UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

EXPRESSÃO GÊNICA DE INTERFERON-GAMA, FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA E INTERLEUCINAS 2 E 5 NO BAÇO DE GATOS NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania* spp.

Karina Yukie Hirata

Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

EXPRESSÃO GÊNICA DE INTERFERON-GAMA, FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA E INTERLEUCINAS 2 E 5 NO BAÇO DE GATOS NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania* spp.

Karina Yukie Hirata

Orientadora: Prof[a]. Adjunto Mary Marcondes

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Câmpus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica)

ARAÇATUBA – SP

2015

Catalogação na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Hirata, Karina Yukie

H616e Expressão gênica de interferon gama, fator de necrose tumoral alfa e interleucinas 2 e 5 no baço de gatos naturalmente infectados por Leishmania spp. / Karina Yukie Hirata.

Araçatuba: [s.n], 2015
65f. il.; CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2015

Orientador: Prof Adj. Mary Marcondes

1.Resposta imune 2. Citocinas 3. Imunidade celular 4. Leishmaniose 5. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real I. T.

CDD 571.9646

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Expressão gênica de interferon-gama, fator de necrose tumoral alfa e interleucinas 2 e 5 no baço de gatos naturalmente infectados por Leishmania spp.

AUTORA: KARINA YUKIE HIRATA

ORIENTADORA: Dra. MARY MARCONDES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRA em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.

Dra. JULIANA PELOI VIDES

Dr. WAGNER LUIS FERREIRA

Dra. MARY MARCONDES

DATA DA REALIZAÇÃO: 15 de maio de 2015.

Presidente da Comissão Examinadora
Dra. MARY MARCONDES
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

KARINA YUKIE HIRATA – nascida em 25 de maio de 1987 na cidade de Taubaté – SP. Médica Veterinária graduada pela Universidade Estadual Paulista – Unesp, Câmpus de Araçatuba, no ano de 2010. Participou do Programa de Residência Médico-Veterinária na área Clínica Médica, Cirúrgica e Anestesiologia de Pequenos Animais, com ênfase em Clínica Médica, no período de fevereiro de 2011 a janeiro de 2013, pela mesma instituição. Em março de 2013 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária – FMVA, Câmpus de Araçatuba, na área de concentração em Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, sob orientação da Professora Adjunto Mary Marcondes. Em maio de 2013 tornou-se bolsista FAPESP.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Tamotsu Hirata, pelo amor, incentivo e por nunca medir esforços para que eu chegasse até aqui. Você é meu maior exemplo e meu maior orgulho. Eu te amo muito!

AGRADECIMENTOS

É extremamente satisfatório poder agradecer a cada pessoa que esteve presente, direta ou indiretamente, ao longo do desenvolvimento deste projeto. Sem a contribuição de cada um não seria possível que uma etapa tão importante fosse concluída.

Agradeço à minha orientadora, Mary Marcondes, por encontrar tempo diante de tantas ocupações, pela paciência, incentivo e por todo o ensinamento. Obrigada pela oportunidade de orientação, pelas broncas, pela confiança e pelos conselhos. Você é uma pessoa incrível e uma profissional admirável.

Aos meus pais e à minha irmã, Tamotsu, Célia e Jéssica, por todo o amor, pelo apoio incondicional e incentivo constante. Por nunca deixarem de acreditar que eu seria capaz, mesmo quando eu não acreditava. Vocês são meu porto seguro, eu amo muito vocês.

À minha avó Ondina que, de onde estiver, estará acompanhando a conclusão dessa etapa. Muito obrigada pelo tempo que se fez presente mesmo longe, por todas as orações, por estar sempre preocupada, mas nunca deixar de acreditar que tudo daria certo. Seu apoio e incentivo foram essenciais.

Aos amigos e grupo de pesquisa de citocinas em felinos, Augusto, Juliana e Ludmila. Muito obrigada pela companhia nos dias e noites de PCR, pelas conversas intermináveis, pela amizade, pelo apoio e comemoração a cada reação concluída. Sem vocês, nada disso seria possível.

Aos amigos, Flávia Volpato, Daniel Hoffmann, Juliana Vides, Lívia Castanhas, Augusto Schweigert, Acácio Pacheco e Ludmila Sobrinho. Obrigada pela amizade, companheirismo, apoio e risadas. Com certeza o caminho seria muito mais árduo sem a presença de vocês.

Aos pós-graduandos Guilherme Dias de Melo e Fernanda Müller, pela paciência ao ensinar a técnica de PCR.

Aos professores Cáris Maroni Nunes, Marcelo Vasconcelos Meireles e Valéria Marçal Félix de Lima, por cederem seus laboratórios e equipamentos para processamento das amostras deste experimento.

À professora Flávia Lopes, por toda a disponibilidade e paciência para ensinamentos da técnica de PCR.

À professora Sílvia Perri, pela disponibilidade e colaboração para realização das análises estatísticas.

À professora Márcia Dalastra Laurenti, por fornecer a cultura de *Leishmania infantum chagasi* (LIM50/FMUSP), e pela disponibilidade, dedicação, paciência e explicações esclarecedoras.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do projeto de pesquisa, bem como pela concessão da bolsa de mestrado, que foram essenciais para realização do experimento.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA - UNESP), por disponibilizar os meios necessários para desenvolvimento do projeto de pesquisa e por todo o aprendizado oferecido desde a graduação.

Aos proprietários e aos animais que participaram deste projeto de pesquisa.

E por último, porém não menos importante, à Deus, por me auxiliar nas melhores escolhas, nunca deixar que eu perdesse a fé, e sempre me aproximar de pessoas maravilhosas.

SUMÁRIO

	Página
1.INTRODUÇÃO.....	**01**
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	**03**
3.OBJETIVOS.....	**16**
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	**17**
4.1 Delineamento Experimental.....	17
4.1.1 Formação dos grupos.....	17
4.2 Procedimento cirúrgico e biopsia esplênica.....	18
4.3 Biopsia aspirativa de órgãos linfoides.....	18
4.4 Pesquisa de anticorpos anti-vírus da imunodeficiência felina (FIV) e de antígenos do vírus da leucemia felina (FeLV).....	19
4.5 Amplificação de DNA de *Leishmania* spp. por qPCR.....	20
4.5.1 Extração de DNA.....	20
4.5.2 Quantificação e Pureza do DNA.....	20
4.5.3 Padronização da qPCR para *Leishmania* spp.....	20
4.5.3.1 Cultura de *Leishmania infantum chagasi*.....	21
4.5.3.2 Determinação da concentração dos oligonucleotídeos senso e anti-senso.....	22
4.5.3.3 Curva padrão.....	22
4.5.3.4 qPCR das amostras de medula óssea.....	22
4.5.3.5 Determinação da carga parasitária.....	23
4.6 Avaliação da expressão gênica de mRNA das citocinas IFN-γ, TNF-α IL-2 e IL-5 no baço de gatos infectados e não infectados por *Leishmania* spp.....	23
4.6.1 Extração de RNA total.....	23
4.6.2 Quantificação e pureza do RNA.....	23
4.6.3 Transcrição reversa (RT-PCR).....	24

Página

4.6.4 Padronização da qPCR para avaliação da expressão de citocinas..... 24

4.6.5 Curva padrão do gene de referência GAPDH e das citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-2 e IL-5..... 26

4.6.6 Avaliação da expressão gênica das citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-2 e IL-5 no baço de gatos infectados e não infectados por *Leishmania* spp..... 26

4.7 Análise Estatística..... 27

5.RESULTADOS..... 28

5.1 Animais..... 28

5.2 PCR em tempo real das amostras de medula óssea..... 28

5.2.1 Determinação da carga parasitária na medula óssea..... 28

5.3 Expressão gênica de mRNA..... 29

5.3.1 Gene de referência GAPDH..... 29

5.3.2 Interferon gama (IFN-γ)..... 29

5.3.3 Fator de necrose tumoral alfa (TNF-α)..... 30

5.3.4 Interleucina (IL-2)..... 30

5.3.5 Interleucina (IL-5)..... 30

5.4 Correlação entre carga parasitária na medula óssea e expressão gênica das citocinas..... 32

6.DISCUSSÃO..... 33

7.CONCLUSÕES..... 39

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 40

APÊNDICES..... 54

APÊNDICE A. Padronização da qPCR para amplificação do DNA de *Leishmania* spp. – Titulação dos oligonucleotídeos e curva padrão..... 54

Página

APÊNDICE B. Padronização da RT-PCR em tempo real para avaliação da expressão gênica de citocinas – Titulação dos oligonucleotídeos e curva padrão..... 56

APÊNDICE C. Resultado da qPCR das amostras de medula óssea dos gatos do grupo infectado..... 61

APÊNDICE D. Expressão gênica de mRNA do gene de referência e das citocinas no baço de gatos infectados e não infectados por *Leishmania* spp..... 62

APÊNDICE E. RT-PCR em tempo real para avaliação da expressão gênica de citocinas – Cts médios..... 65

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – grau Celsius
µg – micrograma
µl – microlitro
µM – micromolar
Δ Ct – Ct do gene alvo – Ct do gene de referência
ΔΔ Ct – Δ Ct médio do grupo infectado – Δ Ct médio do grupo controle
bid – a cada 12 horas
BLAST – “Basic Local Alignment Search Tool”
CD4+ - imunofenótipo 4 (“cluster of differentiation”)
CD8+ - imunofenótipo 8 (“cluster of differentiation”)
cDNA – DNA complementar
CEEA – Comissão de Ética na Experimentação Animal
cm - centímetros
COBEA - Princípios Éticos na Experimentação Animal
Ct – ciclo limiar (“cycle threshold”)
DNA – ácido desoxirribonucléico
ELISA – ensaio imunoenzimático
et al. – e colaboradores
EUA – Estados Unidos da América
FAM – 6-carboxifluoresceína
FeLV – vírus da leucemia felina
FIV – vírus da imunodeficiência felina
FMVA – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
FOA – Faculdade de Odontologia de Araçatuba
GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
G1 – grupo 1
G2 – grupo 2
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
IM – intramuscular

IFN-γ – interferon gama

IL-1 – interleucina 1

IL-2 – interleucina 2

IL-4 – interleucina 4

IL-5 – interleucina 5

IL-6 – interleucina 6

IL-10 – interleucina 10

IL-12p40 – interleucina 12 subunidade 40

IL-13 – interleucina 13

IL-17A – interleucina 17 subtipo A

IL-17F – interleucina 17 subtipo F

IL-18 – interleucina 18

IL-21 – interleucina 21

IL-22 – interleucina 22

IL-23 – interleucina 23

IL-25 - interleucina 25

IL-26 – interleucina 26

IL-27 - interleucina 27

IV – intravenoso

kDNA – DNA do cinetoplasto

kg – quilograma

LIM - Laboratório de Patologia das Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

log – logaritmo

LV – leishmaniose visceral

mg – miligrama

MHC – molécula de histocompatibilidade principal

mL – mililitro

mm - milímetro

mRNA – RNA mensageiro

ng – nanograma

NK – células exterminadoras naturais

nM – nanomolar

p – probabilidade

pb – pares de base

PBS – solução salina tamponada

PCR – reação em cadeia da polimerase

PMBC – células mononucleares de sangue periférico

qPCR – PCR quantitativa ou PCR em tempo real

r^2 – coeficiente de correlação linear

RIFI – reação de imunofluorescência indireta

RT-PCR – reação da transcriptase reversa seguida de PCR

RNA – ácido ribonucléico

SAS - Statistical Analysis System

SC – subcutâneo

sid – a cada 24 horas

SP – São Paulo

spp. - espécie

TGF-β – fator transformador de crescimento beta

TNF-α – fator de necrose tumoral alfa

Th – linfócitos T auxiliares

Treg – linfócitos T regulatórios

VO – via oral

UNESP – Universidade Estadual Paulista

USP – Universidade de São Paulo

LISTA DE QUADROS

		Página
Quadro 1.	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores senso, anti-senso e sondas de hidrólise utilizadas para a avaliação da expressão gênica de citocinas nas reações em cadeia da polimerase por transcriptase reversa (Araçatuba-SP, 2015).....	**25**
Quadro 2.	Carga parasitária da medula óssea de oito gatos infectados por *Leishmania* spp. (Araçatuba-SP, 2015)....	**29**
Quadro 3.	Valores de ΔCt da expressão gênica das citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-2 e IL-5 obtido por qPCR em amostras de baço de gatos naturalmente infectados por *Leishmania* spp. (G1) e de gatos do grupo controle (G2) (Araçatuba-SP, 2015).....	**31**

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Desenvolvimento das linhagens das células Th1, Th2, Th17 e Treg a partir da célula TCD4$^+$. A diferenciação e a inibição de cada célula T são iniciadas pela presença de interleucinas específicas.....	**08**
Figura 2.	Punção biopsia aspirativa de linfonodo poplíteo esquerdo de felino proveniente de região endêmica para leishmaniose visceral (Araçatuba–SP, 2015).....	**19**
Figura 3 (A e B).	Punção biopsia aspirativa de medula óssea na região da crista ilíaca de felino proveniente de área endêmica para leishmaniose visceral (Araçatuba–SP, 2015).....	**19**
Figura 4.	"Boxplot" da expressão gênica de IFN-γ, TNF-α, IL-2 e IL-5 no baço de gatos do grupo infectado (G1) e do grupo controle (G2), representando mediana, mínimo e máximo. Teste t de Student, $p<0,05$ (Araçatuba-SP, 2015).....	**32**

EXPRESSÃO GÊNICA DE INTERFERON-GAMA, FATOR DE NECROSE TUMORAL-ALFA E INTERLEUCINAS 2 E 5 NO BAÇO DE GATOS NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania* spp.

RESUMO – Considerando-se a complexidade envolvida na resposta imune frente à infecção por *Leishmania* spp. nas diferentes espécies e a ausência de alterações clínicas na maioria dos gatos com leishmaniose visceral, o presente estudo teve como objetivos avaliar a expressão gênica de citocinas envolvidas na resposta imune celular (IFN-γ, TNF-α, IL-2) e humoral (IL-5) por PCR em tempo real em amostras de baço de 12 gatos naturalmente infectados por *Leishmania* spp., comparando-as à expressão gênica de quatro gatos saudáveis; e verificar a correlação entre a carga parasitária na medula óssea e a expressão gênica das citocinas no baço dos animais infectados. Nos gatos infectados observou-se aumento de 1,53 vezes na expressão gênica de IFN-γ quando comparada ao grupo de animais hígidos (p=0,0005). Não foi verificada diferença estatisticamente significante na expressão gênica das demais citocinas avaliadas entre gatos infectados e hígidos (TNF-α p=0,4203, IL-2 p=0,1968, IL-5 p=0,6390). Não foi observada correlação entre a carga parasitária na medula óssea e a expressão gênica das citocinas no baço dos gatos infectados por *Leishmania* spp. (IFN-γ p = 0,1570; TNF-α p = 0,5702; IL-2 p = 0,6081; IL-5 p = 0,2329). Estes resultados sugerem que o IFN-γ possa exercer papel relevante nos mecanismos de proteção contra a leishmaniose felina.

Palavras-Chave: citocinas, imunidade celular, imunidade humoral, leishmaniose, reação em cadeia da polimerase em tempo real

GENE EXPRESSION OF INTERFERON GAMA, TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA AND INTERLEUKINS 2 AND 5 IN SPLEEN OF CATS NATURALLY INFECTED BY *Leishmania* spp.

ABSTRACT – Considering the complexity of the immune response against *Leishmania* spp. infection in different species and the lack of clinical signs in the majority of cats with visceral leishmaniasis, this study aimed to evaluate the gene expression of some cytokines involved in cellular (IFN-γ, TNF α, IL-2) and humoral (IL-5) immune response by real-time PCR, on spleen samples from 12 cats naturally infected by *Leishmania* spp., comparing to the immune response of four healthy cats; and to verify the correlation between the parasite load in the bone marrow and the gene expression of cytokines in the spleen of infected animals. An increase of 1.53 times in IFN-γ gene expression was observed in infected cats when compared to healthy cats (p=0.0005). Statistically significant differences were not observed in gene expression of the cytokines evaluated between infected and healthy cats (TNF-α p=0.4203, IL-2 p=0.1968, IL-5 p=0.6390). Correlation was not observed between the parasite load in the bone marrow and the gene expression of cytokines in the spleen of cats infected by *Leishmania* spp. (IFN-γ p = 0.1570; TNF-α p = 0.5702; IL-2 p = 0.6081; IL-5 p = 0.2329). These results suggest that IFN-γ may play an important role in the protective mechanisms against feline leishmaniasis.

Keywords: cytokines, cellular immunity, humoral immunity, leishmaniasis, real-time polymerase chain reaction

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma das zoonoses mais importantes do mundo e encontra-se amplamente distribuída por regiões da Europa, Ásia, África e Américas. Os agentes etiológicos das diversas formas da doença são protozoários do gênero *Leishmania* e a transmissão ocorre pela inoculação de formas promastigostas do parasita por flebotomíneos. No Brasil, a leishmaniose visceral (LV) é causada pela *Leishmania infantum chagasi* e tem o cão como principal reservatório do parasita no ambiente doméstico, desempenhando importante papel no ciclo epidemiológico da doença. Inúmeros estudos têm descrito a ocorrência da enfermidade em gatos e já existem evidências de que os felinos são capazes de infectar o vetor, entretanto, a real participação da espécie felina no ciclo epidemiológico da LV ainda não está esclarecida.

