

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

**COMPARTIMENTALIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E SUA  
RELAÇÃO COM O PERFIL DE CITOCINAS EM DIFERENTES  
ÓRGÃOS DE CÃES LEISHMANIOSE VISCERAL**

**Márcio de Barros Bandarra**  
Médico Veterinário

2014

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

**COMPARTIMENTALIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E SUA  
RELAÇÃO COM O PERFIL DE CITOCINAS EM DIFERENTES  
ÓRGÃOS DE CÃES LEISHMANIOSE VISCERAL**

Márcio de Barros Bandarra

**Orientador: Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Flávia Lombardi Lopes**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de Patologia Animal

**2014**

**Na viagem pela vida não existem caminhos planos: todos são subidas ou descidas. Arturo Graf**

**Ao meu pai Enio (*In Memoriam*):**

**Você é e sempre será o meu referencial de vida,**

**Este trabalho dedico a você.**

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Rosemeri de Oliveira Vasconcelos. Com certeza uma das responsáveis por esta conquista. A senhora sempre esteve do nosso lado, apoiando, puxando a orelha nas horas certas. Professora, Maestrina e mãe científica muito obrigado por tudo, todas as conquistas devo a senhora.

Aos meus pais, Enio Pedone Bandarra (*In Memoriam*) e Sandra Amando de Barros Bandarra que sempre estiveram e estarão do meu lado, me dando forças e me encorajando para conquistar voos mais altos. Obrigado por serem meu tudo, meu porto. Amo vocês.

A minha esposa Ana Beatriz Garcia Faitarone Bandarra, que além de esposa, é minha amiga, confidente, companheira, enfim Amor você é meu tudo, com certeza sem você do meu lado não chegaria aqui. Obrigado por você existir e estar comigo sempre. TE AMOOOOO.

Aos meus irmãos, os quais sempre estavam torcendo, cobrando, e com certeza ajudando em todos os momentos difíceis, me encorajando e incentivando neste caminho. Amo vocês.

A minha tia-mãe Herminia Gomes, a qual é imprescindível em todas as fases da minha vida, uma das pessoas que me ensinou a viver e ser homem. Mimi te amo muito. Obrigado.

A minha sogra-mãe Maria Tereza Garcia Faitarone, minha sogra predileta, a qual com certeza tem uma enorme participação nesta conquista. Obrigado por ser esta pessoa maravilhosa que é. Amo muito a senhora.

Ao meu Sogro Faiçal Faitarone, um pai com certeza e também meu sogro predileto, obrigado por todos os conselhos, ajudas e apoio.

Ao Professor Danísio Prado Munari, pelo apoio e ajuda indispensáveis durante todo o período do mestrado e doutorado e com os conselhos e companheirismo.

Ao meu amigo-irmão Filipe Santos Fernando, Doutor, não existem palavras para agradecer tudo que fez por mim. Só agradeço a Deus por ter ganhado um irmão como você.

A minha grande amiga Pamela Rodrigues Reina Moreira, pelo companheirismo, amizade dispensada nesses cinco anos, também pela sua paciência, risadas. Com

certeza tornou minha pós graduação mais feliz pelas inúmeras risadas momentos felizes e com certeza pelas ajudas. Pam muito obrigado pela sua dedicação, amizade e parceria.

A residente da Patologia Silvia Helena Campusano, amiga, parceira de todas as horas. Si, com certeza você tornou este trabalho mais fácil com suas risadas e companhismo.

Ao residente Rafael Baia.. Obrigado amigo pela paciência e ajuda em todos os momentos.

Ao professor Helio Montassier, pelos ensinamentos e ajuda indispensável para a realização deste trabalho.

A Professora e amiga Renée, que além de eu ser fã é uma das responsáveis pela minha formação acadêmica, sempre um espelho pessoal e profissional, uma amiga que sempre estendeu sua mão para ajudar. Renée muito obrigado por participar destes momentos especiais em minha vida.

A professora e amiga Giovana Wingeter, uma grande amiga e também responsável pela minha formação profissional e pessoal, desde as conversas durante a residência, assim como as conversas durante o meu estágio na UEL. A conclusão de minha monografia e orientação da mesma foi indispensável para que eu crescesse. Gi obrigado por sempre me ajudar e aconselhar.

Aos meus amigos irmãos da Republica Antro do HV, Copm certeza vocês são e foram uma grande parte da minha formação. Obrigado a todos.

A minha amiga Georgia Modé Magalhães por todos os momentos, conselhos, sorrisos e ajuda em todos os momentos da minha pós-graduação.

Aos meus companheiros e companheiras de mestrado, com certeza vocês colaboraram muito com esta realização e tornaram tudo mais fácil.

A todos os professores do Departamento de Patologia Animal da FCAV-UNESP, pelas colaborações, ensinamentos, conselhos e com certeza as ajudas. Aqui meu agradecimento.

Aos funcionários do departamento de Patologia Animal da FCAV UNESP, Téo, Edgar, Chica, Moema e Cris, que sem duvida tornaram os dias de trabalhos mais felizes e sempre se mostraram dispostos a ajudar. Obrigado.

A Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP pela concessão de bolsa de doutorado (2010/16030-8).

Aos Amigos que fiz aqui em Jaboticabal, sem exceção, pelos dias felizes e pelo companheirismo nesta fase.

E a todos aqueles que fizeram ou fazem parte de minha vida e que certamente de alguma forma colaboraram para a conclusão deste trabalho.

