, L., RESTUCCI, B., OLIVA, G. Extranodal gammadelta-T-cell lymphoma in a dog with leishmaniasis. **Vet. Clin. Pathol.** v.37, p.298-301, 2008.

GALIMBERTTI, M.Z., KATZ, G., CAMARGO-NEVES, V.L.F., RODAS, L.A.C., CASANOVA, C., COSTA, I.P. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.32, p.217-218, 1999.

GINEL, P.J., CAMACHO, S., LUCENA, R. Anti-histone antibodies in dogs with leishmaniasis and glomerulonephritis. **Res. Vet. Sci.** v.85, p.510-514, 2008.

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

KEPPEL, K.E., CAMPBELL, K.L., ZUCKERMANN, F.A., GREELEY, E.A., SCHAEFFER, D.J., HUSMANN, R.J. Quantitation of canine regulatory T cell populations, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.123, p.337-344, 2008.

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

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

MENDEZ, S., RECKLING, S.K., PICCIRILLO, C.A., SACKS, D., BELKAID, Y. Role for CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. **JEM.** v.2, p.201-210, 2004.

MILLS, K.H. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? **Nat. Rev. Immunol.** v.4, p.841-855, 2004.

MITTRUCKER, H.W., KAUFMANN, S.H.E. Regulatory T cells and infection: suppression revisited. **Euro J. Immunol.** v.34, p.306-312, 2004.

NYLÉN, S., MAURYA, R., EIDSMO, L., MANANDHAR, K., SUNDAR, S., SACKS, D. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4⁺ CD25⁺ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **JEM.** v.4 (204), p.805-817, 2007.

OLDENHOVE, G., BOULADOUX, N., WOKLFERT, E. A., HALL, J. A., CHOU, D., SANTOS, L., O'BRIEN, S., BLANK, R., LAMB, E., NATARAJAN, S., KASTENMAYER, R., HUNTER, C., GRIGG, M. E., BELKAID, Y. Decrease of Foxp3⁺ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. **Immunity.** v.31, p.772-786, 2009.

OLIVEIRA, T.M., FURUTA, P.I., DE CARVALHO, D., MACHADO, R.Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v.17, p.7-11, 2008.

O'NEILL, K., GUTH, A., BILLER, B., ELMSLIE, R., DOW, S. Changes in Regulatory T Cells in Dogs with Cancer and Associations with Tumor Type. **J. Vet. Intern. Med.** v.23, p.875-881, 2009.

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

RAMSDELL, F. Foxp3 and natural regulatory T cells: Key to a cell lineage? **Immunity.** v.19, p.165-168, 2003.

RODRIGUES, O.R., MARQUES, C., SOARES-CLEMENTE, M., FERRONHA, M.H., SANTOS-GOMES, G.M. Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection. **Immunobiology.** v.214, p.101-111, 2009.

STRAUSS-AYALLI, D., BANETH, G., JAFFE, C.J. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. **Vet. Res.** v.8, p.547-564, 2007.

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