Os gatos nem sempre desenvolvem quadro clínico da doença e possuem uma resposta imune humoral pouco evidente, demonstrando baixos títulos de anticorpos, o que leva à dificuldade de diagnóstico da doença nesta espécie animal quando da utilização de técnicas sorológicas. Além disto, o diagnóstico parasitológico em gatos infectados nem sempre é possível de ser realizado por meio direto, havendo necessidade de utilização de técnicas mais sensíveis tais como a imunoistoquímica ou a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Alguns pesquisadores aventam, ainda, a hipótese de que os gatos desenvolvam um padrão de resposta imune predominantemente celular frente à infecção por *Leishmania* spp., a qual pode estar relacionada a um perfil de resistência da espécie.

Em função do crescente número de gatos infectados, da dificuldade de diagnóstico de infecção nesta espécie animal e da possibilidade de resistência desta espécie ao desenvolvimento de sintomas de LV, é imprescindível que sejam realizados estudos na tentativa de elucidar o perfil de resposta imune de gatos frente a uma infecção por *L. infantum chagasi*. Nesse sentido, a compreensão da imunopatogenia da leishmaniose nestes animais contribuíria

não somente para auxiliar no diagnóstico da doença em áreas endêmicas, como também para futuros avanços no que se refere ao desenvolvimento de vacinas e tratamento.

Até onde é de nosso conhecimento, um único estudo avaliou a expressão gênica de algumas citocinas em gatos naturalmente infectados por *L. infantum chagasi*, ressaltando a importância da continuidade das investigações. Por essa razão, a presente pesquisa visou avaliar algumas citocinas que podem estar envolvidas na resposta imune de felinos naturalmente infectados, na tentativa de melhor compreender seu perfil de resposta imune.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Leishmanioses são zoonoses de grande importância em saúde pública e envolvem a participação de diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* spp., de flebotomíneos que atuam como vetores da doença, e de hospedeiros reservatórios, os quais desempenham função no ciclo de transmissão zoonótica e antropozoonótica. A leishmaniose visceral (LV) representa a forma mais severa da zoonose, pois é frequentemente fatal, se não tratada (DESJEUX, 2004). A enfermidade encontra-se amplamente disseminada, entretanto, cerca de 90% dos casos se concentram em áreas suburbanas e rurais de Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (ALVAR et al., 2012; WHO, 2012). No Brasil, seu agente etiológico é a *Leishmania infantum chagasi* (SHAW, 2006).

A principal forma de transmissão ocorre por meio da inoculação de formas promastigotas do protozoário por fêmeas de flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* spp. no Velho Mundo e *Lutzomyia* spp. no Novo Mundo (KILLICK-KENDRICK, 1990). No Brasil, a *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor que atua na transmissão da LV, porém no Mato Grosso do Sul a *Lutzomyia cruzi* também já foi relacionada à transmissão da doença (BRASIL, 2006). O cão é considerado o principal reservatório no ambiente doméstico (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012) e, embora as informações sobre o papel do gato no ciclo epidemiológico das leishmanioses sejam escassas, estudos prévios evidenciaram a ocorrência da infecção na espécie felina (BRESCIANI et al., 2010; CHATZIS et al., 2014; COELHO et al., 2011; COSTA et al., 2010; MAIA; CAMPINO, 2011; PENNISI et al., 2004; POLI et al., 2002; SOBRINHO et al., 2012; VIDES et al., 2011). Dois estudos comprovaram a capacidade infectiva de gatos ao vetor, no entanto a função desta espécie no ciclo da doença ainda é incerta (DA SILVA et al., 2010; MAROLI et al. 2007).

O primeiro relato de infecção natural por *Leishmania* spp. em um gato foi descrito em 1912, na Argélia, onde os autores identificaram a presença de formas amastigotas do parasita na medula óssea (SERGENT et al., 1912).

Desde então, estudos demonstrando a infecção natural por *Leishmania* spp. na espécie felina vêm sendo descritos ao longo dos anos e evidenciam a ocorrência da doença nesta espécie animal em países como Brasil (BRESCIANI et al., 2010; COELHO et al., 2011; COSTA et al., 2010; SOBRINHO et al., 2012; VIDES et al., 2011), Espanha (AYLLON et al., 2008; HÉRVAS et al., 1999; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007; SHERRY et al., 2011; SOLANO-GALLEGO et al., 2007), Grécia (CHATZIS et al., 2014; DIAKOU et al., 2009), Irã (HATAM et al., 2010), Israel (NASEREDDIN et al., 2008), Itália (PENNISI et al., 2004; POLI et al., 2002) e Portugal (CARDOSO et al., 2010; MAIA et al., 2010).

Muitos gatos se mantêm assintomáticos durante a infecção (CHATZIS et al., 2014). Naqueles que desenvolvem sintomas da doença, os sinais clínicos são inespecíficos e podem ser confundidos com manifestações clínicas de outras enfermidades desta espécie animal (MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007; POLI et al., 2002). Vides et al. (2011) e Chatzis et al. (2014), avaliando gatos infectados por *L. infantum chagasi e L. infantum*, respectivamente, em áreas endêmicas, descreveram como principais manifestações clínicas da doença as alterações cutâneas, oftálmicas, do sistema digestório e sinais sistêmicos, como desidratação, linfoadenomegalia periférica, hepatoesplenomegalia e alterações do estado de consciência.

Estados imunossupresores ocasionados por retroviroses, como a infecção pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV) ou pelo vírus da leucemia felina (FeLV), como ocorre em humanos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), podem favorecer a multiplicação do parasita e facilitar a transmissão do agente (MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007). Sobrinho et al. (2012), avaliando gatos de área endêmica para leishmaniose visceral, constataram associação entre a ocorrência de leishmaniose e a infecção por FIV, entretanto, não observaram relação entre leishmaniose e leucemia viral felina ou toxoplasmose.

De acordo com Barbosa et al. (2011), a *Leishmania* spp. parece ser capaz de regular a resposta imune do hospedeiro. A evolução da leishmaniose

no cão depende de uma complexa interação entre o indivíduo e o agente etiológico, e a capacidade do macrófago do hospedeiro em destruir o parasita de forma efetiva (SANTOS-GOMES et al., 2002). A ocorrência de sinais clínicos em cães correlaciona-se com a ausência de imunidade celular específica e ativação de uma resposta imune humoral, que permite a disseminação do parasita pelo organismo com consequente instalação de lesões inflamatórias generalizadas (MARTÍNEZ-MORENO et al., 1993).

Existem três tipos principais de linfócitos: as células “natural killer” (NK), que participam da imunidade inata; as células T, que regulam a imunidade adquirida e participam da imunidade celular; e as células B, que participam da imunidade humoral. Os linfócitos T podem ser classificados em T citotóxico, T auxiliar (T “helper”) e T de memória. Diversas subpopulações de linfócitos podem ser identificadas por meio de suas moléculas de superfície ou imunofenótipo, que são denominados CD (“cluster of differentiation”). O CD4+ é encontrado em linfócitos T auxiliares e representa um receptor para moléculas de histocompatibilidade principal (MHC) classe II das células apresentadoras de antígenos. O CD8+ é expresso por linfócitos T citotóxicos e é um receptor para as moléculas de MHC classe I (TIZARD, 2008). Células T auxiliares e células T citotóxicas exercem papel importante na resposta imune contra a infecção por *Leishmania* spp. em humanos com leishmaniose visceral, conectando-se às células da imunidade inata para o desenvolvimento de uma imunidade celular adaptativa eficiente, mediada principalmente pelas citocinas IFN-γ e IL-2 (PERUYHPE-MAGALHÃES et al., 2005).

Existem quatro subpopulações principais de linfócitos T auxiliares CD4+, denominadas linfócito T auxiliar 1 (Th1), T auxiliar 2 (Th2) e T auxiliar 17 (Th17) e T regulatórios (Treg). As linhagens celulares Th1 e Th2 têm como precursores os linfócitos Th0, que na presença de interleucina 12 (IL-12) diferenciam-se em Th1 e na presença de interleucina 4 (IL-4) em Th2. Já as células Th17 são estimuladas pela ação de interleucina 6 (IL-6) e fator transformador de crescimento beta (TGF-β), secretadas por células dendríticas,

juntamente com interleucina 21 (IL-21) ou interleucina 23 (IL-23) (LOCKSLEY; LOUIS, 1992; FIETTA; DELSANTE, 2009; TIZARD, 2008).

Em camundongos inoculados com *Leishmania major* demonstrou-se que os macrófagos infectados atuam como células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T do tipo CD4+. Estes são estimulados a produzir interleucinas e, dependendo do perfil incitado, ocorre desenvolvimento de Th1 ou Th2 (Figura 1). Além de agirem como células apresentadoras de antígenos no início da resposta imune, os macrófagos afetam o curso da infecção secretando interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), que aumentam a eficiência de fagócitos e de linfócitos citotóxicos (ALEXANDER; BRYSON, 2005; KUSHAWAHA et al., 2011).

Estudos avaliando células mononucleares de sangue periférico de cães naturalmente infectados por *L. infantum* demonstraram que, quando ativadas, as células Th1 produzem citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF-α, as interleucinas IL-2, IL-6 e o interferon gama (IFN-γ), um potente indutor da formação de superóxido e óxido nítrico pelos macrófagos. Esses radicais livres são tóxicos para os parasitas, podendo levar ao controle do parasitismo com eliminação da infecção. A IL-12, liberada no início do processo inflamatório, desempenha papel fundamental no controle da doença, já que influencia a resposta imune inata e a subsequente ativação de células TCD4+ do tipo Th1 (BARBIÉRI, 2006; PINELLI et al., 1999).

Por outro lado, quando a infecção por *L. infantum* em cães induz uma resposta por linfócitos Th2, há síntese das citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e TGF-β, com subsequente proliferação de linfócitos B e produção de anticorpos (BARBIÉRI, 2006; MARTÍNEZ-MORENO et al., 1995; SANTOS-GOMES et al., 2002). A produção de anticorpos pode ocasionar mais danos do que proteção ao hospedeiro, devido à formação de grande quantidade de complexos imunes circulantes que se depositam em vários órgãos e tecidos (PINELLI et al., 1999). Ainda, os linfócitos Th17 podem atuar na resposta imune contra o parasita produzindo citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26 e TNF-α, e possui um papel importante na

eliminação de patógenos e na indução de processos inflamatórios tissulares imunomediados (LUBBERTS, 2010).

Estudos prévios sugeriram uma dicotomização da resposta imune do cão frente à infecção por *Leishmania* spp. a partir da diferenciação de linfócitos T auxiliares em células Th1, associada a citocinas pró-inflamatórias, indução de resposta celular e imunidade protetora; e Th2, relacionada à produção de citocinas antiinflamatórias, indução de resposta humoral e progressão da doença (PINELLI et al., 1994; 1995; 1999). Contudo, Strauss-Ayali et. al (2007) avaliando baço, e Chamizo et al. (2005), Panaro et al. (2009) e Leal et al. (2014) avaliando células mononucleares de sangue periférico, identificaram um padrão misto de resposta imune na leishmaniose canina, com expressão de citocinas mediadas por células Th1 e Th2. Em humanos, há evidências de que um padrão misto de resposta imune também esteja presente na leishmaniose visceral, e a cura ou proteção contra a reinfecção esteja associada ao predomínio de linfócitos Th1 ou células TCD8+ (CHOUDHURY et al., 2013; GOTO; LINDOSO, 2004; KAUSHAL et al., 2014).

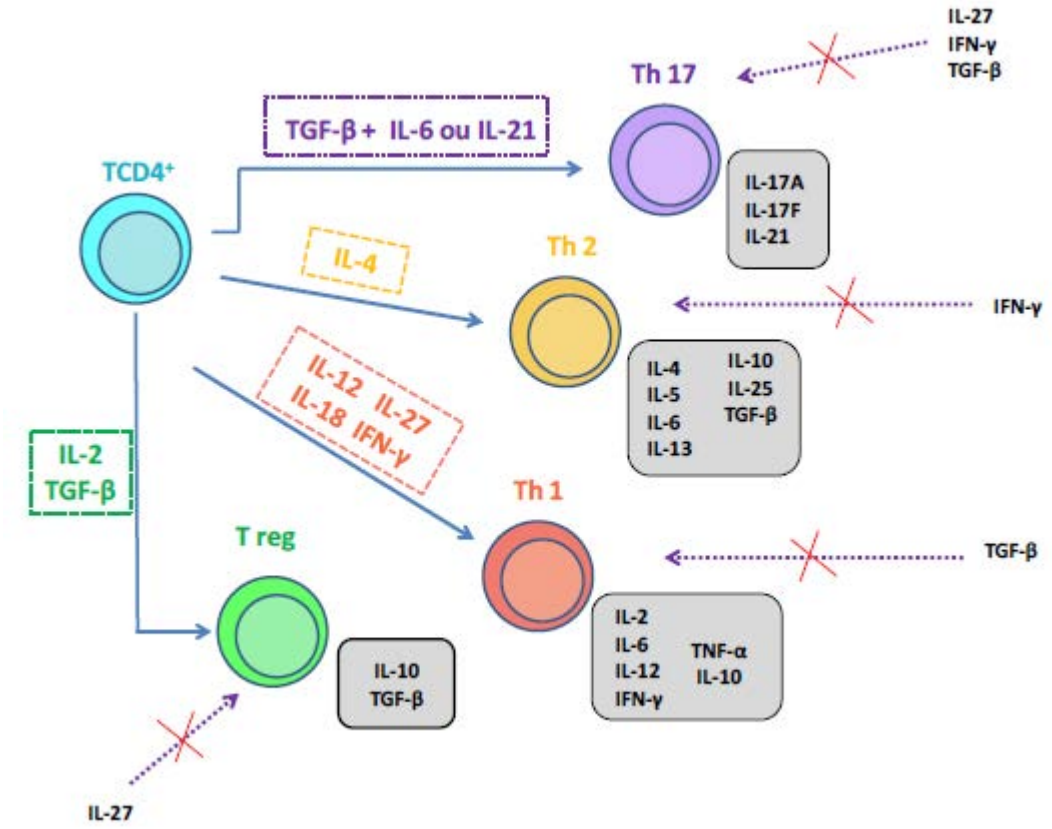


Figura 1. Desenvolvimento das linhagens das células Th1, Th2, Th17 e Treg a partir da célula TCD4+. A diferenciação de cada célula T é iniciada pela presença de citocinas específicas.

Linfócitos citotóxicos TCD8+, que são recrutados durante a infecção, podem estar envolvidos na imunidade protetora, provavelmente por sua capacidade de secretar IFN-γ ou por promover lise dos macrófagos infectados por *Leishmania* spp. (BARIBIÉRI, 2006; LOCKSLEY; LOUIS, 1992). Mary et al. (1999) sugeriram que os linfócitos TCD8+ possam atuar no controle da infecção por *L. infantum* em humanos assintomáticos, juntamente com uma subpopulação de linfócitos TCD4+ que produzem grandes quantidades de IFN-γ e de IL-5. A participação de linfócitos TCD8+ na imunidade protetora contra a leishmaniose também tem sido sugerida em cães (REIS et al., 2009). Reis et al. (2009) observaram participação de linfócitos TCD4+ e TCD8+ em cães infectados assintomáticos e com baixo parasitismo, possivelmente em

decorrência de uma maior capacidade do sistema imune do hospedeiro em realizar apresentação de antígeno e eliminação do parasita. Os mesmos autores constataram níveis maiores de células TCD8+ circulantes em cães assintomáticos quando comparados aos sintomáticos. Reis et al. (2014), observaram elevação dos níveis de linfócitos TCD8+ em esplenócitos de cães infectados por *Leishmania* spp. que se apresentavam assintomáticos, dados que foram correlacionados à baixa carga parasitária no mesmo órgão, sugerindo que essas células possam exercer função de controle da replicação do parasita.

Para a confirmação do diagnóstico de leishmaniose felina pode-se utilizar a citologia aspirativa de órgãos linfoides para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* spp. (CHATZIS et al., 2014; SOBRINHO et al., 2012; VIDES et al., 2011); os testes sorológicos de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) e teste de imunofluorescência indireta (RIFI) (COELHO et al., 2011; SOBRINHO et al., 2012; VIDES et al., 2011); a reação de imunoistoquímica de lesões cutâneas (VIDES et al., 2011) e a reação em cadeia da polimerase (CHATZIS et al., 2014; MAIA et al., 2008; MAIA et al., 2010; PENNISI et al., 2004). Os métodos moleculares têm demonstrado melhores resultados para o diagnóstico da doença tanto em cães (GOMES et al., 2008; MOREIRA et al., 2007; SANTOS et al., 2014), quanto em gatos (CHATZIS et al., 2014; MAIA et al., 2008; MAIA et al., 2010). A técnica de PCR em tempo real permite a quantificação da carga parasitária. Em estudo conduzido por Ramos et al. (2013), a quantificação da carga parasitária na medula óssea de cães com leishmaniose visceral apresentou variação de 0,015 a 34.940.375,000 parasitas/mL. Em relato de caso de leishmaniose felina descrito por Migliazzo et al. (2014), a carga parasitária em linfonodos, amostras de conjuntiva e blocos de parafina da mucosa oral demonstraram carga parasitária de 80.000,000; 350.000,000 e 750,000 parasitas/mL, respectivamente.