## SUMÁRIO

	<b>Páginas</b>
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 Aspectos Gerais da Leishmaniose Visceral.....	03
2.2 Sinais clínicos e alterações histopatológicas na LV.....	04
2.3 Resposta imune na LV.....	07
3. OBJETIVOS	
3.1 Objetivos Gerais.....	12
3.2 Objetivos Específicos.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 Colheita de material.....	13
4.2 Quantificação do DNA de <i>L. infantum chagasi</i> , citocinas e fatores de transcrição por qPCR.....	14
4.2.1 Extração de mRNA e DNA.....	14
4.2.2 Reação de Transcrição Reversa (RT).....	14
4.2.3 Quantificação da expressão de genes de respostas imunes e da <i>Leishmania infantum chagasi</i> .....	15
4.2.4 Construção da curva padrão para quantificação absoluta de fragmento do gene de <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i> por qPCR.....	18
4.3 Análise estatística.....	19
5. RESULTADOS.....	21
5.1 Quantificação de <i>Leishmania infantum chagasi</i> por qPCR.....	21

5.1.1 Construção da curva padrão para quantificação absoluta	21
5.1.2 Quantificação absoluta de <i>Leishmania infantum</i> <i>chagasi</i> .....	22
5.1.3 Quantificação relativa de mRNA dos genes IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , T-bet, GATA-3 e MIF no linfonodo poplíteo.....	24
5.1.4 Quantificação relativa de mRNA dos genes IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , T-bet, GATA-3 e MIF em linfonodo pré-escapular.....	26
5.1.5 Quantificação relativa de mRNA dos genes IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , T-bet, GATA-3 e MIF no fígado.....	28
5.1.6 Quantificação relativa de mRNA dos genes IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , T-bet, GATA-3 e MIF no baço.....	29
6. DISCUSSÃO.....	32
7. CONCLUSÕES.....	39
8. REFERÊNCIAS.....	40

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>FIGURA 1-</b> Representação esquemática do vetor pIDTSMART-AMP : GENE1 (IDT, USA), no qual foi inserido um fragmento 90 pb do gene alpha da DNA polymerase de Leishmania chagasi.....	19
<b>FIGURA 2A -</b> Resultados dos Cqs das duplicatas obtidos a partir das diluições seriadas de razão constante igual a 10 (10-1 a 10-8).....	21
<b>FIGURA 2B -</b> Curva padrão gerada com uso dos valores de C(q) vs. Log10 das diluições seriadas de razão 10 (10-1 a 10-8) do DNA plasmidial correspondente a um fragmento de 90 pb da região do gene alpha da DNA polymerase da Leishmania infantum chagasi. A eficiência da reação foi de 104,17%, estimada com base no coeficiente angular da reta como indicado pela fórmula.....	22
<b>FIGURA 3 -</b> Quantificação do DNA do parasita Leishmania infantum chagasi no fígado, linfonodo pré-escapular, linfonodo poplíteo e baço. AS = cães assintomáticos. Teste de comparação múltipla de Dunn (P=0,1606).....	23
<b>FIGURA 4 -</b> Quantificação do DNA de Leishmania infantum chagasi no fígado, linfonodo pré-escapular, linfonodo poplíteo, baço de cães sintomáticos. S = cães sintomáticos. Teste de comparação múltipla de Dunn. * (P<0,05); *** (P<0,0001).....	24

**FIGURA 5** - Quantificação de mRNA das citocinas (IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , MIF) e dos fatores de transcrição (Tbet e GATA-3) em linfonodo poplíteo de cães sintomáticos (S), assintomáticos (AS) e controle (C). Os “whiskers” representam os maiores e os menores valores observados para expressão de cada citocina ou fator de transcrição dentro de cada grupo. Teste de comparação múltipla de Dunn. \* (P<0,05); \*\* (P<0,01); \*\*\* (P<0,0001). Fold change = número de vezes de aumento da expressão gênica em relação ao grupo controle.....

26

**FIGURA 6** - Quantificação de mRNA das citocinas (IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , MIF) e dos fatores de transcrição (Tbet e GATA-3) em linfonodo pré-escapular de cães sintomáticos (S), assintomáticos (AS) e controle (C). Os “whiskers” representam os maiores e os menores valores observados para a expressão de cada citocina ou fator de transcrição dentro de cada grupo. Teste de comparação múltipla de Dunn. \* (P<0,05); \*\* (P<0,01); \*\*\* (P<0,0001). Fold change = número de vezes de aumento da expressão gênica em relação ao grupo controle.....

27

**FIGURA 7** - Quantificação de mRNA das citocinas (IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , MIF) e dos fatores de transcrição (Tbet e GATA-3) em fígado de cães sintomáticos (S), assintomáticos (AS) e controle (C). Os “whiskers” representam os maiores e os menores valores observados para a expressão de cada citocina ou fator de transcrição dentro de cada grupo. Teste de comparação múltipla de Dunn. \* (P<0,05); \*\*\* (P<0,0001). Fold change = número de vezes de aumento da expressão gênica em relação ao grupo controle.....

**FIGURA 8** - Quantificação de mRNA das citocinas (IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , MIF) e dos fatores de transcrição (Tbet e GATA-3) em baço de cães sintomáticos (S), assintomáticos (AS) e controle (C). Os “whiskers” representam os maiores e os menores valores observados para a expressão de cada citocina ou fator de transcrição dentro de cada grupo. Teste de comparação múltipla de Dunn. \* (P<0,05); \*\* (P<0,01). Fold change = número de vezes de aumento da expressão gênica em relação ao grupo controle.....

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>TABELA 1</b> – Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na técnica de qPCR (Leishmania) e qRT-PCR, incluindo o número de acesso no Genbank, comprimento dos fragmentos amplificados e a respectiva referência.....	17
<b>TABELA 2</b> - Valores de Medianas da expressão gênica das citocinas, fatores de transcrição e da carga parasitária nos grupos de cães com Leishmaniose Visceral e controle, dentro de cada órgão.....	31

## COMPARTIMENTALIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E SUA RELAÇÃO COM O PERFIL DE CITOCINAS EM DIFERENTES ÓRGÃOS DE CÃES LEISHMANIOSE VISCERAL

**RESUMO-** A resposta imune de cães com Leishmaniose Visceral (LV) pode apresentar um perfil variado de citocinas, com predominância de citocinas pró-inflamatórias (resistência) ou anti-inflamatórias (susceptibilidade), dificultando ou favorecendo a multiplicação do protozoário *Leishmania infantum chagasi* nos tecidos do hospedeiro. Nesses animais existe um desequilíbrio entre os perfis das respostas imunes Th1 e Th2. A avaliação da resposta imunológica destes cães com diferentes manifestações clínicas de LV é de fundamental importância para a compreensão da patogenia da doença. O objetivo geral deste estudo foi avaliar o perfil de citocinas Th1, Th2 e regulatórias, fatores de transcrição (T-bet e GATA-3) e carga parasitária em cães com LV e controle, no fígado, baço e linfonodos poplíteo e pré-escapular, para verificar possíveis diferenças na resposta imune compartimentalizada. Neste estudo foram utilizados 28 cães de área endêmica para a LV e cinco cães de área não endêmica (controle). Os cães infectados foram separados em grupos sintomático (n=16) e assintomático (n=12). A quantificação da expressão dos genes das citocinas (IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-10, IL-4, IL-12 e MIF), da carga parasitária tecidual e dos fatores de transcrição foi feita por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real, em amostras de tecidos dos diferentes órgãos. O baço e os linfonodos poplíteo e pré-escapular foram os órgãos que apresentaram maior número de cópias do DNA da *Leishmania infantum chagasi*. Os resultados da expressão dos genes de citocinas mostraram que houve um aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MIF, IL-12), anti-inflamatórias (IL-4) e regulatórias (IL-10, TGF- $\beta$ ) nos grupos de cães infectados, algumas com diferenças significativas do grupo controle ( $P < 0,05$ ). Enquanto o fator de transcrição T-bet teve níveis mais elevados nos animais assintomáticos. Em conclusão GATA-3 foi menos expresso no grupo de cães infectados sugerindo assim que exista outros mecanismos envolvidos na sua ativação e consequente ativação de uma resposta imune tipo Th2. A resposta imune à *Leishmania sp.* que favorece a disseminação sistêmica do parasito, não são polarizadas para um perfil Th1 ou Th2, mas apresentam um padrão de resposta imune misto Th1/Th2, porém pouco eficiente no controle do parasito em órgãos mais susceptíveis e nos cães com doença avançada.

**Palavras-chave:** Citocinas, *Leishmania infantum chagasi*, resistência, susceptibilidade, Th1, Th2.

**COMPARTMENTALIZATION THE I**

## **IMMUNE RESPONSE AND ITS RELATION TO THE PROFILE CYTOKINES IN DIFFERENT ORGANS OF DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS**

**ABSTRACT-** The immune response of dogs with visceral leishmaniasis (VL) may present a varied profile of cytokines, predominantly proinflammatory (resistance) or anti-inflammatory (susceptibility) cytokines, hindering or favoring the multiplication of the protozoan *Leishmania infantum chagasi* in the host tissues. In these animals there is an imbalance between the profiles of Th1 and Th2 immune response. The evaluation of the immune response of these dogs with different clinical manifestations of VL is crucial for understanding the pathogenesis of the disease. The aim of this study was to evaluate the profile of Th1, Th2 and regulatory cytokines, transcription factors (T-bet and GATA-3) and parasite load in dogs with VL and control, in the liver, spleen and popliteal and prescapular lymph nodes to verify possible differences in compartmentalized immune response. In this study 28 dogs from an endemic area for VL and five dogs from non-endemic area (control) were used. The infected dogs were divided into symptomatic (n = 16) and asymptomatic (n = 12) groups of dogs. The quantification of the gene expression of cytokines (IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-10, IL-4, IL-12 and MIF) and tissue parasitic load of the transcription factors was done using the technique of quantitative PCR in real time, tissue samples from different organs. The spleen and popliteal and pre-scapular lymph nodes were the organs that showed a higher number of copies of the DNA of *Leishmania infantum chagasi*. The results of the expression of cytokine genes showed that there was an increased expression of pro-inflammatory (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MIF, IL-12), anti-inflammatory (IL-4) and regulatory cytokines (IL-10, TGF- $\beta$ ) in groups of infected dogs, with some significant differences from the control group (P <0.05). While the transcription factor T-bet had higher levels in asymptomatic animals. In conclusion GATA-3 was less expressed in the group of infected dogs suggesting that there other mechanisms involved in its activation and subsequent activation of a Th2-type immune response. The immune response to *Leishmania* sp. Response that favors the systemic dissemination of the parasite, are not polarized for Th1 or Th2 profile, but have a mixed

pattern Th1/Th2, but not efficient in controlling the parasite in susceptible organs or in dogs with advanced disease.

**Keywords:** Citokynes, *Leishmania infantum chagasi*, resistance, susceptibility, Th1, Th2.

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma zoonose de controle prioritário no mundo, com duas formas de apresentação clínica, a Leishmaniose Tegumentar (LT) e a Leishmaniose Visceral (LV). Esta enfermidade é uma doença debilitante e muitas vezes leva o animal a óbito. A LV é causada por protozoários do complexo *Leishmania donovani* e no Brasil, o agente etiológico responsável pela doença é a *Leishmania infantum chagasi*. O Brasil apresenta 90% dos casos descritos nos países do continente americano. No território brasileiro a LV tem sido relatada em várias regiões, devido ao desmatamento e crescimento urbano desorganizado das cidades e com a adaptação do vetor *Lutzomyia longipalpis*, o qual apresenta hábitos peridomiciliares.

A LV mostra-se mais prevalente na população canina quando comparada à população humana, fazendo dos cães o principal reservatório da doença. O índice de infecção humana está relacionado ao fato de animais com ou sem sinais clínicos serem fontes de infecção para o homem, devido ao elevado número de formas amastigotas do parasito encontradas no tecido cutâneo destes cães, independentemente do estágio clínico do animal. A forma amastigota do parasito é intracelular obrigatória e tem como sua principal célula alvo os macrófagos. Nos macrófagos do hospedeiro vertebrado, os parasitos multiplicam-se, infectam outras células e se disseminam para vários órgãos, inclusive a pele, onde são novamente fagocitados, tornando-se disponíveis para o vetor durante seu repasto sanguíneo. Nos cães parasitados, os sinais clínicos mais frequentes são linfadenomegalia, onicogrifose, lesões de pele, caquexia, anormalidades locomotoras, lesões oculares, anorexia, diarreia, epistaxe e falência renal. Por outro lado, animais parasitados podem não apresentar nenhuma sintomatologia clínica, classificados então classificados como assintomáticos, tal grupo constitui-se em um importante elemento na cadeia epidemiológica da doença.