A resposta imunológica do gato infectado por *L. infantum* difere daquela provavelmente desenvolvida por cães. Enquanto estes últimos apresentam

predominantemente uma resposta humoral, a resposta imune dos felinos parece ser predominantemente celular explicando, desta forma, o baixo título de anticorpos identificado em animais infectados (SOLANO-GALLEGO et al., 2007). De acordo com Solano-Gallego et al. (2007), a resposta imune celular dessa espécie é efetiva o suficiente para controlar a infecção e conferir certo grau de resistência natural. Vides et al. (2011), ao avaliarem uma população de 55 gatos de uma área endêmica que apresentavam alterações dermatológicas, diagnosticaram leishmaniose visceral em 49%. Destes, 55% apresentavam títulos detectáveis aos testes sorológicos, entretanto, alguns animais revelaram títulos pouco expressivos e que se encontravam próximos ao ponto de corte, sugerindo que os gatos não parecem fazer soroconversão tão evidente quanto a que se observa nos cães sintomáticos diagnosticados com leishmaniose visceral.

Embora inúmeros estudos tenham sido descritos até o momento identificando a ocorrência de leishmaniose na espécie felina, pouco se sabe a respeito da resposta imune de gatos frente à infecção por *Leishmania* spp.. Vides (2014) conduziu o primeiro estudo que avaliou a expressão gênica de citocinas no baço de gatos infectados por *Leishmania* spp. e observou uma redução na expressão gênica de IFN-γ, IL-4, IL-10 e IL-12p40, sugerindo participação de células da imunidade inata na resposta imune contra o parasita, sem que ocorra diferenciação de linfócitos Th0 nas linhagens de linfócitos Th1 e Th2. Nesse sentido, o entendimento da resposta imunológica na leishmaniose felina é fundamental para a compreensão do curso clínico da doença nesta espécie.

Em cães, estudos demonstraram que, a partir do momento que o animal torna-se infectado por *L. infantum*, o parasita multiplica-se inicialmente em macrófagos no sítio de infecção e, na ausência de uma resposta imune protetora eficiente, pode se disseminar por via linfática ou hematógena, alcançando macrófagos da medula óssea, linfonodos, fígado e baço (BARBOSA et al., 2011; STRAUSS-AYALI et al., 2007). Diversos estudos têm sido descritos na tentativa de compreender os eventos imunológicos e traçar o

perfil de citocinas envolvidas na resposta imune do cão frente à infecção por *Leishmania* spp., avaliando os principais órgãos-alvo do parasita, como linfonodos (ALVES et al., 2009), medula óssea (QUINNELL et al., 2001), fígado (CÔRREA et al., 2007; MICHELIN et al., 2011), pele (MENEZES-SOUZA et al., 2011), baço (CAVALCANTI et al., 2015; CORRÊA et al., 2007; LAGE et al., 2007; MICHELIN et al., 2011; STRAUSS-AYALI, et al, 2007) e células mononucleares de sangue periférico (PBMC) (CHAMIZO et al., 2005; MANNA et al., 2006; PANARO et al., 2009; PINELLI et al.,1994; SANTOS-GOMES et al., 2002).

O baço representa um importante órgão-alvo na leishmaniose visceral, visto que é um dos tecidos em que ocorre replicação e é responsável por grande parte da resposta imune induzida pelo parasita (LAGE et al., 2007; REIS et al. 2014). Alterações histopatológicas observadas por Reis et al. (2009) e por Cavalcanti et al. (2015) em avaliação de tecido esplênico de cães infectados por *L. infantum chagasi* sugerem que o órgão desempenhe função relevante na resposta imune desta espécie animal durante o curso da doença. Estudos desenvolvidos por Côrrea et al. (2007), Lage et al. (2007), Strauss-Ayali et al. (2007) e Michelin et al. (2011), avaliando esplenócitos de cães com leishmaniose visceral, constataram que o baço é um órgão importante para avaliação de citocinas relacionadas à resposta imune celular e humoral. No entanto, Strauss-Ayali et al. (2007) observaram diferenças quando compararam os resultados obtidos com cães infectados por *Leishmania* spp. a estudos prévios realizados com humanos, e atribuíram essa divergência à considerável participação do hospedeiro na resposta imune contra o parasita.

Chamizo et al. (2005) e Nguyen et al. (2006) obtiveram resultados satisfatórios ao avaliarem a expressão gênica de citocinas pela técnica de PCR, pois trata-se de um método sensível e específico para esta finalidade. Para quantificação relativa de citocinas, a utilização de um gene de referência se faz necessária para normalização dos dados. Kessler et al. (2009) observaram que há variação considerável da expressão do gene de referência de acordo com a sua estabilidade no tecido testado. O GAPDH é um dos genes

de referência mais utilizados e demonstrou estabilidade aceitável em alguns tecidos de gatos.

O interferon gama (IFN-γ) exerce papel importante promovendo ou inibindo a maturação e a diferenciação de populações celulares associadas à resposta imune efetora, na ativação de macrófagos e na apoptose celular (YOUNG; HARDY, 1995). O IFN-γ representa uma das citocinas mais estudadas no que se refere à resposta imunológica contra a *Leishmania* spp. em cães e humanos, e pesquisas sugerem que o mesmo possa atuar promovendo tanto imunidade protetora (ALVES et al., 2009; CHAMIZO et al., 2005; MANNA et al., 2006; MARY et al., 1999; MENEZES-SOUZA et al., 2011; SANTOS-GOMES et al., 2002), quanto progressão da doença (CÔRREA et al., 2007; LAGE et al., 2007; HAILU et al., 2005; PANARO et al., 2009). A importância do IFN-γ nos mecanismos de resistência à doença inclui não somente sua capacidade de ativação de macrófagos, mas também sua participação na diferenciação de células Th0 em linfócitos Th1 juntamente com IL-12 e células natural killer (NK) (GOTO; LINDOSO, 2004).

Santos-Gomes et al. (2002) observaram redução da expressão gênica de IFN-γ em células mononucleares de sangue periférico, imediatamente após a infecção experimental em cães, indicando que o parasita interfere na capacidade dos linfócitos de expressar esta citocina em uma fase inicial. Entretanto, os mesmos autores notaram elevação dos níveis dessa citocina no final do período pré-patente, e antes do estabelecimento dos sinais clínicos, sugerindo que o IFN-γ possa atuar retardando o início de uma fase patente da doença.

Chamizo et al. (2005) e Manna et al. (2006), também associaram o predomínio de uma resposta de células Th1 ao controle da doença em cães, visto que os animais mantiveram-se assintomáticos quando houve maior expressão de IFN-γ e IL-2 em células mononucleares de sangue periférico e em sangue total, sugerindo que essas citocinas sejam capazes de ativar macrófagos para evitar a disseminação do parasita por via linfática ou hematógena para outros órgãos-alvo. Menezes-Souza et al. (2011),

relacionaram maiores níveis de IFN-γ aos animais assintomáticos, visto que a citocina foi mais expressa em fragmentos de pele de cães que não apresentavam sintomas da doença, quando comparados aos grupos de cães classificados como oligosintomáticos ou sintomáticos.

Em contrapartida, Quinnell et al. (2001) afirmaram que a expressão de IFN-γ não pode ser utilizada como um indicador de apresentação clínica da doença ou cura em cães, visto que níveis similares dessa citocina foram expressos na medula óssea de animais sintomáticos e assintomáticos. Côrrea et al. (2007) observaram maiores níveis de IFN-γ no baço de cães sintomáticos quando comparados aos assintomáticos, sugerindo uma associação entre a elevação desta citocina no órgão e um padrão de cronicidade da doença. Ainda, o estudo demonstrou que houve produção de IFN-γ no baço e no fígado de cães sintomáticos e assintomáticos.

Em um estudo avaliando cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, a maior expressão de IFN-γ foi associada ao aumento da carga parasitária no baço, sugerindo participação desta citocina na progressão da doença (LAGE et al, 2007). Por outro lado, Alves et al. (2009) associaram a maior expressão de IFN-γ e TNF-α nos linfonodos de cães assintomáticos a uma baixa carga parasitária, sugerindo portanto, que essas citocinas atuem na proteção contra a infecção neste tecido. Strauss-Ayali et al. (2007) também observaram relação entre os maiores níveis de IFN-γ no baço e cães sintomáticos, entretanto, notaram baixa carga parasitária no órgão quando da elevação desta citocina. Cavalcanti et al. (2015), ao avaliarem o baço de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, associaram a menor expressão de IFN-γ, TNF-α, IL-12, IL-6, IL-10 e TGF-β ao grupo de animais com alto parasitismo no órgão quando comparados àqueles com menor carga parasitária.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) possui importantes propriedades pró-inflamatórias e exerce funções cruciais na imunidade inata e adaptativa, na proliferação celular e em processos apoptóticos. É produzido por diferentes tipos celulares, incluindo macrófagos, monócitos, células T, células de

musculatura lisa, adipócitos e fibroblastos (POPA et al., 2007). Esta citocina tem sido correlacionada com a resposta imune do tipo Th1 em cães (ALVES et al., 2009; CHAMIZO et al., 2005; LAGE et al., 2007; LIMA et al., 2007; MENEZES-SOUZA et al., 2011; PANARO et al., 2009; PINELLI et al., 1994). Michelin et al. (2011), observaram maiores níveis de TNF-α no baço e no fígado dos cães infectados quando comparados aos cães não infectados. Nesse estudo, a citocina foi mais expressa no fígado do que no baço, sugerindo que a produção de TNF-α possa ser mais evidente no tecido hepático de cães. Os pesquisadores concluíram que a associação entre o nível de expressão de TNF-α e uma elevação da carga parasitária observada no grupo de cães sintomáticos pode ser um indicador do processo de evolução da doença.

Lage et al. (2007) não observaram diferença estatisticamente significativa quanto à expressão de TNF-α em baço de cães quando comparados os grupos de animais infectados e não infectados por *Leishmania* spp., e quando comparados os grupos de cães infectados que se apresentavam assintomáticos, oligosintomáticos e sintomáticos.

A interleucina 2 (IL-2) é produzida por linfócitos do tipo Th1 e induz a proliferação de células T e B ativadas, além de estimular citotoxicidade de células “natural killer” (NK) e morte de células tumorais e bactérias por monócitos e macrófagos. Já a interleucina 5 (IL-5) é produzida por linfócitos do tipo Th2 e mastócitos, atuando na proliferação de eosinófilos e células B ativadas (ROITT; DELVES, 2004). No tocante ao papel da IL-2 e da IL-5 na leishmaniose visceral, não existem estudos conduzidos com a expressão gênica destas citocinas no baço de animais. No que diz respeito à IL-2, Chamizo et al. (2005) demonstraram que os maiores níveis de expressão de IL-2, IFN-γ, IL-18 e a ausência de IL-4 em células mononucleares de sangue periférico podem ser responsáveis pela ausência de sintomas dos cães experimentalmente infectados por *L. infantum,* já que estas citocinas promovem ativação de macrófagos e controle do parasitismo. De forma similar, Pinelli et al. (1994) encontraram maior atividade desta interleucina em células

mononucleares de sangue periférico de cães assintomáticos, sugerindo sua participação nos mecanismos de resistência à doença.

Menezes-Souza et al. (2011), ao avaliarem fragmentos cutâneos de cães infectados por *L. chagasi*, constataram um aumento significativo da expressão de IL-5 nos animais infectados e assintomáticos em comparação com o grupo de animais não infectados. Contudo, Strauss-Ayali et al. (2007), ao avaliarem cães experimentalmente infectados por *L. infantum*, notaram maior expressão gênica de IL-5 no baço após cinco e sete meses da infecção em cães que apresentavam sintomas da doença, evidenciando a variação dos níveis de expressão da interleucina de acordo com o tempo de infecção e fase da doença.

3. OBJETIVOS

Frente ao exposto, o presente estudo teve por objetivos avaliar a expressão gênica de citocinas participantes da resposta imune celular (IFN-γ, TNF-α, IL-2) e humoral (IL-5) no baço de gatos naturalmente infectados por *Leishmania* spp. e de gatos hígidos; e verificar a correlação entre a expressão gênica destas citocinas no baço dos gatos infectados por *Leishmania* spp. com a carga parasitária na medula óssea.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento Experimental

Foram triados 95 gatos (*Felis catus domesticus*), provenientes de abrigos ou residências do município de Araçatuba – SP, área considerada endêmica para LV, para composição dos grupos experimentais. Após a assinatura de um termo de consentimento esclarecido por parte dos proprietários/responsáveis, os animais eram submetidos a exame clínico, e os dados de anamnese, resenha e exame físico geral de cada um eram registrados em fichas clínicas individuais. Como agradecimento à adesão dos proprietários os gatos eram castrados e, durante o procedimento cirúrgico, era obtido o material biológico necessário para a realização do estudo.

O experimento foi delineado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA), conforme o protocolo FOA-9048/10.

4.1.1. Formação dos grupos

O critério utilizado para a formação do grupo experimental fundamentou-se na presença de formas amastigotas do parasita verificada por exame parasitológico direto e confirmado pela amplificação do DNA de *Leishmania* spp. na medula óssea por qPCR. O grupo controle foi composto por animais não infectados (negativos por meio de exame parasitológico e qPCR de medula óssea) e clinicamente hígidos. Todos os gatos sororeagentes para FIV ou FeLV, e aqueles em que não se confirmou infecção por *Leishmania* spp., mas apresentavam alguma alteração clínica, foram excluídos do experimento. Desta forma, o primeiro grupo (grupo infectado) foi composto por 12 felinos naturalmente infectados por *Leishmania* spp., independente da presença ou ausência de sintomas; e o segundo (grupo controle), por quatro gatos não infectados e hígidos.

4.2. Procedimento cirúrgico e biopsia esplênica

Os animais foram sedados com acepromazina (dose: 0,05 mg/kg/IM) e morfina (dose: 0,3 mg/kg/IM) e monitorados por dez minutos. Após esta etapa, a indução anestésica era promovida com o uso de ketamina (dose: 5 mg/kg/IV) e midazolan (dose: 0,3 mg/kg/IV). Para a castração, nas fêmeas adotou-se o acesso retro-umbilical e nos machos realizaram-se duas incisões testiculares, paralelas à rafe escrotal. Imediatamente após a castração, efetuou-se a biopsia esplênica, utilizando o mesmo acesso da ovariossalpingohisterectomia nas fêmeas e, nos machos, por meio de um novo acesso pré-retro umbilical.

Com auxílio de pinças hemostáticas mosquito-"halstead" curvas e lâmina de bisturi, foram obtidos dois fragmentos de aproximadamente 0,2 cm. A remoção gradual da pinça permitiu hemostasia do órgão. Os fragmentos foram armazenados individualmente, a -80^{o}C, em microtubos contendo 1 mL de RNA Later® (Life Technologies®, AM 7020, Carlsbad, CA, USA). Realizou-se, então, a sutura em três planos (muscular, subcutâneo e pele) e os animais foram acompanhados por sete dias, período em que receberam antibioticoterapia (enrofloxacina na dose de 5 mg/kg/sid/VO) e analgesia (cloridrato de tramadol na dose de 3 mg/kg/bid/SC).

4.3. Biopsia aspirativa de órgãos linfoides

Com os animais em plano anestésico, após antissepsia, procederam-se as citologias aspirativas de linfonodos poplíteos (Figura 2), com auxílio de agulha 25mm X 0,7mm acoplada a seringa de 10 mL; e da medula óssea, na região da crista ilíaca (Figura 3), utilizando-se agulha 40mm X 12 mm acoplada a seringa de 20 mL. Foram realizados esfregaços para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* spp. por meio de exame parasitológico direto. As lâminas foram coradas com o kit Panótico Rápido® (Laborclin, Campinas-SP, Brasil) e visualizadas em microscópio, na objetiva de aumento de 100x em óleo de imersão. O material de medula óssea foi armazenado em microtubos contendo solução de citrato de sódio a -20^{o}C, para posterior pesquisa do DNA

de *Leishmania* spp. por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).



Figura 2 - Punção biopsia aspirativa de linfonodo poplíteo esquerdo de felino proveniente de região endêmica para leishmaniose visceral. Araçatuba – SP, 2015.

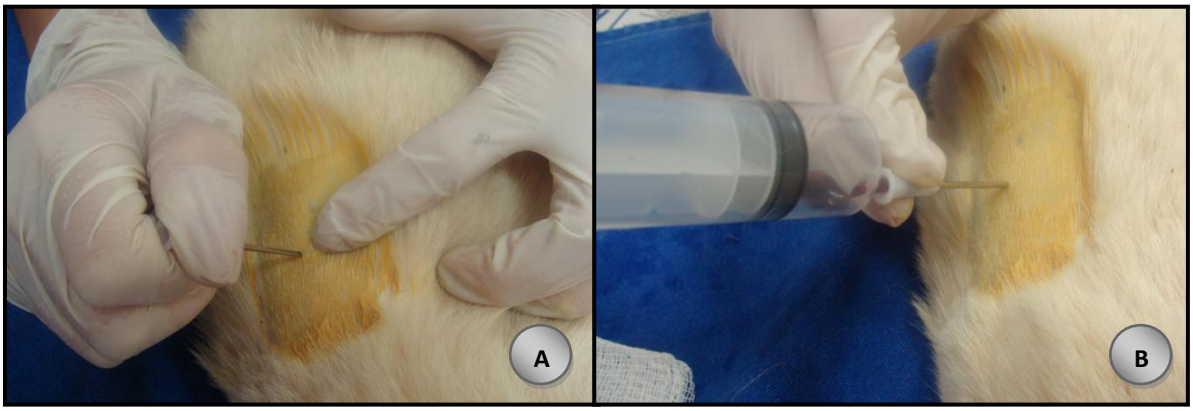


Figura 3 (A e B) - Punção biopsia aspirativa de medula óssea na região da crista ilíaca de felino proveniente de área endêmica para leishmaniose visceral. Araçatuba – SP, 2015.