Vários estudos relatam que o surgimento das lesões e o aparecimento dos sinais clínicos estão diretamente relacionados ao tipo de resposta imune estimulada no

hospedeiro, já que os cães que demonstram predominância de um perfil de resposta Th1 tendem a apresentar uma sintomatologia mais branda e baixa carga parasitária, ao contrário dos animais com predomínio da resposta Th2, que apresentam lesões mais exuberantes e maior carga de parasitos nos órgãos afetados.

As citocinas desempenham um papel fundamental na indução do tipo de resposta imune e, conseqüentemente, no controle ou favorecimento da infecção. As citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 são as principais responsáveis pela ativação de um perfil de resposta imune tipo Th1, ativando macrófagos e desempenhando uma função fundamental para o controle da infecção. Já as citocinas IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  estão intimamente ligadas a um perfil de resposta imune Th2, o qual favorece a multiplicação e permanência do protozoário no hospedeiro.

A expressão dos fatores de transcrição T-bet e GATA-3 é controlada por citocinas que irão determinar o perfil da resposta imune prevalente na LV. T-bet é ativado principalmente pelas citocinas IFN- $\gamma$  e IL-12, regulando o sistema imune para um perfil de resposta imune do tipo Th1. Enquanto GATA-3 tem a citocina IL-4 como um potente ativador, fazendo com que ocorra então a diferenciação de células T para um perfil do tipo Th2.

Estudos prévios demonstraram a importância de se avaliar o perfil de citocinas e a sua relação com a expressão de fatores de transcrição responsáveis pela ativação de uma resposta Th1 ou Th2, a qual pode controlar ou favorecer a multiplicação do protozoário *Leishmania* sp. nos tecidos do hospedeiro. Da mesma forma, investigar a visceralização da doença, permite avaliar as diferentes respostas imunes de cada órgão e assim contribuir para o melhor entendimento da patogenia da doença. Frente ao exposto, este estudo tem a finalidade de contribuir com um melhor entendimento da patogenia da LV e identificar o microambiente em diferentes órgãos de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum chagasi*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos Gerais da Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença emergente e de ocorrência mundial, sendo uma zoonose de origem parasitária causada por um grupo de protozoários do gênero *Leishmania*. No Brasil, o protozoário *Leishmania infantum chagasi* pertencente à ordem Kinetoplastida, subordem Trypanosomatina e família Trypanosomatidae é o responsável pela infecção. Este é um parasito intracelular obrigatório de macrófagos e pode ser encontrado na forma promastigota e amastigota. A forma promastigota ocorre no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados, enquanto a forma amastigota é encontrada em hospedeiros vertebrados no interior do citoplasma de fagócitos (REY, 2001, WHO, 2008).

A população canina é considerada epidemiologicamente a mais importante, tendo em vista que os cães infectados independentemente do seu estágio clínico apresentam elevado número de parasitos no tecido cutâneo, tornando-se o principal reservatório e fonte de infecção da doença (REY, 2001). Outros hospedeiros como os mamíferos selvagens podem ou não apresentar efeitos patossintomatologia clínica quando infectados por *Leishmania* sp. demonstrando assim um equilíbrio na relação parasito hospedeiro (FALQUETO e SESSA, 2005).

O ciclo biológico da *Leishmania infantum chagasi* inicia-se pela transmissão que ocorre por meio da picada do vetor flebotômico, o qual ingere durante o repasto sanguíneo as formas amastigotas do protozoário. No vetor ocorre a transformação da forma amastigota para a forma promastigota, a qual no intestino do inseto diferencia-se e multiplicam-se. A promastigota metacíclica que é a forma infectante chega à proboscide do vetor e é inoculada na pele do hospedeiro vertebrado pelo repasto sanguíneo. As formas promastigotas inseridas na pele do hospedeiro são fagocitadas pelos macrófagos e sofrem então diferenciação para a forma amastigota (flagelo não

exteriorizado), a qual multiplica-se e rompe a membrana celular destas células alcançando o meio extracelular onde será fagocitada por outros macrófagos. Isto ocorre de forma repetitiva levando a disseminação do protozoário pelo organismo do hospedeiro vertebrado (REY, 2001; BRASIL, 2006).

A LV canina foi diagnosticada no estado de São Paulo, pela primeira vez em 1998, na Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (UNESP – FMVA). Na cidade de Araçatuba estima-se, que entre os anos de 2002 e 2006, cerca de 37.000 cães com LV foram submetidos à eutanásia. A LV em humanos teve sua primeira descrição no estado de São Paulo no ano de 1999 na mesma região (BRASIL, 2006; ZORZETTO, 2008).

Geograficamente a Leishmaniose Visceral Humana nas Américas ocorre desde o México até a Argentina, apresentando 90% dos casos humanos relatados no Brasil (GRIMALDI et al., 1989). Casos humanos já foram identificados em 19 estados brasileiros, sendo mais prevalente na região Nordeste (MELO, 2004). A Leishmaniose Visceral Humana tem apresentado uma taxa de mortalidade elevada e comportamento epidemiológico clínico com aumento de casos em períodos de cinco anos, em média, em muitos estados brasileiros (SAVANI et al., 2003; NAVEDA et al., 2006, ALVES, 2009).

## **2.2 Sinais clínicos e alterações histopatológicas na LV**

Os sinais clínicos na LVC são variados e podem não ser visíveis, ou seja, os cães infectados podem variar desde um aspecto aparentemente saudável até apresentarem uma caquexia severa. Alterações cutâneas são comuns e caracterizam-se por alopecia focal ou generalizada, despigmentação cutânea, ulcerações crostosas, principalmente em locais de contato com o inseto vetor, como a ponta de orelhas, extremidades de membros e plano nasal. Outros achados descritos são onicogribose, hemorragia intestinal, diarreia, apatia, alterações oculares, epistaxe, hepatomegalia, esplenomegalia e lesões renais, tais como, glomerulonefrite proliferativa e nefrite intersticial. O óbito de cães com LV é consequência, na maioria

das vezes, de uma insuficiência renal crônica (MARZOCHI et al., 1985; SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; ASHFORD, 2000; LIMA et al., 2004; GIUNCHETTI et al., 2008).

Os linfonodos, baço, pele, fígado e medula-óssea são órgãos ricos em células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM), e devido a este fato, a hipertrofia e hiperplasia destas células são as principais alterações associadas à infecção pelo protozoário em cães (TAFURI et al., 1996; TAFURI et al., 2001; LIMA et al., 2004).

Nos linfonodos, a linfadenomegalia é comumente encontrada nos animais sintomáticos associada à hiperplasia reativa deste órgão observada no exame citológico. Plasmócitos, macrófagos e neutrófilos são os principais componentes do infiltrado inflamatório na LV, sendo este último tipo celular não encontrado na avaliação de linfonodos poplíteos e pré-escapulares em cães naturalmente infectados (LIMA et al., 2004; MYLONAKIS et al. 2005, GIUNCHETTI et al., 2008, MOREIRA et al. 2010).

O aumento de volume de folículos linfóides e a reatividade de macrófagos na região medular dos linfonodos de cães com LV não foram relacionados com o número de parasitos ou com a presença de lesões clínicas (LIMA et al. 2004). A linfadenopatia generalizada é o resultado destas alterações em mais de 90% dos casos. Os linfonodos apresentavam inicialmente um aspecto exsudativo, o qual evoluía gradualmente para um aspecto proliferativo (MARZOCHI et al. 1985, NUNES et al. 2001). Outros autores descrevem que a medida que a sintomatologia clínica avançava nos cães sintomáticos, observava-se uma atrofia linfóide marcante e uma reação inflamatória granulomatosa mais intensa nos linfonodos periféricos (GIUNCHETTI et al., 2008, MOREIRA et al., 2010 e 2013).

O baço parece ser o órgão mais susceptível à multiplicação do parasito quando comparado ao fígado em cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum chagasi* (PENHA, 2011). A esplenomegalia na LV é decorrência do infiltrado inflamatório crônico e à elevada densidade de parasitos, porém este órgão pode não estar aumentado ou então ligeiramente aumentado (REIS et al., 2009).

As reações granulomatosas encontradas no baço apresentam diferenças quando comparadas aos granulomas hepáticos, onde nos granulomas esplênicos, observam-se limites pobremente definidos e poucos linfócitos entremeados aos macrófagos, enquanto que no fígado os granulomas apresentam bordas definidas e a presença de linfócitos é mais significativa (MOREIRA, 2013). Mariano (1995) afirma que macrófagos são os principais componentes da inflamação granulomatosa, pois diferenciam-se em células epitelióides e em células gigantes, mas que a presença de linfócitos neste tipo de inflamação pode contribuir para a expansão ou para a resolução da lesão. Murphy et al. (2008) destacam que nos granulomas do tipo lepromatoso, a resposta de linfócitos T está reduzida ou ausente (Mariano,1995). Estudos do nosso grupo de pesquisa revelaram que a reação granulomatosa esplênica geralmente é acompanhada de desorganização da arquitetura do baço e contribuem para a esplenomegalia, no entanto este tipo de inflamação crônica não parece contribuir para a eliminação do parasita, pois estes aspectos sempre estiveram associados a maior densidade de parasitos no tecido esplênico e a presença de sinais clínicos de LV nestes cães (MOREIRA, 2013). Na infecção com *L. donovani* foi descrita uma falha na migração das células dendríticas da zona marginal para a região linfoide periarteriolar do baço, que é rica em linfócitos T. Esta alteração resultou em falha na apresentação antigênica (WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005). A depleção das áreas T dependentes na bainha periarteriolar ocorre devido à diminuição das células presentes nestas áreas, além da proliferação de macrófagos parasitados que também são responsáveis pela hiperplasia da polpa vermelha, podendo ser observados na forma de agregados ou nódulos celulares parasitados. Neste órgão, a plasmocitose é também um achado frequente (GENARO, 1993; TAFURI et al.,1996).

No fígado de cães com LV, observa-se normalmente hepatomegalia e processo inflamatório na cápsula, nos espaços-porta e presença de granulomas intralobulares e na região centrolobular, além de hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer (XAVIER et al., 2006; LIMA et al., 2007a; GIUNCHETTI et al., 2008; MELO, 2008, MOREIRA, 2013). Em cães assintomáticos, a presença de granulomas hepáticos foi

maior do que em cães sintomáticos, demonstrando que a infecção hepática pode ter capacidade de auto-resolução quando ocorre o predomínio de células mononucleares, como as células de Kupffer, macrófagos, linfócitos T (CD4 e CD8), que determinam a capacidade de eliminação do protozoário pelo hospedeiro (LIMA et al., 2007).

Em humanos observa-se ainda a presença de fibrose hepática e o aumento do espaço de Disse, por deposição de matriz extracelular (DUARTE et al., 2009). Estas alterações são características de resposta fundamentalmente intersticial à doença. A fibroplasia ocorre pelo aumento da atividade funcional das células estreladas hepáticas e, nesta fase a carga parasitária é baixa ou não é detectada (DUARTE, 1987).

### **2.3 Resposta imune na LV**

A geração de uma resposta imune celular (Th1), dirigida pela citocina IL-12 tem um papel fundamental na imunidade contra patógenos intracelulares. A polarização da resposta imune é influenciada pelo perfil de citocinas na fase inicial da infecção, seguida da ativação de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, que podem diferenciar-se nos subtipos Th1, Th2 ou Th17. Esta diferenciação envolve a ativação transcripcional e a modificação epigenética dos genes das citocinas. Defeitos na ativação dos subtipos de linfócitos TCD4 podem levar a quadros exacerbados de resposta pró-inflamatória ou à imunossupressão, causando danos aos tecidos injuriados ou dificultando a eliminação do agente agressor respectivamente (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

A LV é considerada uma doença imunomediada, já que o parasito tem a capacidade de modular alterações no perfil da resposta imune gerada pelo hospedeiro (SLAPPENDEL e FERRER, 1990, BARBIÉRI, 2006). A susceptibilidade ou resistência à LV é determinada por inúmeros fatores que são ainda pouco definidos, mas a genética do hospedeiro tem se mostrado um fator importante (PEARSON e SOUSA, 1996).