4.4. Pesquisa de anticorpos anti-vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e/ou do antígeno do Vírus da Leucemia Felina (FeLV)

A pesquisa de anticorpos anti-vírus da imunodeficiência felina (FIV) e/ou do antígeno do vírus da leucemia felina (FeLV) no soro foi realizada por meio

de Kit comercial SNAP FIV Antibody/FeLV Antigen Combo Test, de acordo com as recomendações do fabricante (IDEXX® Laboratories, Westbrook, ME, USA).

4.5. Amplificação de DNA de *Leishmania* spp. por qPCR

4.5.1. Extração de DNA

Amostras de aspirados de medula óssea armazenados a -20°C foram utilizadas para detecção de *Leishmania* spp. e definição dos grupos experimentais. Para tanto, no momento da extração, as amostras foram retiradas do freezer, mantidas por 10 minutos a -4°C e a seguir por 10 minutos em temperatura ambiente. A extração de DNA foi realizada utilizando-se kit comercial DNeasy Blood & Tissue kit (69506, Qiagen®, Valencia, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.5.2. Quantificação e Pureza do DNA

O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000, Nano-Drop Technologies®, Wilmington, DE, EUA) e o valor da relação de absorbância no comprimento de onda 260/280 foi considerado adequado quando encontrava-se entre 1,8 e 2,0, garantindo a qualidade da amostra extraída. As amostras foram quantificadas e armazenadas a -20°C até o momento da realização qPCR.

4.5.3. Padronização da qPCR para amplificação do DNA de *Leishmania* spp.

Para a amplificação do DNA de *Leishmania* spp. e confecção da curva padrão foram utilizados os oligonucleotídeos JW11/JW12, com os oligonucleotídeos iniciadores senso (5'-CCTATTTTACACCAACCCCCAGT-3') e anti-senso (5'- GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA-3') que amplificam um fragmento de 116 pb do minicírculo do kDNA de *Leishmania* (RANASINGHE et al., 2008). Os oligonucleotídeos foram previamente testados utilizando-se Nucleotide BLAST® online (Basic Local Alignment Search Tool).

Os oligonucleotídeos foram diluídos acrescentando-se água livre de nucleases (Ultrapure Distilled Water DNase, RNase Free Invitrogen®), de acordo com a bula, para obtenção de uma solução com concentração igual a 100μM. A seguir, a diluição foi aliquotada em soluções de trabalho de 100μL, as quais foram armazenadas a -20°C. A reação de qPCR foi realizada utilizando-se mastermix comercial com o fluoróforo SYBR Green (SYBR® Green JumpStart Taq ReadMix S4438, Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, EUA), 600 nM de cada oligonucleotídeo iniciador, 69,7 ng/μL de DNA (cultura de *L. infantum chagasi* na concentração de $2x10^8$ promastigotas/mL) nas reações de padronização, e 5,3 ng/μL a 83,5 ng/μL de DNA nas reações para avaliação das amostras, num volume total de 25μL. As amostras, em duplicata, foram amplificadas em termociclador (CFX96TM Real-Time System, Bio-Rad®, USA) com desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, seguido de 60°C por 1 minuto, momento em que os dados de fluorescência foram coletados. Na sequência, as amostras foram submetidas à temperatura de 60ºC a 95ºC, com incremento de 0,5°C a cada 5 segundos, para a realização da curva de dissociação. Um valor de Ct ("threshold cycle") foi calculado para cada amostra, pela determinação do ponto em que a fluorescência ultrapassou o limiar de detecção.

4.5.3.1. Cultura de *L. infantum chagasi*

Para titulação dos oligonucleotídeos e construção de uma curva padrão, foi utilizado DNA de cultura de *L. infantum chagasi* (cepa MHOM/BR/72/LD46). O material da cultura foi processado e obtido no Laboratório de Patologia das Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM/50 – FMUSP), a partir de baço de hamster infectado com *L. infantum chagasi.* A cepa foi cultivada em meio Schneider, para posterior ressuspensão das células em solução de tampão fosfato salino (PBS) com 1% de formol. Realizou-se contagem de promastigotas em câmara de Newbauer, obtendo-se o valor de $2x10^8$ promastigotas/mL. A seguir, o DNA da cultura foi extraído pelo método fenol-clorofórmio (LOCKHART et al., 2011).

4.5.3.2. Determinação da concentração dos oligonucleotídeos senso e anti-senso

A titulação dos oligonucletídeos utilizados foi realizada verificando-se amplificação de cultura de *L. infantum chagasi* (cepa MHOM/BR/72/LD46), com as possíveis combinações das concentrações 300nM, 600nM e 900nM dos oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso. Definiram-se as concentrações dos oligonucletídeos iniciadores senso de 600nM e anti-senso de 600nM a serem utilizadas para construção da curva padrão e detecção de *Leishmania* spp. em amostras de medula óssea do presente estudo (Apêndices 1A e 2A). A determinação das concentrações fundamentou-se na temperatura de dissociação de 83,5^{o}C, com pico de dissociação único e marcado, e nos valores de Ct mais precoces.

4.5.3.3. Curva padrão

Para padronização da reação e determinação da carga parasitária na medula óssea dos gatos infectados por *Leishmania* spp., foi confeccionada uma curva padrão utilizando-se as concentrações de oligonucleotídeos iniciadores senso (600nM) e anti-senso (600nM) previamente definidas. A solução com master mix, oligonucleotídeos e água livre de nucleases foi preparada com acréscimo de 10% do volume total para correção de possíveis erros de pipetagem. O DNA da reação foi representado pela cultura de *L. infantum chagasi* (cepa MHOM/BR/72/LD46). A cultura, com concentração inicial de 2x10^{8} promastigotas/mL, foi diluída na base 10 até alcançar a concentração de 2x10^{3}, totalizando cinco pontos (Apêndices 3A e 4A), em duplicata. Foi acrescido à placa um controle negativo da reação, sem a presença de DNA.

4.5.3.4. qPCR das amostras de medula óssea

As amostras de DNA de medula óssea que se encontravam armazenadas a -20^{o}C foram transferidas para -4^{o}C por 10 minutos, a seguir por mais 10 minutos a temperatura ambiente e, por 5 minutos, em banho maria, a

65^{o}C. Conforme técnica anteriormente descrita, as amostras foram pipetadas em microplaca de qPCR juntamente com a solução contendo oligonucleotídeos, mastermix e água livre de nucleases. Cada microplaca de qPCR com amostras foi acrescida de um controle negativo, sem a presença de DNA, e um controle positivo, representado pela cultura de *L. infantum chagasi* na concentração de 2x10^{8} promastigotas/mL, em duplicata, e em seguida submetidas ao ciclo de temperaturas anteriormente descrito.

4.5.3.5. Determinação da carga parasitária

A partir da curva padrão composta por cinco diluições seriadas (2x10^{7} a 2x10^{3} promastigotas/mL) de cultura de *L. infantum chagasi*, foi determinada a carga parasitária na medula óssea de oito gatos do grupo infectado. Não foi possível a determinação da carga parasitária nos outros quatro animais do grupo infectado devido ao volume da amostra ser insuficiente.

4.6. Avaliação da expressão gênica de mRNA das citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-2 e IL-5 no baço de gatos infectados e não infectados por *Leishmania* spp.

4.6.1. Extração de RNA total

A extração de RNA das amostras de baço foi realizada utilizando-se RiboPure^{TM} kit (Ambion Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), conforme as instruções do fabricante. Extraiu-se o RNA total das 16 amostras de baço dos gatos previamente selecionados. Destas, seis amostras (três de cada grupo) foram utilizadas para composição de um “pool” representativo dos dois grupos experimentais, o qual foi empregado para titulação de oligonucleotídeos e curva padrão das interleucinas.

4.6.2. Quantificação e pureza do RNA

O RNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000, Nano-Drop Technologies®, Wilmington, DE, EUA) e os valores da relação

de absorbância no comprimento de onda 260/280 das amostras de RNA extraído encontravam-se entre 1,8 e 2,0. As amostras quantificadas foram imediatamente encaminhadas para a reação de transcrição reversa (RT-PCR).

4.6.3. Transcrição Reversa (RT-PCR)

Para a transcrição reversa e síntese do cDNA a partir do RNAm das amostras de baço foi utilizado o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Todas as etapas desse procedimento foram realizadas sobre placa térmica de gelo.

Considerando-se a diferença entre os valores quantificados nas amostras de RNA extraído, foi realizado um ajuste para padronização das concentrações por meio de adição de água livre de nucleases à amostra de RNA extraído, completando um volume total de 10μL. Nesse sentido, optou-se por ajustar a concentração das amostras para 200ng e do "pool" para 500ng. O material obtido foi armazenado a -20°C para posterior realização da qPCR.

4.6.4. Padronização da qPCR para avaliação da expressão de citocinas

As sequências dos oligonucleotídeos utilizados e suas respectivas sondas de hidrólise encontram-se descritas no Quadro 1 (IGNACIO et. al, 2005; KIPAR et. al, 2001; LEUTENEGGER et. al, 1999; SCOTT et. al, 2011). Utilizou-se o gene de referência GAPDH como controle interno para corrigir variações entre amostras e permitir comparação e análise estatística dos dados obtidos.

Quadro 1 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores senso, anti-senso e sondas de hidrólise utilizadas para a avaliação da expressão gênica de citocinas nas reações em cadeia da polimerase por transcriptase reversa. Araçatuba-SP, 2015.

Gene Alvo	*Oligos*	*Sequência (5' → 3')*	*Referência*
GAPDH	Senso	GCCGTGGAATTTGCCGT	Ignacio et. al, 2005
	Anti-senso	GCCATCAATGACCCCTTCAT	Ignacio et. al, 2005
	Sonda	CTCAACTACATGGTCTACATGTTCCAGTATGATTCCA	Ignacio et. al, 2005
IFN-γ	Senso	CACCAAGATCTAACCTGAGGAAGC	Leutenegger et. al, 1999
	Anti-senso	TATTGCAGGCAGGATGACCAT	Leutenegger et. al, 1999
	Sonda	CGATGCTCTACGGCCTCGAAACAGA	Leutenegger et. al, 1999
TNF-α	Senso	CTTCTCGAACTCCGAGTGACAAG	Kipar et. al, 2001
	Anti-senso	CCACTGGAGTTGCCCTTCA	Kipar et. al, 2001
	Sonda	TAGCCCATGTAGTAGCAAACCCCGAAGC	Kipar et. al, 2001
IL-2	Senso	ACGGTTGCTTTTGAATGGAG	Scott et. al, 2011
	Anti-senso	CAATTCTGTGGCCTTCTTGG	Scott et. al, 2011
	Sonda	CCCCAAACTCTCCAGGATGCTCA	Scott et. al, 2011
IL-5	Senso	TGCTTCTGCATTTGAGTTTG	Scott et. al, 2011
	Anti-senso	CAGCCTATTCATGGGACTTTG	Scott et. al, 2011
	Sonda	TGGCAGAAACATAGGCAGCCCC	Scott et. al, 2011

Os oligonucleotídeos e sondas obtidos em literatura foram previamente testados utilizando-se Nucleotide BLAST® online (Basic Local Alignment Search Tool). Os oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise foram diluídos individualmente acrescentando-se água livre de nucleases (Ultrapure Distilled Water DNase, Rnase Free Invitrogen®), de acordo com a bula, para obtenção de soluções-mãe com concentrações iguais a 100μM. A partir das soluções-mãe foram realizadas soluções de trabalho dos oligonucleotídeos e das sondas, os quais foram acondicionados a -20°C.

A reação de qPCR foi realizada utilizando-se mastermix comercial TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA). Para o gene de referência GAPDH e para cada citocina realizou-se a padronização dos oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso, utilizando-se as concentrações de 240 nM, 480 nM, 720 nM e 960 nM para cada oligonucleotídeo (Apêndices 1B a 5B). Estabeleceu-se uma concentração de 240 nM para a sonda com fluoróforo FAM, de acordo com ensaios prévios. Foi possível observar uma homogeneidade nas diferentes concentrações de cada oligonucleotídeo. Desta forma, foi determinada uma concentração padrão de 480 nM para cada oligonucleotídeo das citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-2 e IL-5 visando a facilidade nos volumes de pipetagem e o não desperdício de material

utilizando maiores concentrações. As reações foram realizadas em duplicata e constituíram-se, portanto, de 480 nM de cada oligonucleotídeo iniciador, 240nM de sonda com fluoróforo FAM e 500 ng de cDNA, em um volume total de 25µL. A técnica de qPCR utilizada para avaliar a expressão gênica das interleucinas foi a mesma previamente descrita para realização da qPCR para detecção de *Leishmania* spp.

4.6.5. Curva padrão do gene de referência GAPDH e das citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-2 e IL-5

A curva padrão do gene de referência e de cada citocina foi realizada objetivando-se validar a reação quanto à sua eficiência (Apêndices 6B a 10B). Após determinar a concentração de 480nM de cada oligonucleotídeo, foi realizada a construção da curva utilizando as amostras de cDNA do "pool". A reação foi realizada em duplicata, composta por diluições seriadas de 500 ng, 250 ng, 125 ng, 62,5 ng, 31,25 ng, 15,62 ng e 7,81 ng de cDNA. Foram utilizadas as mesmas condições de ciclo e temperatura descritas anteriormente. A eficiência das reações apresentou variação de 92,7% a 99,9%, o coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,972 a 0,991 e o coeficiente de angulação da regressão ("slope") de -3,325 a -3,509.

4.6.6. Avaliação da expressão gênica das citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-2 e IL-5 no baço de gatos infectados e não infectados por *Leishmania* spp.

A reação de qPCR das citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-2 e IL-5 foi realizada em termociclador utilizando-se TaqMan® Universal PCR Master Mix, 480 nM de cada oligonucleotídeo iniciador, 240 nM da sonda e 200 ng de cDNA, em um volume total de 25 µL. As amostras, em duplicata, foram incubadas como descrito anteriormente. Acrescentaram-se controle negativo, sem a presença de DNA, e controle positivo ("pool" de amostras) da reação, ambos em duplicata.

A quantificação da expressão gênica das citocinas foi avaliada pelo método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$, segundo Livak e Schmittgen (2001), utilizando o sinal do

gene de referência GAPDH para normalização dos dados. Os resultados foram descritos como a expressão gênica relativa, ou seja, o número de vezes (“fold change”) que determinado gene está mais ou menos expresso no grupo infectado em relação ao grupo controle (não infectado).

4.7. Análise estatística

Os valores obtidos da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foram transformados na escala logarítmica de base 10 para determinação da expressão gênica relativa de cada citocina em relação ao grupo controle. Como o presente estudo foi realizado apenas com dois grupos experimentais, a análise comparativa da expressão gênica das interleucinas entre os grupos (grupo infectado e grupo controle) foi realizada utilizando-se os valores de ΔCt de cada citocina, pelo teste t de Student com análise de resíduos. Para correlação entre carga parasitária e expressão gênica de citocinas, utilizou-se o teste de Spearman. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas empregando o programa SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute).

5. RESULTADOS

5.1. Animais

Os 12 gatos que compuseram o grupo infectado possuíam entre seis meses e 10 anos de idade, com mediana de três anos, todos sem raça definida, sendo nove fêmeas (75%). Em sete (58,3%) foram identificadas formas amastigotas do parasita na medula óssea e nos 12 (100%) foi possível amplificar o DNA do parasita no mesmo tecido. Não foram visualizadas formas amastigotas de *Leishmania* spp. nos linfonodos de nenhum gato. Os gatos do grupo controle possuíam entre seis meses e cinco anos de idade, com mediana de um ano, sendo todas fêmeas sem raça definida, nos quais não se observou amplificação do DNA de *Leishmania* spp. nas amostras de medula óssea.

No que se refere ao exame físico, sinais clínicos inespecíficos estiveram evidentes em seis animais do grupo infectado, compreendendo manifestações dermatológicas em quatro animais (33,3%), gastrointestinais em dois (16,7%), perda de peso em dois (16,7%), linfoadenopatia em um (8,3%), esplenomegalia em um (8,3%) e alterações respiratórias em um gato (8,3%). Os gatos que compuseram o grupo controle não apresentavam alterações clínicas.

5.2. PCR em Tempo Real das amostras de medula óssea

A técnica de qPCR para *Leishmania* spp. em amostras de medula óssea de animais do grupo infectado apresentou picos da curva de dissociação entre 83,5^{o}C e 84^{o}C (Apêndices 1C e 2C). Os valores de Ct variaram entre 28,88 e 35,99. Os gatos do grupo controle não apresentaram amplificação.

5.2.1 Determinação da carga parasitária na medula óssea

Os resultados individuais da carga parasitária na medula óssea dos oito gatos infectados por *Leishmania* spp. encontram-se apresentados no Quadro 2, com mediana de 2.600,52 parasitas/mL.

Quadro 2. Carga parasitária da medula óssea de oito gatos naturalmente infectados por *Leishmania* spp.. Araçatuba-SP, 2015.

Carga Parasitária	
Gato	**Parasitas/mL**
1	40865,86
5	399,60
7	1816,41
8	1070,17
9	2568,89
10	2632,14
11	3398,03
12	2972,54

5.3. Expressão gênica de mRNA

5.3.1. Gene de referência GAPDH

A expressão gênica do GAPDH no grupo infectado apresentou uma variação de Ct de 16,84 a 21,82, e no grupo controle de 17,56 a 18,51 (Apêndice 1D). Os valores individuais de Ct médio encontram-se apresentados no Apêndice 1E.

5.3.2. Interferon gama (IFN-γ)

A expressão gênica de IFN-γ no grupo infectado apresentou uma variação de Ct de 26,06 a 30,96, e no grupo controle de 28,05 a 37,62 (Apêndice 2D). Os valores individuais de Cts médios encontram-se apresentados no Apêndice 1E.

Os valores individuais e o gráfico de ΔCt da expressão gênica de IFN-γ no baço dos gatos dos dois grupos encontram-se apresentados, respectivamente, no Quadro 3 e na Figura 4. Observou-se diferença estatisticamente significante entre os grupos (p = 0,0005). Nos gatos do grupo infectado a expressão gênica de IFN-γ foi 1,53 vezes maior do que no grupo controle.

5.3.3. Fator de necrose tumoral alfa (TNF-α)

A expressão gênica de TNF-α no grupo infectado apresentou uma variação de Ct de 21,60 a 28,01 e, no grupo controle, de 23,27 a 23,80 (Apêndice 3D). Os valores individuais de Cts médios encontram-se apresentados no Apêndice 1E.

Os valores individuais e o gráfico de ΔCt da expressão gênica de TNF-α no baço dos gatos dos dois grupos encontram-se apresentados, respectivamente, no Quadro 3 e na Figura 4. Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos (p = 0,4203).

5.3.4. Interleucina 2 (IL-2)

A expressão gênica de IL-2 apresentou no grupo infectado (G1) uma variação de Ct de 26,97 a 32,93, e no grupo não infectado (G2) de 27,96 a 28,53 (Apêndice 4D). Os valores individuais de Cts médios encontram-se apresentados no Apêndice 1E.

Os valores individuais e o gráfico de ΔCt da expressão gênica de IL-2 no baço dos gatos dos dois grupos encontram-se apresentados, respectivamente, no Quadro 3 e na Figura 4. Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos (p = 0,1968).

5.3.5. Interleucina 5 (IL-5)

A expressão gênica de IL-5 apresentou no grupo infectado (G1) uma variação de Ct de 26,81 a 30,73, e no grupo não infectado (G2) de 27,37 a 27,83 (Apêndice 5D). Os valores individuais de Cts médios encontram-se apresentados no Apêndice 1E.

Os valores individuais e o gráfico de ΔCt da expressão gênica de IL-5 no baço dos gatos dos dois grupos encontram-se apresentados respectivamente no Quadro 3 e na Figura 4. Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos (p = 0,6390).

Quadro 3 – Valores de ΔCt da expressão gênica das citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-2 e IL-5 obtido por qPCR em amostras de baço de gatos naturalmente infectados por *Leishmania* spp. (G1) e de gatos do grupo controle (G2). Araçatuba-SP, 2015.

Grupo	Animal	Citocinas			
		IFN-γ	TNF-α	IL-2	IL-5
G1	1	9,84	6,74	10,73	9,27
	2	7,95	6,96	11,79	8,15
	3	9,17	7,47	13,92	10,78
	4	8,29	6,70	10,91	8,92
	5	9,19	5,35	10,42	8,78
	6	8,65	6,26	11,66	10,21
	7	9,69	6,24	10,13	8,71
	8	8,82	5,26	11,11	8,91
	9	11,83	5,07	10,94	10,26
	10	10,53	6,25	11,12	10,21
	11	10,52	4,76	10,13	9,97
	12	11,64	5,41	9,93	9,75
G2	13	13,17	5,01	9,81	9,32
	14	20,06	6,22	10,97	10,22
	15	12,78	5,64	10,48	9,92
	16	13,08	5,77	9,93	9,34

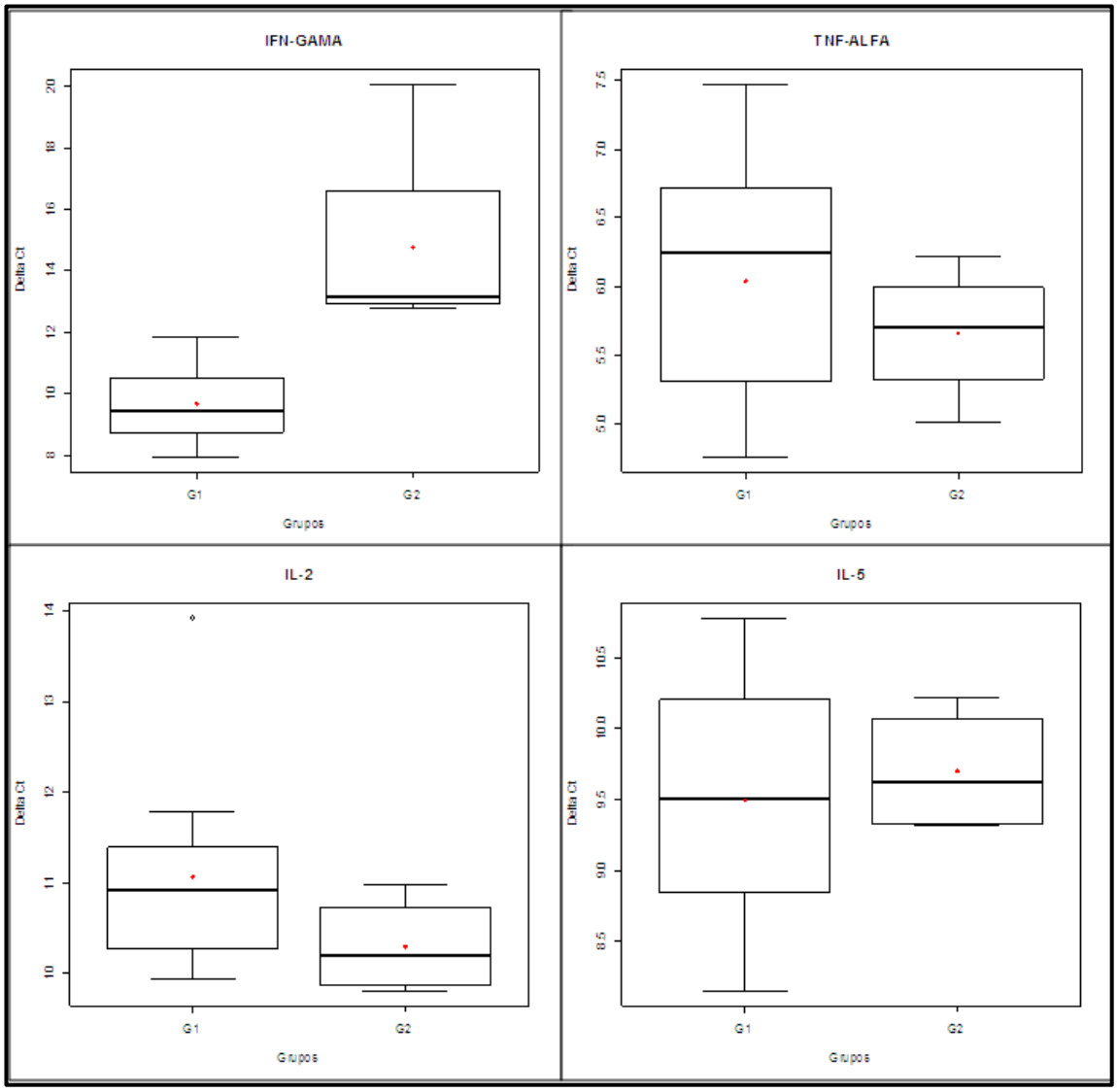


Figura 4 – "Boxplot" da expressão gênica de IFN-γ, TNF-α, IL-2 e IL-5 no baço de gatos do grupo infectado (G1) e do grupo controle (G2), representando mediana, mínimo e máximo. Teste t de Student, p<0,05. Araçatuba-SP, 2015.

5.4. Correlação entre carga parasitária na medula óssea e expressão gênica das citocinas

Não foi observada correlação entre a carga parasitária na medula óssea e a expressão gênica das citocinas no baço dos gatos infectados por *Leishmania* spp. (IFN-γ p = 0,1570; TNF-α p = 0,5702; IL-2 p = 0,6081; IL-5 p = 0,2329).

6. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a resposta imune do gato frente à infecção por *Leishmania* spp., visto as inúmeras dificuldades encontradas no estabelecimento do diagnóstico da doença nesta espécie. Nos 12 gatos do grupo infectado houve amplificação do DNA do parasita na medula óssea, no entanto, não foi verificada a presença de formas amastigotas em exame parasitológico direto do mesmo tecido em cinco (41,7%) destes animais. É notório, portanto, que a PCR em tempo real representa uma técnica de maior sensibilidade quando comparada ao exame parasitológico direto de órgãos linfoides, corroborando estudos anteriores que demonstraram a importância da PCR como método de identificação de leishmaniose em felinos (CHATZIS et al., 2014; MAIA et al., 2008; PENNISI et al., 2004).

No que se refere à carga parasitária na medula óssea, houve variação de 399,600 a 40865,860 parasitas/mL nos gatos infectados por *Leishmania* spp., com mediana de 2.600,520 parasitas/mL. Até o momento, a literatura consultada não possui muitos estudos que avaliaram a carga parasitária em diferentes tecidos de gatos com leishmaniose visceral. Comparativamente a um relato de caso de leishmaniose felina, o qual classificou como alto parasitismo as cargas parasitárias de 80.000,000; 350.000,000 e 750,000 parasitas/mL em linfonodos, amostras de conjuntiva e blocos de parafina da mucosa oral, respectivamente (MIGLIAZZO et al., 2014), é possível sugerir que a maioria dos gatos do presente estudo apresentava de baixo a médio parasitismo, embora o tecido avaliado tenha sido diferente. Quando da avaliação de aspirados de medula óssea em cães com leishmaniose visceral, Ramos et al. (2013) observaram variação de 0,015 a 34.940.375,000 parasitas/mL.

As lesões cutâneas parecem ser a mais frequente manifestação clínica na leishmaniose visceral felina (PENNISI et al., 2004; SHERRY et al., 2011; VIDES et al., 2011). Metade dos animais que compuseram o grupo de gatos infectados apresentava alterações ao exame físico; contudo, visto que os mesmos eram semi-domiciliados, com livre acesso à rua, ou oriundos de

abrigos, não foi possível descartar a ocorrência de coinfecções que pudessem estar envolvidas no desenvolvimento de algumas das alterações clínicas observadas. Vides et al. (2011) sugeriram que as lesões cutâneas de felinos com leishmaniose visceral, tais como alopecia, ulcerações e disqueratinizações, podem estar associadas a outras condições dermatológicas que frequentemente afetam os gatos. Nesse sentido, outros agentes etiológicos podem estar envolvidos, como dermatófitos ou ácaros, e as alterações dermatológicas observadas em quatro animais do grupo infectado do presente estudo, embora não avaliadas por exames complementares específicos, não podem ser atribuídas exclusivamente à leishmaniose.

Apesar de não ser definido o papel do baço na infecção de gatos por *L. infantum chagasi*, a escolha do órgão para se avaliar a expressão de citocinas nos gatos da presente pesquisa fundamentou-se em estudos prévios que avaliaram citocinas relacionadas à resposta imune celular e humoral no baço de cães (CÔRREA et al., 2007; LAGE et al., 2007; MICHELIN et al., 2011; STRAUSS-AYALI et al., 2007) e de gatos (VIDES, 2014) infectados por *Leishmania* spp.. De acordo com Lage et al. (2007) e Reis et al. (2009), o baço desempenha papel importante na resposta imune de cães e representa um importante órgão-alvo na leishmaniose visceral, pois é responsável por grande parte da resposta imune induzida pelo parasita. Ainda, a ocorrência de esplenomegalia em gatos com leishmaniose (HÉRVAS et al., 1999, POLI et al., 2002) sugere participação do órgão no curso da doença. Até o momento, pouco se conhece sobre a resposta imune do gato frente à infecção por *Leishmania* spp. e este representa a continuidade do primeiro estudo envolvendo a expressão gênica de citocinas na leishmaniose felina, conduzido por Vides (2014). Nesse sentido, a literatura consultada permitiu a comparação dos resultados obtidos, em sua maioria, com os achados em outras espécies animais.

Os felinos infectados por *Leishmania* spp. apresentaram maior expressão gênica de IFN-γ no baço quando comparados ao grupo não infectado, discordando dos achados de Vides (2014), que constataram redução

da expressão gênica desta citocina no baço de gatos infectados, sintomáticos e assintomáticos, quando comparados ao grupo controle. Apesar de a autora ter utilizado os mesmos oligonucleotídeos do presente experimento, o gene de referência no estudo de Vides (2014) foi a beta-actina, o que pode ter influenciado os resultados. Kessler et al. (2009), observaram que a expressão do gene de referência depende de sua estabilidade e pode variar consideravelmente em felinos de acordo com o tecido.

No presente estudo não foi possível realizar a determinação da carga parasitária no baço, pois o material obtido quando da biopsia esplênica foi suficiente apenas para o processamento das amostras para avaliação da expressão gênica das citocinas, impossibilitando a associação entre esta e os níveis de citocinas avaliadas. Não foi observada correlação entre o aumento da expressão gênica de IFN-γ no baço e a carga parasitária na medula óssea dos gatos infectados por *Leishmania* spp.. Uma das funções do IFN-γ é a indução da formação de superóxido e óxido nítrico por macrófagos, que são radicais livres tóxicos para os parasitas, podendo levar ao controle do parasitismo (BARBIÉRI, 2006). Além disso, a associação entre maiores níveis de IFN-γ no baço e a baixa carga parasitária no órgão observadas por Strauss-Ayali et al. (2007) reforça o possível papel desta citocina no controle local da replicação do parasita. Dessa forma, a ausência de correlação entre a expressão gênica de IFN-γ no baço e a carga parasitária na medula óssea sugere uma incapacidade desta citocina em favorecer a replicação ou promover o controle do parasita em outro órgão linfoide. A quantificação da carga parasitária no baço dos gatos infectados seria importante no sentido de verificar se há controle local do parasitismo no mesmo órgão.

Existem resultados contraditórios quanto à expressão de IFN-γ no baço de cães com LV, relacionando a presença desta citocina ao efeito protetor (CORRÊA et al., 2007, STRAUSS-AYALI et al., 2007) ou à progressão da doença e ao pior prognóstico do paciente (LAGE et al., 2007). No presente estudo, não foi possível associar a presença desta citocina a um efeito protetor ou promotor de doença, uma vez que as alterações clínicas observadas em

metade dos gatos do grupo infectado correspondiam a sinais inespecíficos que não puderam ser atribuídos exclusivamente à leishmaniose; além de não ter sido observada correlação entre a expressão gênica desta citocina e a carga parasitária na medula óssea.

Não foi observada diferença estatisticamente significante entre os grupos com relação à expressão gênica de TNF-α, assim como em estudo realizado por Lage et al. (2007), que não identificou diferença na expressão dessa citocina no baço de cães infectados por *L. chagasi* e não infectados. Entretanto, se a resposta imune incitada frente à infecção por *Leishmania* spp. nos gatos do presente estudo foi mediada por linfócitos Th1, e capaz de produzir maiores quantidades de IFN-γ, esperava-se observar elevação dos níveis de TNF-α, visto que constitui uma citocina secretada por células que participam da resposta imune celular.

Michelin et al. (2011), constataram que o fígado parece ser o principal órgão de produção de TNF-α durante a infecção por *L. chagasi* em cães, no entanto, este órgão não foi avaliado no presente estudo. Os mesmos autores correlacionaram a elevação dos níveis desta citocina à maior carga parasitária no órgão, sugerindo um processo de evolução da doença. Uma vez que o TNF-α produzido por linfócitos Th1 tem sido associado a uma resposta imune celular e esse tipo de resposta, em geral, promove controle da infecção, outras fontes desta citocina podem estar presentes, como macrófagos, monócitos, células de musculatura lisa, adipócitos e fibroblastos (POPA et al., 2007). Entretanto, no presente estudo não parece haver maior estímulo para produção de TNF-α por linfócitos Th1 ou outros tipos celulares nos animais infectados por *Leishmania* spp. em relação ao grupo controle. A comparação entre a expressão gênica desta citocina no baço e a carga parasitária na medula óssea dos gatos do presente estudo não demonstrou correlação.

Não foi observada diferença estatisticamente significante entre os grupos com relação à expressão gênica de IL-2 no baço de gatos infectados quando comparados ao grupo controle. Apesar de não terem sido identificados na literatura compilada estudos prévios que realizaram a avaliação da

expressão gênica de IL-2 no baço de animais infectados por *Leishmania* spp., é sabido que em cães a presença desta citocina no sangue periférico está correlacionada com uma resposta do tipo celular, favorecendo o controle da infecção (PINELLI et al., 1994; SANTOS-GOMES et al., 2002; CHAMIZO et al., 2005).

Não foi observada diferença estatisticamente significante entre os grupos de gatos infectados por *Leishmania* spp. e não infectados com relação à expressão gênica de IL-5. Uma vez que a IL-5 é uma interleucina associada à resposta imune mediada por linfócitos Th2 e tem função de promover proliferação de células B (ROITT; DELVES, 2004), era de se esperar que sua expressão gênica fosse pouco evidente em felinos infectados, visto que nesta espécie a resposta imune humoral é fraca frente à infecção por *Leishmania* spp. (SOLANO-GALLEGO et al., 2007). Strauss-Ayali et al. (2007) notaram maior expressão gênica de IL-5 após cinco e sete meses da infecção experimental no baço de cães que apresentavam sintomas da doença, entretanto na presente pesquisa não foi possível correlacionar a expressão gênica desta citocina com tempo de infecção, visto que os gatos eram naturalmente infectados e desconhecia-se o tempo de infecção nestes.