Na infecção por *Leishmania* sp. nos animais assintomáticos, o protozoário promove um doença sistêmica crônica podendo a evolução da doença ser aguda,

apresentar-se de forma latente ou ainda, evoluir para a cura espontânea (GENARO, 1993). A resistência (cães assintomáticos) frente ao parasito está associada com a ativação de células Th1 e produção de INF- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ . O principal mecanismo efetor envolvido na resposta imune protetora de cães infectados com *L. infantum chagasi* é a ativação de macrófagos por IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , o que promove a destruição de amastigotas intracelulares via L-arginina e síntese de óxido-nítrico (BARBIERI, 2006). Macrófagos, células dendríticas, linfócitos, citocinas (INF- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$ ) e fatores de transcrição, tais como, o fator de regulação de interferon-1 (IRF-1), são cruciais para a resolução de infecções por todas as espécies de *Leishmania* e para uma imunidade protetora longa (BOGDAN e ROLLINGHOFF, 1998). Nos cães infectados, o equilíbrio das respostas imune humoral e celular está relacionado com a severidade clínica e a evolução da doença (BRITO, 2006).

A susceptibilidade (cães sintomáticos) está associada à redução de linfócitos T CD4+ e proliferação do protozoário nos macrófagos, sugerindo que ocorra a ausência de resposta imune efetiva para controlar a multiplicação do parasito (CORRÊA et al., 2007). Nos cães sintomáticos observou-se alterações no perfil de resposta imune relacionadas a linfócitos T, tais como, ausência de hipersensibilidade tardia, diminuição de células mononucleares em sangue periférico e conseqüentemente ausência de INF- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$  produzidos por estas células (LUNA et al., 1999; SANTOS-GOMES et al., 2002; BARBIÉRI, 2006). A sobrevivência do protozoário e o agravamento dos sinais clínicos estão relacionados às citocinas TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-10, as quais são responsáveis pela supressão de macrófagos (BARBIÉRI, 2006; ALVES et al., 2009).

A citocina IL-12 é de extrema importância para a indução de resposta imune eficiente na LV. Estudos em modelos experimentais de camundongos demonstraram que na ausência desta citocina pode ocorrer um aumento compensatório da expressão de TGF- $\beta$  (WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005). A IL-12 é produzida por macrófagos e células dendríticas, enquanto IFN- $\gamma$  é produzido por linfócitos T. A ação destas duas citocinas está relacionada com o controle da infecção pelo parasito (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2011).

A citocina IL-10 pode inibir a produção de IL-12, como descrito na LV humana (NYLÉN e SACKS, 2007). Esta citocina é considerada imunossupressora e já foi descrita na LV humana na fase aguda, com expressão simultânea de IFN- $\gamma$  (WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005).

O fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) é uma citocina pró-inflamatória que se liga a receptores expressos nas superfícies de células apresentadoras de antígenos, ativando macrófagos e, como consequência, promovendo a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 e prostaglandina E2. A interação de MIF com os receptores das células apresentadoras de antígenos resulta na sobrevivência de linfócitos B pela supressão da apoptose (KAMIR et al., 2008). MIF apresenta também uma atividade anti-apoptótica em macrófagos, facilitando a persistência do protozoário nestas células (KAMIR et al., 2008, SATOSKAR et al., 2001).

Dois tipos de MIF (MIF1 e MIF2) foram identificados em estudos com MIF recombinante de *L. major* e apresentaram estrutura similar com a citocina de mamíferos, mostrando que o parasito pode produzir a sua versão desta citocina. MIF2 foi encontrada em todos os estágios do ciclo do protozoário, enquanto MIF1 foi exclusiva de formas amastigotas, demonstrando assim que esta citocina produzida pelo parasito pode ter a capacidade de modular a resposta macrofágica do hospedeiro (RICHARDSON et al., 2009).

A imunodeteção de MIF foi avaliada nos linfonodos periféricos (poplíteo e subescapular) e cavitários (mesentérico e iliaco) de cães naturalmente infectados com *Leishmania* sp. Os cães sintomáticos foram os que apresentaram maior produção de MIF em macrófagos quando comparados àqueles assintomáticos, coincidindo também com a maior carga parasitária e lesões mais severas no linfonodo poplíteo (BANDARRA, 2010).

Existem dois fatores de transcrição envolvidos na diferenciação da resposta de linfócitos T CD4+ em Th1 ou Th2. Estes fatores pertencem a família T-box e são

expressos em linfócitos T e são denominados T-bet e GATA-3 (GATA-ligada a proteína-3) (LAMETSCHWANDTNER et al., 2004).

T-bet controla a linhagem celular T CD4+, regulando a produção de citocinas Th1 (INF- $\gamma$ ) e mantendo a função imune das células efectoras (GLIMCHER et al., 2004; PENG, 2006; SZABO et al., 2002). INF- $\gamma$  e IL4 exercem seus efeitos sobre a diferenciação Th1 e Th2, controlando a expressão de fatores de transcrição T-bet (SZABO et al., 2000) e GATA-3 (ZHENG E FLAVELL, 1997).

T-bet e GATA-3 são necessários para o desenvolvimento de células CD4<sup>+</sup> efectoras Th1 e Th2, respectivamente (SZABO et al., 2002; PAI et al., 2004). Estes fatores de transcrição interagem uns com os outros, por intermédio das citocinas (HO E GLIMCHER, 2002). IL-4 ligada ao receptor precursor de linfócitos Th (THP) ativa a sinalização do fator STAT6, que por translocação para o núcleo, induzem a rápida expressão do GATA-3 (ZHENG E FLAVELL, 1997; OUYANG et al., 2000).