Da mesma forma, a variação na expressão de TNF-α no baço (STRAUSS-AYALI et al., 2007) e nos níveis de IFN-γ e IL-2 em células mononucleares de sangue periférico (SANTOS-GOMES et al., 2002) pode ocorrer de acordo com o tempo de infecção e a fase de evolução da doença. Considerando que o presente estudo utilizou gatos naturalmente infectados, não foi possível determinar o tempo de infecção e a fase de evolução da doença, o que possivelmente justificaria a ausência de diferença estatisticamente significante na expressão gênica de IL-2, IL-5 e TNF-α no baço entre os grupos de gatos infectados por *Leishmania* spp. e não infectados.

Embora a resistência frente à infecção por *L. infantum* em cães esteja frequentemente associada à produção de IFN-γ e outras citocinas de resposta imune celular mediada por linfócitos Th1, outros mecanismos envolvendo

células T, inclusive processos citolíticos, podem participar da imunidade protetora na leishmaniose (PINELLI et al., 1995). Mary et al. (1999) descreveram a participação de subpopulações de linfócitos TCD4+ que produzem grandes quantidades de IFN-γ, os quais atuam juntamente com os linfócitos citotóxicos TCD8+ na imunidade protetora contra a leishmaniose visceral em humanos, exercendo atividade citolítica. Os resultados do presente estudo sugerem que o IFN-γ possa exercer papel relevante nos mecanismos de proteção contra a leishmaniose felina. No entanto é preciso determinar se esta citocina encontra-se mais expressa em decorrência de uma resposta imune mediada por linhagens de linfócitos TCD4+/Th1, ou se existe a participação de linfócitos TCD8+ citotóxicos ou células NK. Desta forma, novos estudos devem ser realizados para melhor compreender a resposta imune do gato frente à infecção por *Leishmania* spp.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições do presente estudo demonstraram maior expressão gênica de IFN-γ no baço de gatos naturalmente infectados por *Leishmania* spp. e ausência de diferença na expressão gênica de TNF-α, IL-2 e IL-5 entre gatos infectados e hígidos, o que sugere participação do IFN-γ nos mecanismos de resposta imune do gato frente à infecção por *Leishmania* spp. e ressalta a importância da imunidade celular nesta espécie.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper(h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunology Letters**, v.99, p.17-23, 2005.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M.; WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p.1-12, 2012.

ALVES, C.F.; DE AMORIM, 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**, v.128, p.349-368, 2009.

AYLLON, T.; TESOURO, M.A.; AMUSATEGUI, I.; VILLAESCUSA, A.; RODRIGUEZ-FRANCO, F.; SAINZ, A. Serologic and Molecular evaluation of *Leishmania infantum* in cats from Central Spain. **Animal Biodiversity and Emerging Diseases**, v.1149, p.361-364, 2008.

BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. 4. ed. Philadelphia: **Elsevier Saunders**, 2012. p. 735-748.

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

BARBOSA, M.A.G.; ALEXANDRE-PIRES, G.; SOARES-CLEMENTE, M.; MARQUES,C.; ROOS RODRIGUES, O.; DE BRITO, T.V.; DA FONSECA, I.P.;

ALVES, L.C.; SANTOS-GOMES, G.M. Cytokine gene expression in the tissues of dogs infected by *Leishmania infantum*. **Journal of Comparative Pathology**, v.145, p.336-344, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana do Estado de São Paulo**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 120p.

BRESCIANI, K.D.S.; SERRANO, A.C.M.; DE MATOS, L.V.S.; SAVANI, E.S.M.M.; D'AURIA, S.R.N.; PERRI, S.H.V.; BONELLO, F.L.; COELHO, W.M.D.; AOKI, C.G.; DA COSTA, A.J. Ocorrência de *Leishmania* spp. em felinos do município de Araçatuba, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, p.127-129, 2010.

CARDOSO, L.; LOPES, A.P.; SHERRY, K.; SCHALLIG, H.; SOLANO-GALLEGO, L. Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. **Veterinary Parasitology**, v.174, p.37-42, 2010.

CAVALCANTI, A.S.; RIBEIRO-ALVES, M.; PEREIRA, L.O.R.; MESTRE, G.L.; FERREIRA, A.B.R.; MORGADO, F.N.; BOITÉ, M.C.; CUPOLILLO, E.; MORAES, M.O.; PORROZZI, R. Parasite load induces progressive spleen architecture breakage and impairs cytokine mRNA expression in *Leishmania infantum*-naturally infected dogs. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p.1-17, 2015.

CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.103, p.67-75, 2005.

CHATZIS, M.K.; ANDREADOU, M.; LEONTIDES, L.; KASABALIS,D.; MYLONAKIS, M.; KOUTINAS, A.F.; RALLIS, T.; IKONOMOPOULOS, J.; SARIDOMICHELAKIS, M.; Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissues of clinically normal and sick cats. **Veterinary Parasitology**, v.202, p.217-225, 2014.

CHOUDHURY, R.; DAS, P.; DE, T.; CHAKRABORTI, T. 115 kDa serine protease confers sustained protection to visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* via IFN-γ induced down-regulation of TNF-α mediated MMP-9 activity. **Immunobiology**, v.218, p.114-126, 2013.

COELHO, W.M.D.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; LANGONI, H.; BRESCIANI, K.D.S. Molecular detection of *Leishmania* sp. in cats (*Felis catus*) from Andradina Municipality, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.176, p.281-282, 2011.

CORRÊA, A.P.F.L.; DOSSI, A.C.S.; VASCONCELOS, R.O.; MUNARI, D.P.; LIMA, V.M.F. Evaluation of transformation growth factor b1, interleukin-10, and interferon-g in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v.143, p.267–274, 2007.

COSTA, T.A.C.; ROSSI, C.N.; LAURENTI, M.D.; GOMES, A.A.D.; VIDES, J.P.; SOBRINHO, L.S.V.; MARCONDES, M. Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.47, p.213-217, 2010.

DA SILVA, S.M.; RABELO, P.F.B.; CONTIJO, N.F.; RIBEIRO, R.R.; MELO, M.N.; RIVEIRO, V.M.; MICHALICK, M.S.M. First report of infection of *Lutzomyia* by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.174, p.150-154, 2010.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.27, p.305–318, 2004.

DIAKOU, A.; PAPADOPOULOS, E.; LAZARIDES, K. Specific anti-*Leishmania* spp. antibodies in stray cats in Greece. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, 11, p.728-730, 2009.

FIETTA, P.; DELSANTE, G. The effector T helper cell triade. **Rivista di Biologia**, v.102, p.61-74, 2009.

GOMES, Y.M.; PAIVA-CAVALCANTI, M.; LIRA, R.A.; ABATH, F.G.C. ALVES, L.C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **The Veterinary Journal**, v.175, p.45–52, 2008.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**, v.37, p.615-623, 2004.

HAILU, A.; BAARLE, D.V.; KNOL, G.L.; BERHE, N.; MIEDEMA, F.; KAGER, P.A. T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. **Clinical Immunology**, v.117, p.182-191, 2005.

HATAM, G.R.; ADNANI; ASGARI, Q.; FALLAH, E. MOHAMMAD, H.M.; MAHMOUD S.M. SARKARI, B. First report of natural infection in cats with *Leishmania infantum* in Iran. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.10, p. 313-316, 2010.

HÉRVAS, J.; DE LARA, F.C.; SANCHEZ-ISARRIA, M.A.; PELLICER, S.; CARRASCO, L.; CASTILLO, J.A.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.C. Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniosis in Spain. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.1, p.101-105, 1999.

IGNACIO, G.; NORDONE, S. HOWARD, K.E.; DEAN, G.A. Toll-like receptor expression in feline lymphoid tissues. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** v.106, p.229–237, 2005.

KAUSHAL, H.; BRAS-GONÇALVES, R.; NEGI, N.S.; LEMESRE,J-L.; PAPIEROK, G.; SALOTRA, P. Role of CD8+ T cells in protection against *Leishmania donovani* infection in healed visceral leishmaniasis individuals. **BMC Infectious Diseases**, v.14, p.653, 2014.

KESSLER, Y.; HELFER-HUNGERBUEHLER, A.K.; CATTORI, V.; MELI, M.L.; ZELLWEGER, B.; OSSENT, P.; RIOND, B.; REUSCH, C.E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Quantitative TaqMan® real-time PCR assays for gene expression normalisation in feline tissues. **BMC Molecular Biology**, v.10, p.106-120, 2009.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, v.4, p.1-24, 1990.

KIPAR, A.; LEUTENEGGER, C.M.; HETZEL, U.; AKENS, M.K.; MISLIN, C.N.; REINACHER, M.; LUTZ, H. Cytokine mRNA levels in isolated feline monocytes. **Veterinary immunology and Immunopathology**, v.78, p.305-315, 2001.

KUSHAWAHA, P.K.; GUPTA, R.; SUNDAR, S.; SAHASRABUDDHE, A.A.; DUBE, A. Elongation Factor-2, a Th1 stimulatory protein of *Leishmania donovani*, generates strong IFN-γ and IL-12 response in cured *Leishmania*-

infected patients/hamsters and protects hamsters against *Leishmania* challenge. **The Journal of Immunology**, v.187, p.6417-6427, 2011.

LAGE, R.S.; OLIVEIRA, G.C.; BUSEK, S.U.; GUERRA, L.L.; GIUNCHETTI, R.C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A.B. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.115, p.135-145, 2007.

LEAL, G.G.A.; ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.O.; CARNEIRO, C.M.; GIUNCHETTI, R.C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A.; FRANCISCO, A.F.; CARDOSO, J.M.; MATHIAS, F.A.S.; CORREA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, M.; COURA-VITAL, W.; REIS, A.B. Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v.205, p.472–482, 2014.

LEUTENEGGER, C.M.; MISLIN, C.N.; SIGRIST, B.; EHRENGRUBER, M.U.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ, H. Quantitative real-time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.71, p.291-305, 1999.

LIMA, V.M.F.; PEIRO, J.R.; VASCONCELOS, R.O. IL-6 and TNF-α production during active canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.115, p.189-193, 2007.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Method. **Methods**, v.25, p.402–408, 2001.

LOCKHART, M.G.; GRAVES, S.R.; BANAZIS, M.J.; FENWICK, S.G.; STENOS, J. A comparison of methods for extracting DNA from *Coxiella burnetii* as

measured by a duplex qPCR assay. **Letters in Applied Microbiology**, v.52, p.514-520, 2011.

LOCKSLEY, R.M.; LOUIS, J.A. Immunology of leishmaniasis. **Current Opinion in Immunology**, v.4, p.413 418, 1992.

LUBBERTS, E. Th17 cytokines and arthritis. **Seminars in Immunopathology**, v.32, p.43-53, 2010.

MAIA, C.; NUNES, M.; CAMPINO, L. Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.8, p.555-559, 2008.

MAIA, C.; GOMES, J.; CRISTÓVÃO, J.; NUNES, M.; MARTINS, A.; REBÊLO, E.; CAMPINO, L. Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region Portugal. **Veterinary Parasitology**, v.174, p.336-340, 2010.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? **Trends in Parasitology**, v.27, p.341-344, 2011.

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**, v.142, p.271-280, 2006.

MAROLI, M.; PENNISI, M.G.; DI MUCCIO, T.; KHOURY, C.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Pathology**, v.145, p. 357–360, 2007.

MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; ACEDO, C.; MUÑOZ-PÉREZ, M.; PESSON, B.; MARCHAL, O.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F. Infection by *Leishmania infantum* in

cats: epidemiological study in Spain. **Veterinary Parasitology**, v.145, p.267-273, 2007.

MARTÍNEZ-MORENO, A.; MARTÍNEZ-CRUZ, M.S.; BLANCO, A.; HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ. Immunological and histological study of T- and B-lymphocyte activity in canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.51, p.49-59, 1993.

MARTÍNEZ-MORENO, A.; MORENO, T.; MARTÍNEZ-MORENO, F.J.; ACOSTA, I.; HERNÁNDEZ, S. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.48, p.209-220, 1995.

MARY, C.; AURIAULT, V.; FAUGÈRE, B.; DESEIN, A.J. Control of *Leishmania infantum* Infection Is Associated with CD8+ and Gamma Interferon- and Interleukin-5-Producing CD4+ Antigen-Specific T Cells. **Infection and Immunity**, v.67, p.5559–5566, 1999.

MENEZES-SOUZA, D.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; GUERRA-SÁ, R.; GIUNCHETTI, R.C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A.; OLIVEIRA, G.C.; REIS, A.B. Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. **Veterinary Parasitology**, v.177, p.39-49, 2011.

MICHELIN, A.F.; PERRI, S.H.V.; DE LIMA, V.M.F. Evaluation of TNF-α, IL-4 and IL-10 and parasite density in spleen and liver of *L*. (*L*.) *chagasi* infected dog. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v.105, p.373-383, 2011.

MIGLIAZZO, A.; VITALE, F.; CALDERONE, S.; PULEIO, R.; BINANTI, D.; ABRAMO, F. Feline leishmaniosis: a case with a high parasitic burden. **Veterinary Dermatology**, v.26, p.68-75, 2014.

MOREIRA, M.A.B; LUVIZOTTO, M.C.R.; GARCIA, J.F.; CORBETT, C.E.P.; LAURENTI, M.D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v.145, p.245–252, 2007.

NASEREDDIN, A.; SALANT, H.; ABDEEN, Z. Feline leishmaniasis in Jerusalem: Serological investigation. **Veterinary Parasitology**, v.158, p.364-369, 2008.

NGUYEN VAN, N.; TAGLINGER, K.; HELPS, C.R.; TASKER, S.; GRUFFYDD-JONES, T.J; DAY, M.J. Measurement of cytokine mRNA expression in intestinal biopsies of cats with inflammatory enteropathy using quantitative real-time RT-PCR. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.113, p.404–414, 2006.

PANARO, M.A.; BRANDONISIO, O.; CIANCIULLI, A.; CAVALLO, P.; LACASELLA, V.; PARADIES, P.; TESTINI, G.; DE CAPRARIIS, D.; MITOLO, V.; OTRATNTO, D. Cytokine expression in dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Parasitology**, v.136, p.823-831, 2009.

PENNISI, M.G.; VENZA, M.; REALE, S.; VITALE, F.; GIUDICE, S.L. Case report of leishmaniasis in four cats. **Veterinary Research Communications**, v.28, p.363-366, 2004.

PERUYHPE-MAGALHÃES, V.; MARTINS-FILHO, O.A.; PRATA, A.; SILVA LDE, A.; RABELLO, A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; FIGUEIREDO, R.M.; GUIMARÃES-CARVALHO, S.F.; FERRARI, T.C.; CORREA-OLIVEIRA, R. Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. **Scandinavian Journal of Immunology,** v.62. p.487-495, 2005.

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**, v.62, p.229-235, 1994.

PINELLI, E.; GONZALO, R.M.; BOOG, C.J.P.; RUTTEN, V.P.M.G.; 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**, v.25, p.1594-1600, 1995.

PINELLI, E.; VAN DER KAAJI, S.Y.; SLAPPENDEL, R.; FRAGIO, C.; RUITENBERG, E.J.; BERNADINA, W.; RUTTEN, V.P.M.G. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.69, p.121-126, 1999.

POLI, A.; ABRAMO, F.; BARSOTTI, P.; LEVA, S.; GRAMICCIA, M.; LUDOVISI, A.; MANCIANTI, F. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. **Veterinary Parasitology**, v.106, p.181-191, 2002.

POPA, C.; NETEA, M.G.; VAN RIEL, P.L.C.M.; VAN DER MEER, J.W.M.; STALENHOEF, A.F.H. The role of TNF-α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. **Journal of Lipid Research,** v.48, p.751-762, 2007.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; SHAW, M-A.; DAY, M.J.; GARCEZ, L.M.; DYE, C.; KAYE, P.M. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.183, p.1421–1424, 2001.

RAMOS, R.A.N.; RAMOS, C.A.N.; SANTOS, E.M.S.; ARAÚJO, F.B.; CARVALHO, G.A.; FAUSTINO, M.A.G.; ALVES, L.C. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in the bone marrow, lymph node and spleen of dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n.3, p.346-350, 2013.

RANASINGHE, S.; ROGERS, M.E.; HAMILTON, J.G.C.; BATES, P.A.; MAINGON, R.D.C. A real-time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural sand fly vectors *Lutzomyia longipalpis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.102, p. 875-882, 2008.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W.L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.128, p.87-95, 2009.

REIS, A.B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; ROATT, B.M.; COURA-VITAL, W.; NICOLATO, R.C.; SILVEIRA-LEMOS, D.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. Cellular immunophenotypic profile in the splenic compartment during canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.157, p.190-196, 2014.

ROITT, I.M.; DELVES, P.J. A produção de efetores. In: Fundamentos de Imunologia. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A., 2004. p.181-203.

SANTOS, T.R.; CARREIRA, V.S.; FERRARI, H.F.; MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R. Comparison of PCR with stained slides of bone marrow and lymphnodes aspirates with suspect diagnosis for leishmaniasis. **Acta Tropica**, v.140, p.137–140, 2014.

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**, v.88, p.21-30, 2002.