Outras vias de sinalização, tais como, CD28 e OX40 (YATES et al., 2004) também podem induzir GATA-3. Expressão de GATA-3 é seguida pela indução do fator de transcrição C-MAF, um potente ativador do gene específico IL-4 (HO et al., 1996;). Isso forma uma retroalimentação positiva para IL-4 realizar a indução do GATA-3 e diferenciação de células T em Th2. Ao mesmo tempo, GATA-3 inibe a diferenciação de células T em Th1, tanto pelo aumento da produção de IL-4, bem como, inibindo o fator de transcrição T-bet (HO e GLIMCHER, 2002).

A sinalização de IL-12 e INF- $\gamma$  ativa STAT4 e STAT1, respectivamente, contribuindo para a expressão de T-bet (SZABO et al. 2000; YATES., 2004). T-bet ativa o gene específico de remodelação da cromatina, levando a secreção de INF-  $\gamma$  e aumenta a expressão da cadeia IL12Rb2, reforçando ainda mais os sinais de INF-  $\gamma$  e IL-12 (SZABO et al., 1997; YATES et al., 2004).

A análise da resposta imune em diferentes compartimentos durante a infecção crônica é uma útil e nova estratégia científica para o estudo das doenças infecciosas e parasitárias. Existem escassos estudos descrevendo os aspectos histopatológicos de

compartimentos (órgãos) distintos dos cães que são afetados pelo parasita (REIS et al., 2009).

Na literatura verificou-se que os cães naturalmente infectados pelo parasito *Leishmania* sp., independente do seu estadiamento clínico, apresentavam lesões crônicas que parecem ser pouco eficientes em controlar a multiplicação e sobrevivência do mesmo. Em modelos murinos e em estudos com a LV no homem foi relatado um desequilíbrio entre as respostas imunes Th1 e Th2, resultando em um padrão de resposta misto. Nos cães são escassos os estudos com este enfoque e quando ocorrem avaliam apenas um órgão do animal, dificultando a análise das alterações sistêmicas relacionadas à visceralização do protozoário *Leishmania*. O estímulo para a realização deste estudo foi avaliar se havia realmente um perfil Th1 ou Th2 predominante em cães com e sem sinais clínicos, refletindo resistência ou susceptibilidade respectivamente. Da mesma forma, houve interesse em investigar o microambiente dos principais órgãos-alvo da LV canina e com isso confirmar se a maior ou menor carga parasitária estaria relacionada com níveis mais elevados de expressão gênica de citocinas e fatores de transcrição anti ou pró-parasitos. Estes aspectos poderiam contribuir para a compreensão da complexa-relação entre o parasito e o hospedeiro canino e quem sabe futuramente estimulassem estudos com terapias que interferissem na resposta imune canina no controle da infecção.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Quantificar o DNA de *L. infantum chagasi* e avaliar o perfil de citocinas Th1 e Th2, de fatores de transcrição de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum chagasi*.

#### **3.2 Objeitvos Específicos**

- Realizar a quantificação absoluta do DNA de *L. infantum chagasi* no fígado, baço e linfonodos (poplíteo e pré-escapular) de cães naturalmente infectados, pela qPCR

- Determinar expressão predominante de citocinas (TGF-beta, TNF- $\alpha$ , IFN-gama, IL-12, IL-4, IL-10 e MIF) no fígado, baço e linfonodos (poplíteo e pré-escapular) de cães naturalmente infectados, pela qPCR.

- Determinar a predominância dos fatores de transcrição T-bet e GATA-3 no fígado, baço e linfonodos (poplíteo e pré-escapular) de cães naturalmente infectados, pela qPCR.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Colheita de material

No presente estudo foram utilizados 28 cães sem predileção por sexo, raça ou idade, que foram submetidos à eutanásia no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Araçatuba (SP), com diagnóstico sorológico positivo para LV, por meio do teste ELISA. A eutanásia de animais com LV foi realizada em cumprimento ao Decreto no. 51.838 do Ministério da Saúde do Brasil, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores de leishmaniose devam ser submetidos à eutanásia. O método de eutanásia empregado segue as recomendações da Resolução n°. 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, com indução anestésica com barbitúrico (Tiopental, Cristália Itapira, SP), seguida da administração de uma ampola de cloreto de potássio 19,1%, por via intravenosa.

A necropsia dos cães foi realizada imediatamente após o óbito. No exame externo dos cadáveres foram avaliadas as alterações macroscópicas como, onicogribose, lesões cutâneas, caquexia que permitiram classificá-los nos grupos sintomático (n=16) e assintomático (n=12), de acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2006).

Os fragmentos de fígado, baço e linfonodos poplíteo e pré-escapular foram fixados em solução de formol a 10% tamponado com fosfatos (pH 7,2), por 24 horas, para posterior processamento histopatológico e avaliação em microscopia de luz. Na técnica de qPCR, os fragmentos foram imediatamente após a coleta, armazenados em criotubos livres de RNase e DNase (Axygen) e imersos em solução de nitrogênio líquido por alguns segundos e, em seguida, armazenados em freezer a -80°C até a extração do DNA e RNA.

Para a formação do grupo controle foram colhidos linfonodos (poplíteo e pré-escapular), baço e fígado de cinco cães oriundos de região não endêmica para LV. Os animais que formaram este grupo eram aparentemente livres de doenças infecciosas ou

neoplásicas e foram oriundos da rotina de necropsias do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP, Jaboticabal, SP. A ausência de alterações macroscópicas nos órgãos estudados foi confirmada pelo exame histopatológico. Animais que apresentaram qualquer tipo de processo degenerativo ou inflamatório foram descartados do grupo controle, para não comprometer a avaliação da resposta imune dos mesmos.

O processamento do material para exame histopatológico foi realizado no Laboratório de Patologia Veterinária. Já a técnica de qPCR foi realizada no Laboratório de Imunologia Viral da FCAV-UNESP, Jaboticabal, SP.