SCOTT, V.L.; SHACK, L.A.; EELLS, J.B.; RYAN, P.L.; DONALDSON, J.R.; COATS, K.S. Immunomodulator expression in trophoblasts from the feline immunodeficiency virus (FIV) - infected cat. **Virology Journal**, v.8, p.336, 2011.

SERGENT, E.; SERGENT, E.; LOMBARD, J.; QUILICHINI, M. La Leishmaniose à Alger. Infection simultanée d´um enfant, d´um chien et d´um chat dans la meme habitation. **Bulletin de Societé de Pathologie Exotique**, v.5, p. 93-98, 1912.

SHAW, J.J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.5, p.577-579, 2006.

SHERRY, K.; MIRÓ, G.; TROTTA, M.; MIRANDA, C.; MONTOYA, A.; ESPINOSA, C.; RIBAS, F.; FURLANELLO, T.; SOLANO-GALLEGO, L. A serological and molecular study of *Leishmania infantum* infection in cats from the Island of Ibiza (Spain). **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.11, p.1-7, 2011.

SOBRINHO, L.S.V.; ROSSI, C.N.; VIDES, J.P.; BRAGA, E.T.; GOMES, A.A.D.; DE LIMA, V.M.F.; PERRI, S.H.V.; GENEROSO, D.; LANGONI, H.;

LEUTENEGGER, C.; BIONDO, A.W.; LAURENTI, M.D.; MARCONDES, M. Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.187, p.302-306, 2012.

SOLANO-GALLEGO, L.; RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; INIESTA, L., QUINTANA, J.; PASTOR, J.; ESPADA, Y.; PORTÚS, M.; ALBEROLA, J. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.76, p.676-680, 2007.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G.; JAFFE, C.L. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Research**, v.38, p.547-564, 2007.

TIZARD, I.R. Linfócitos T auxiliares e sua resposta aos antígenos. TIZARD, I.R. In: Imunologia Veterinária – Uma Introdução. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 2008. p.143-155.

VIDES, J.P.; SCHWARDT, T.F.; SOBRINHO, L.S.V.; MARINHO, M.; LAURENTI, M.D.; BIONDO, A.W.; LEUTENEGGER, C.; MARCONDES, M. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.178, p.22-28, 2011.

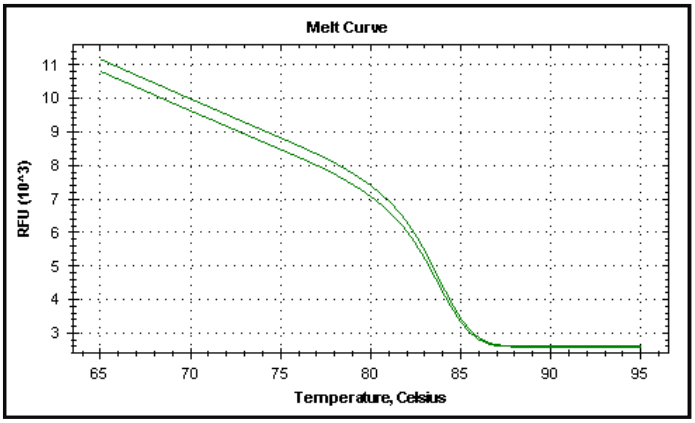
VIDES, J.P. Expressão gênica das interleucinas IL-4, IL-10, IL-12 e de interferon gama no baço de gatos infectados por *Leishmania infantum chagasi*. 2014. 81f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Estadual Paulista, Araçatuba.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. 2012. Disponível em: <http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=3835&Itemid=4098&lang=en>. Acesso em: 6 jul. 2013.

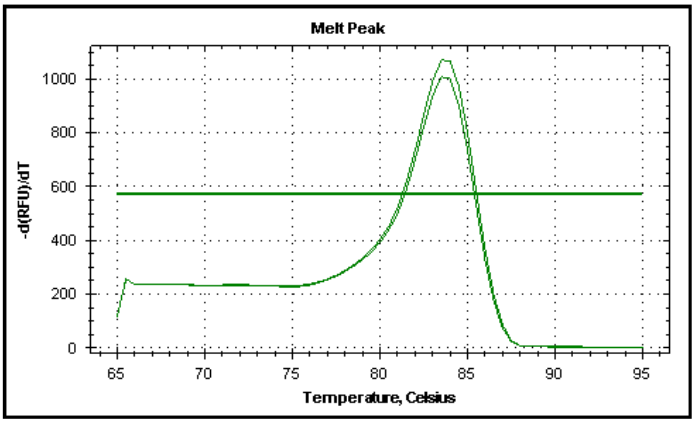
YOUNG, H.A.; HARDY, K.J. Role of IFN-γ in immune cell regulation. **Journal of Leukocyte Biology,** v.58, p.373-381, 1995.

APÊNDICES

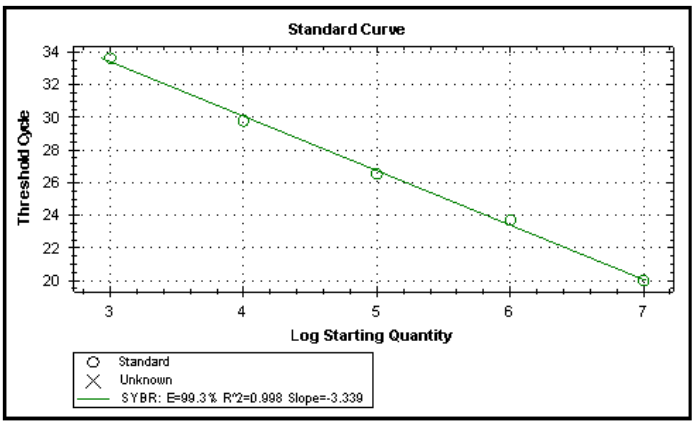
APÊNDICE A. Padronização da qPCR para amplificação do DNA de *Leishmania* spp. – Titulação dos oligonucleotídeos e curva padrão.



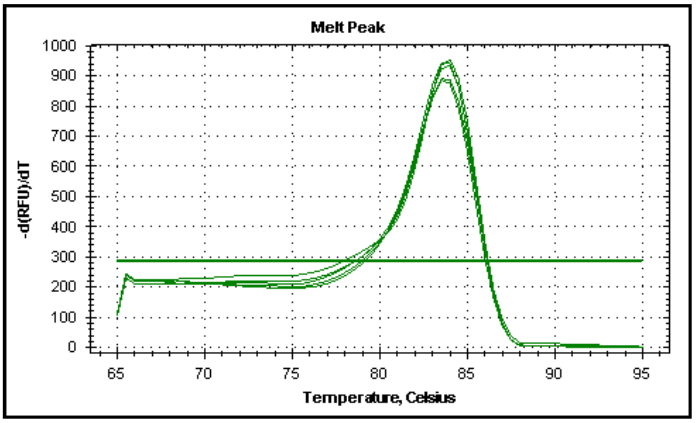
Apêndice 1A - Curva de dissociação da titulação dos oligonucleotídeos iniciadores senso (600nM) e anti-senso (600nM), definida como a combinação de concentração de oligonucleotídeos que foi utilizada para processamento das amostras de medula óssea. Temperatura de dissociação de 83,5°C. Araçatuba-SP, 2015.



Apêndice 2A - Pico de dissociação da titulação dos oligonucleotídeos iniciadores senso (600nM) e anti-senso (600nM), com pico único e marcado, definida como a combinação de concentração de oligonucleotídeos que foi utilizada para processamento das amostras de medula óssea. Temperatura de dissociação de 83,5°C. Araçatuba-SP, 2015.

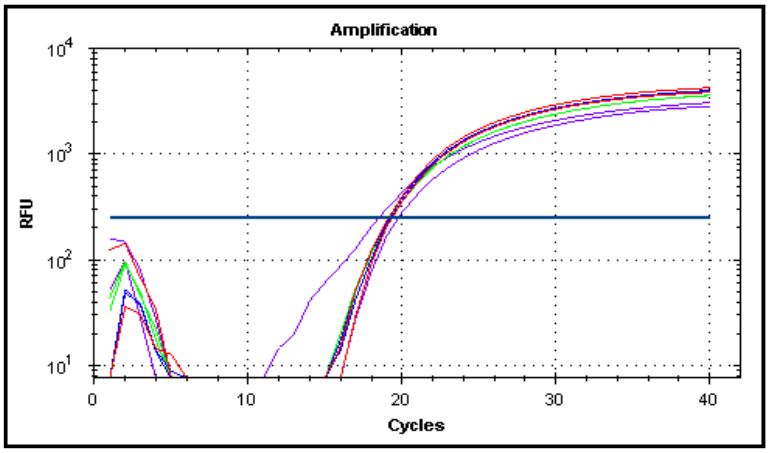


Apêndice 3A - Curva padrão, com cinco pontos em intervalos de diluição seriada na base 10 ($2x10^7$ a $2x10^3$ promastigotas/mL) da cultura de promastigotas de *L. infantum chagasi*, com eficiência da reação de 99,3%, coeficiente de correlação linear (r^2) de 0,998 e coeficiente angular da regressão de -3,339. Araçatuba-SP, 2015.

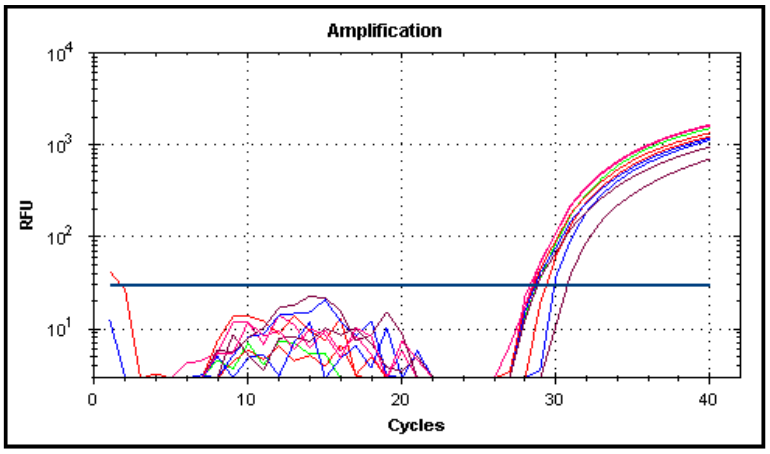


Apêndice 4A - Picos de dissociação únicos e marcados da curva padrão, com cinco pontos em intervalos de diluição seriada na base 10 ($2x10^7$ a $2x10^3$ promastigotas/mL) de cultura de promastigotas de *L. infantum chagasi,* com temperatura de dissociação de 83,5°C. Araçatuba-SP, 2015.

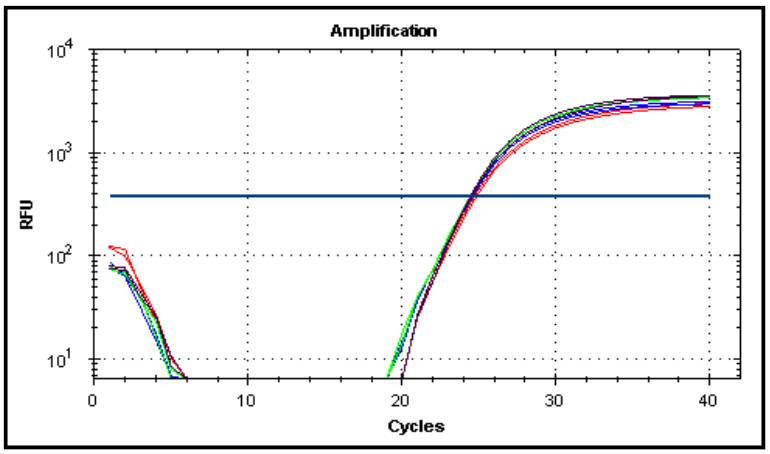
APÊNDICE B. Padronização da RT-PCR em tempo real para avaliação da expressão gênica de citocinas – Titulação dos oligonucleotídeos e curva padrão.



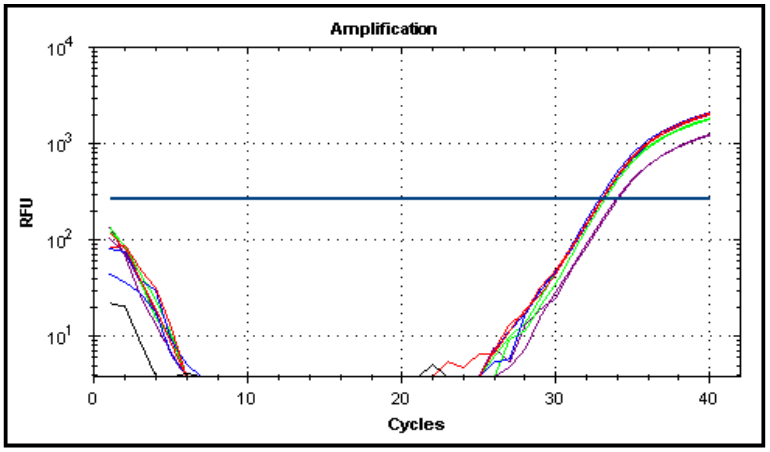
Apêndice 1B - Titulação dos oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso do gene de referência GAPDH nas concentrações 240/240; 480/480; 720/720 e 960/960 nM, com concentração de sonda com fluoróforo FAM de 240nM. Araçatuba-SP, 2015.



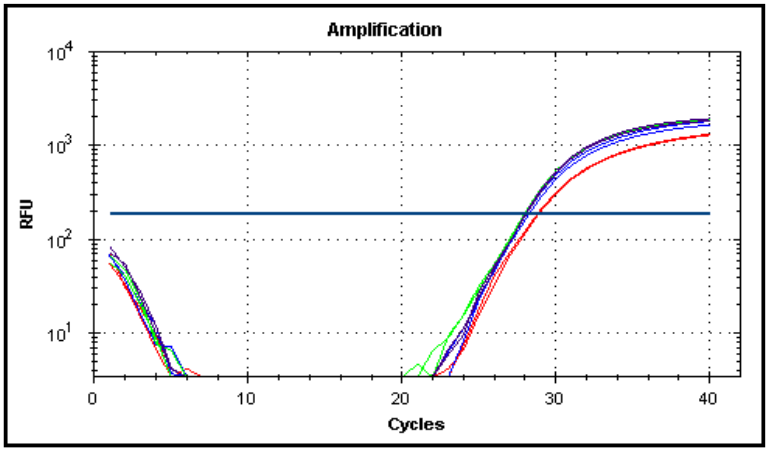
Apêndice 2B - Titulação dos oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso da interleucina IFN-γ nas concentrações 240/240; 480/480; 720/720 e 960/960 nM, com concentração de sonda com fluoróforo FAM de 240nM. Araçatuba-SP, 2015.



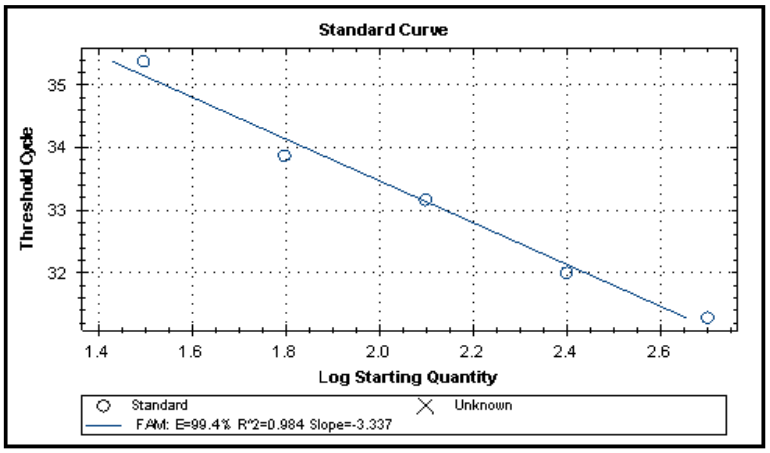
Apêndice 3B - Titulação dos oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso da interleucina TNF-α nas concentrações 240/240; 480/480; 720/720 e 960/960 nM, com concentração de sonda com fluoróforo FAM de 240nM. Araçatuba-SP, 2015.



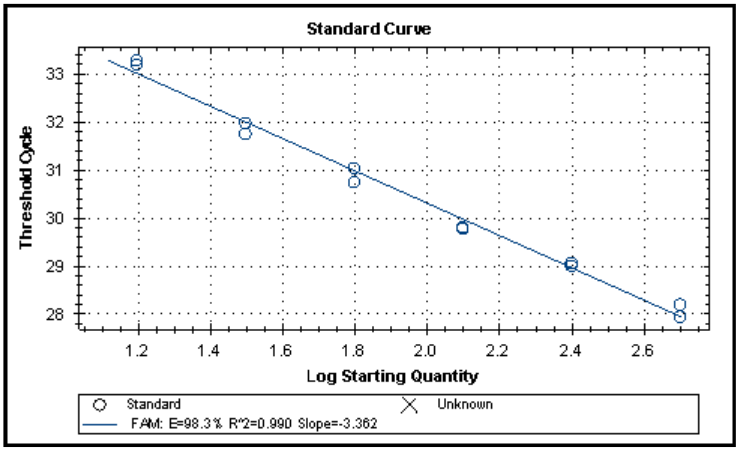
Apêndice 4B - Titulação dos oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso da interleucina IL-2 nas concentrações 240/240; 480/480; 720/720 e 960/960 nM, com concentração de sonda com fluoróforo FAM de 240nM. Araçatuba-SP, 2015.



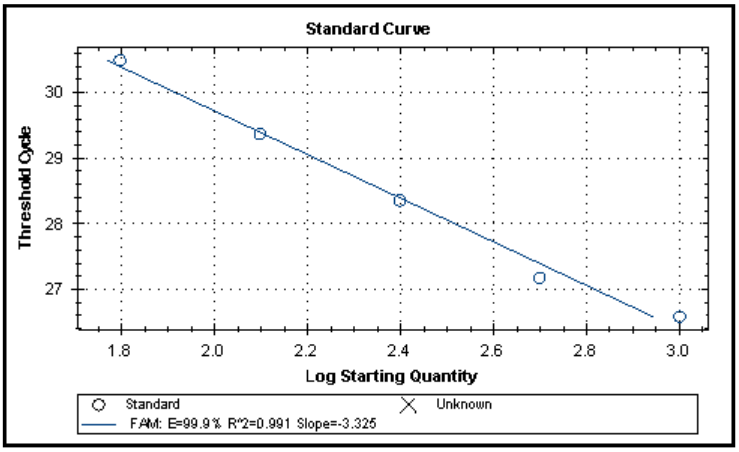
Apêndice 5B - Titulação dos oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso da interleucina IL-5 nas concentrações 240/240; 480/480; 720/720 e 960/960 nM, com concentração de sonda com fluoróforo FAM de 240nM. Araçatuba-SP, 2015.



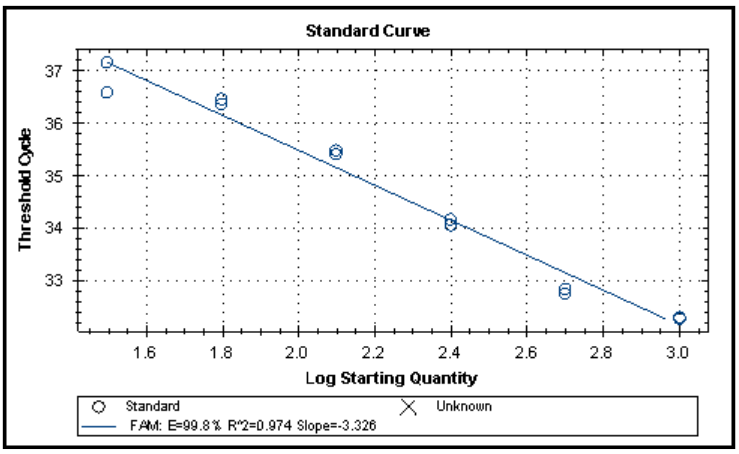
Apêndice 6B - Curva padrão do gene de referência GAPDH do "pool" de amostras de baço de gatos, com cinco pontos, em intervalos de diluição seriada na base 10 (500 ng a 31,25 ng). Eficiência da reação de 99,4%, coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,984 e coeficiente de angulação da regressão de –3,337. Araçatuba, 2015.



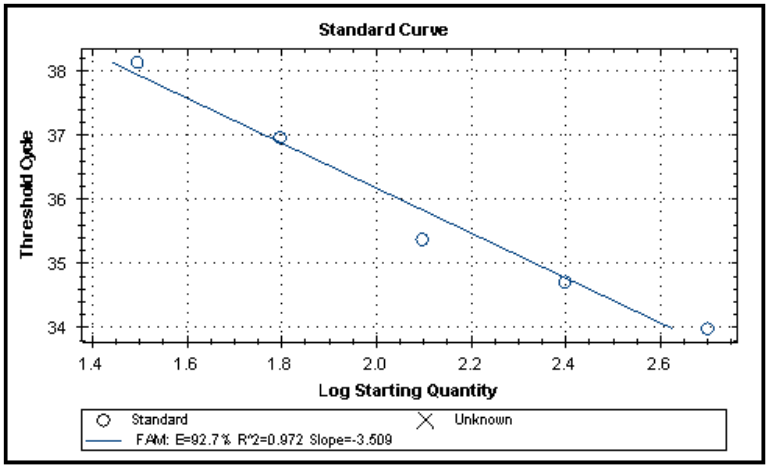
Apêndice 7B - Curva padrão de IFN-γ do "pool" de amostras de baço de gatos, com seis pontos, em duplicata, em intervalos de diluição seriada na base 10 (500 ng a 15,62 ng). Eficiência da reação de 98,3%, coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,990 e coeficiente de angulação da regressão de – 3,362. Araçatuba, 2015.



Apêndice 8B - Curva padrão de TNF-α do *pool* de amostras de baço de gatos, com cinco pontos, em intervalos de diluição seriada na base 10 (500 ng a 31,25 ng). Eficiência da reação de 99,9%, coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,991 e coeficiente de angulação da regressão de – 3,325. Araçatuba, 2015.

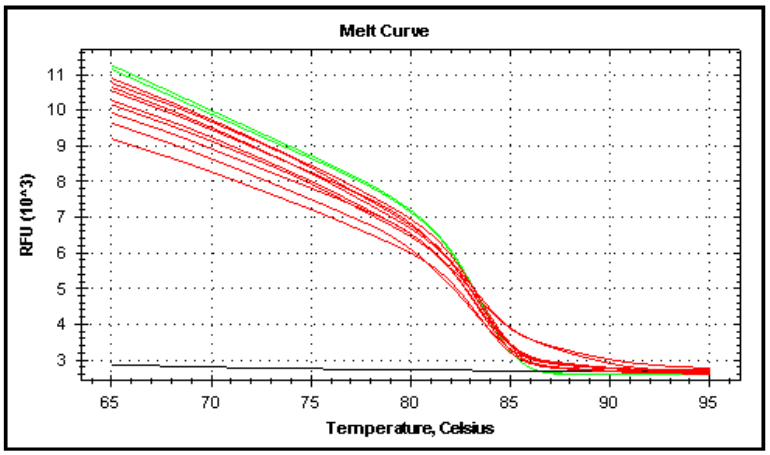


Apêndice 9B - Curva padrão de IL-2 do *pool* de amostras de baço de gatos, com seis pontos, em duplicata, em intervalos de diluição seriada na base 10 (500 ng a 15,62 ng). Eficiência da reação de 99,8%, coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,974 e coeficiente de angulação da regressão de – 3,326. Araçatuba, 2015.

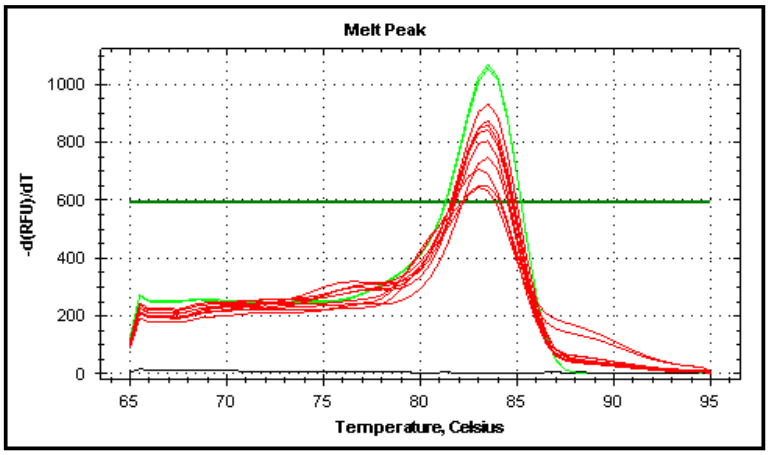


Apêndice 10B - Curva padrão de IL-5 do *pool* de amostras de baço de gatos, com cinco pontos, em intervalos de diluição seriada na base 10 (500 ng a 31,25 ng). Eficiência da reação de 92,7%, coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,972 e coeficiente de angulação da regressão de – 3,509. Araçatuba, 2015.

APÊNDICE C. Resultado da qPCR das amostras de medula óssea dos gatos do grupo infectado.

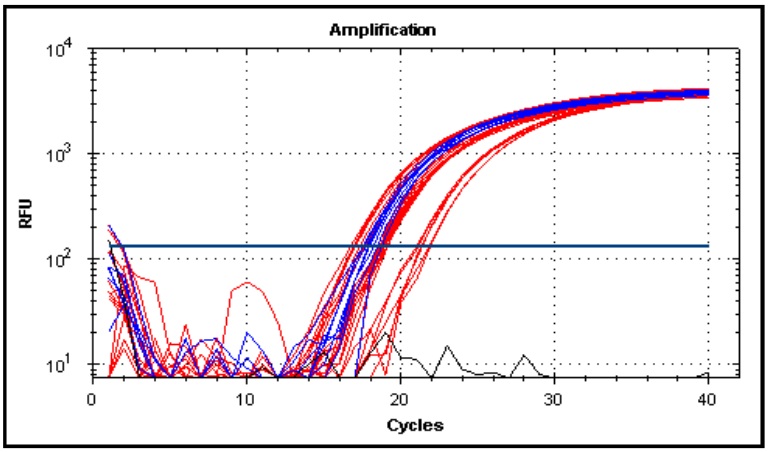


Apêndice 1C - Curva de dissociação das amostras de medula óssea do grupo infectado, cujo DNA de *Leishmania* spp. foi amplificado por PCR em Tempo Real. Vermelho: gatos infectados; Verde: Controle positivo (Cultura de *L. infantum chagasi)*; Preto: Controle negativo. Temperatura de dissociação de 83,5°C a 84°C. Araçatuba-SP, 2015.

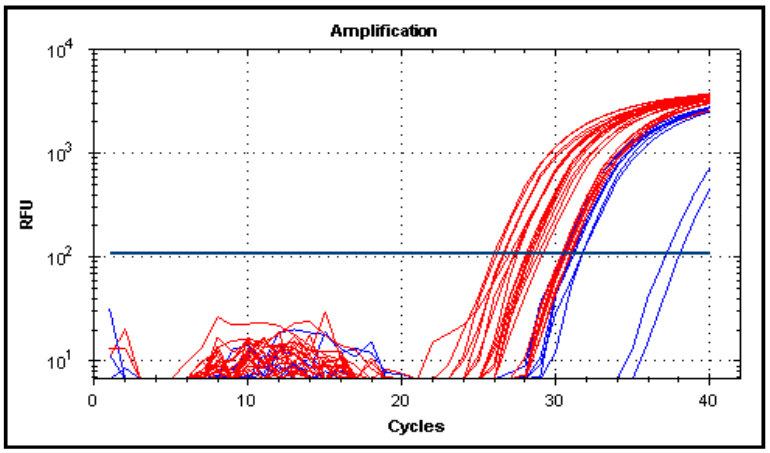


Apêndice 2C- Picos de dissociação das amostras de medula óssea do grupo infectado, cujo DNA de *Leishmania* spp. foi amplificado por PCR em Tempo Real. Vermelho: gatos infectados; Verde: Controle positivo (Cultura de *L. infantum chagasi*); Preto: Controle negativo. Temperatura de dissociação de 83,5°C a 84°C. Araçatuba-SP, 2015.

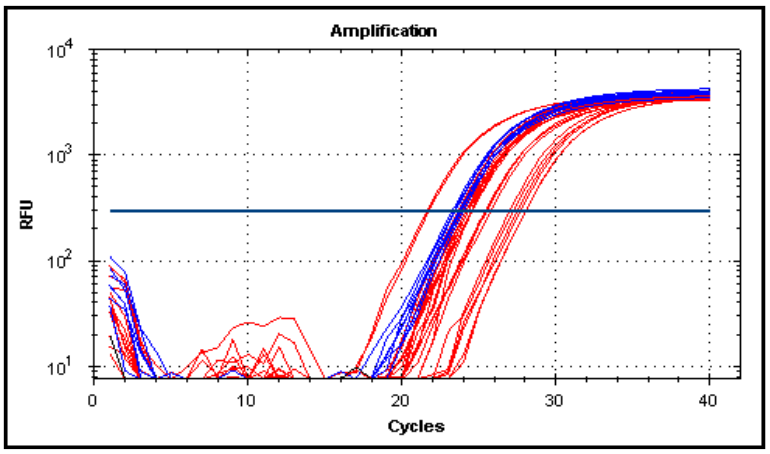
APÊNDICE D. Expressão gênica de mRNA do gene de referência e das citocinas no baço de gatos infectados e não infectados por *Leishmania* spp.



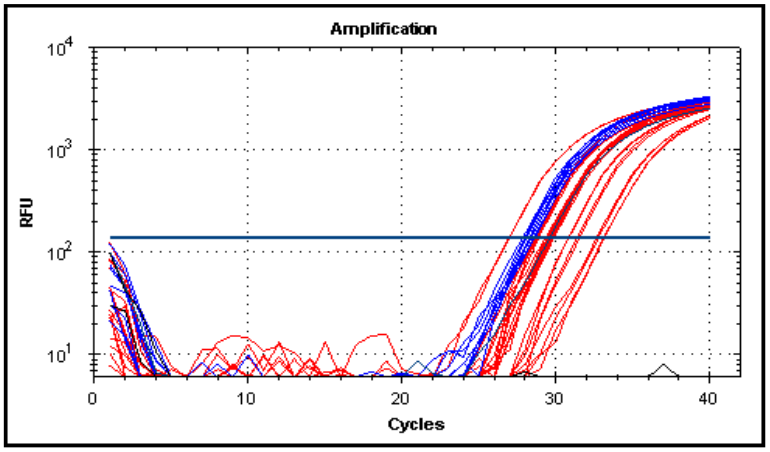
Apêndice 1D - Expressão gênica de mRNA do gene de referência GAPDH obtida por qPCR em amostras de baço de gatos naturalmente infectados por *Leishmania* spp. (grupo infectado - vermelho) e em gatos hígidos não infectados (grupo controle - azul). Preto: Controle negativo. Araçatuba-SP, 2015.



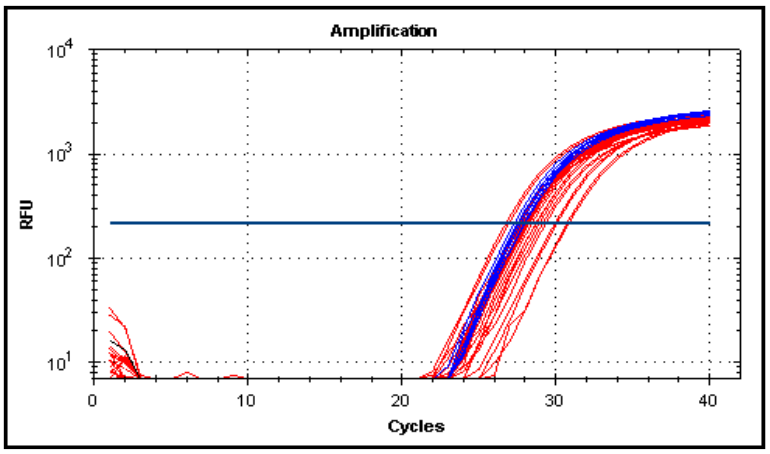
Apêndice 2D - Expressão gênica de mRNA de IFN-γ obtida por qPCR em amostras de baço de gatos naturalmente infectados por *Leishmania* spp. (grupo infectado - vermelho) e em gatos hígidos não infectados (grupo controle - azul). Preto: Controle negativo. Araçatuba-SP, 2015.



Apêndice 3D - Expressão gênica de mRNA de TNF-α obtida por qPCR em amostras de baço de gatos naturalmente infectados por *Leishmania* spp. (grupo infectado - vermelho) e em gatos hígidos não infectados (grupo controle - azul). Preto: Controle negativo. Araçatuba-SP, 2015.



Apêndice 4D - Expressão gênica de mRNA de IL-2 obtida por qPCR em amostras de baço de gatos naturalmente infectados por *Leishmania* spp. (grupo infectado - vermelho) e em gatos hígidos não infectados (grupo controle - azul). Preto: Controle negativo. Araçatuba-SP, 2015.



Apêndice 5D - Expressão gênica de mRNA de IL-5 obtida por qPCR em amostras de baço de gatos naturalmente infectados por *Leishmania* spp. (grupo infectado - vermelho) e em gatos hígidos não infectados (grupo controle - azul). Preto: Controle negativo. Araçatuba-SP, 2015.

APÊNDICE E - RT-PCR em tempo real para avaliação da expressão gênica de citocinas – Cts médios.

Apêndice 1E – Valores médios de Ct da expressão gênica do gene de referência GAPDH e das citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-2 e IL-5 por qPCR do baço de 12 gatos naturalmente infectados por *Leishmania* spp. (grupo infectado) e de quatro gatos hígidos (grupo controle). Araçatuba, 2015.

GRUPO	AMOSTRA	Ct MÉDIO				
		GAPDH	IFN-GAMA	TNF-ALFA	IL-2	IL-5
G1	1	18,61	28,45	25,35	29,34	27,88
	2	21,05	29,00	28,01	32,84	29,20
	3	16,89	26,06	24,36	30,81	27,67
	4	18,85	27,14	25,55	29,76	27,77
	5	19,08	28,27	24,43	29,50	27,86
	6	17,90	26,55	24,16	29,56	28,11
	7	21,27	30,96	27,51	31,40	29,98
	8	21,82	30,64	27,08	32,93	30,73
	9	18,51	30,34	23,58	29,45	28,77
	10	17,58	28,11	23,83	28,70	27,79
	11	16,84	27,36	21,60	26,97	26,81
	12	18,78	30,42	24,19	28,71	28,53
G2	13	18,51	31,68	23,52	28,32	27,83
	14	17,56	37,62	23,78	28,53	27,78
	15	17,63	30,41	23,27	28,11	27,55
	16	18,03	31,11	23,80	27,96	27,37