## **4.2 Quantificação do DNA de *L. infantum chagasi*, citocinas e fatores de transcrição por qPCR**

### **4.2.1 Extração de RNA e DNA**

Para o procedimento de extração do RNA total das amostras de fígado, linfonodo poplíteo, linfonodo pré-escapular utilizou-se fragmentos de 25mg e baço utilizou-se fragmentos de 10mg, sendo a extração realizada com auxílio do kit comercial RNeasy Mini Kit (QIAGEN, USA), seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação da concentração de RNA foi feita pela determinação das absorvâncias a 260nm e 280nm em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (ThermoScientific, USA). A integridade de RNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose desnaturante a 1,2%.

Para a extração de DNA total, foram utilizados fragmentos de aproximadamente 25 mg de fígado, linfonodo poplíteo e linfonodo pré-escapular e 10 mg de baço. O procedimento de extração foi realizado com auxílio do kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, USA), seguindo as recomendações do fabricante.

### **4.2.2 Reação de Transcrição Reversa (RT)**

A reação de transcrição reversa foi efetuada em um Termociclador PTC –200 Peltier Thermal Cyler (MJ Research) incubando-se a 65°C durante cinco minutos: 50

ng do RNA total extraído; 0,5 nM de dNTP (LifeTechnologies), 0,5 µg de OligodT (LifeTechnologies, USA) e água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) em um volume final de 10 µL. Em seguida, foram acrescentados a este volume 4 µL do tampão da RT 5 x (LifeTechnologies, USA), 40 U (1 µL) de inibidor de ribonucleases (LifeTechnologies, USA) e 4 µL de água DEPC, os quais foram incubados a 42°C durante dois minutos. Por fim, foram adicionados 50 U da enzima SuperScript III (LifeTechnologies, USA), incubando-se a mistura à 42°C durante 50 minutos, seguido de 70°C por 15 minutos. O volume final da reação foi de 20 µL, o qual foi armazenado à -20°C para uso posterior na técnica de PCR quantitativo em tempo real.

#### **4.2.3 Quantificação da expressão de genes de respostas imunes e da *Leishmania infantum chagasi***

Foi realizada a quantificação relativa da expressão gênica das citocinas (IL-4, IL-10, IL-12p40, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MIF, TGF- $\beta$ ) e dos fatores de transcrição (T-bet e GATA-3), a partir do cDNA obtido pela técnica de transcriptase reversa, por meio da técnica de q-PCR. Para tanto, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores específicos descritos na literatura ou desenhados a partir de sequências gênicas depositadas no Genbank (**Tabela 1**).

Após a extração de material genético, a técnica de qPCR foi realizada utilizando-se o sistema SYBR Green I, sendo a reação conduzida em um aparelho termociclador Chromo4 - PTC – 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, USA). Foram utilizados 50 ng de cDNA proveniente da reação de transcrição reversa, ao qual acrescentaram-se 10 µL do tampão KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal (Kapabiosystems, USA), 10 pmol do oligonucleotídeo iniciador direto e 10 pmol do oligonucleotídeo iniciador reverso para cada gene de interesse, completando-se com água ultra-pura tratada com dietilpirocarbonato (Sigma-Aldrich) para um volume final de 20µl. As reações foram realizadas em microtubos transparentes especiais de 0,2mL (Uniscience) com tampas apropriadas para leitura óptica.

Os parâmetros utilizados para a realização da qPCR foram os seguintes: o perfil térmico da PCR foi constituído por um primeiro ciclo de 95°C por três minutos, seguindo-se de mais 40 ciclos, compostos por desnaturação a 95°C por 3 segundos, anelamento por 30 segundos a 60°C e extensão a 72°C por 3 segundos. Ao final dessa etapa, foi realizada a dissociação dos produtos amplificados de DNA, entre a temperatura de 65°C e 95°C para a avaliação da Temperatura de Dissociação para confirmar a especificidade dos produtos amplificados, e as leituras efetuadas a cada 0,2°C, sendo esta temperatura lida ao curso de um segundo ao decorrer da reação. Todas as amostras foram testadas em duplicata.

Ainda, para a confirmação da amplificação específica dos diferentes pares de oligonucleotídeos utilizados, os produtos obtidos dos ensaios de qPCR foram acrescidos de 2µL de tampão amostra (0,05% (p/v) de azul de bromofenol; 40% de sacarose (p/v); Tris-HCl 10 mM e pH 7,8; EDTA 1M e pH 8,0) em 5µL de produto amplificado, o qual foi analisado por eletroforese, em tensão de 100V por aproximadamente 70 minutos, em gel de agarose 1% contendo tampão TEB 0,5 X Tris 0,045M, ácido bórico 0,045M e EDTA 0,001M, pH 8,0) e GelRed™ (Sigma-Aldrich). Como padrão de peso molecular foi utilizado o marcador “100 bp DNA Ladder” (Life Technologies). A imagem dos fragmentos amplificados, foi obtida no fotodocumentador (Syngene) após a exposição dos géis de agarose a luz UV.

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na técnica de qPCR (*Leishmania*) e qRT-PCR, incluindo o número de acesso no Genbank, comprimento dos fragmentos amplificados e a respectiva referência.

Gene	Oligonucleotídeos iniciadores	Número de acesso no Genbank	Tamanho	Referência
$\beta$ -Actin	F- CCGCGAGAA GAT GACCCAGA R-TGAGGATCTTCATGAGGTAGTCGG	Z70044	237	Liu et al. (2008)
<i>Leishmania</i>	F-TGTCGCTTGCAGACCAGATG R- GCATCGCAGGTGTGAGCA	AF009147	90	Bretagne et al. (2001)
IL-4	F- GCTCAAAGAACACAAGCGA R- CATGCTGCTGAGGTTCTGT	AF187322	123	Peters et al. (2005)
IL-10	F- CGACCCAGACATCAAGAACC R- CACAGGGAAGAAATCGGTGA	U33843	101	Peters et al. (2005)
IL-12p40	F- CAGCAGAGAGGGTCAGAGTGG R- ACGACCTCGATGGGTAGGC	U49100	109	Peters et al. (2005)
INF- $\gamma$	F- TCAACCCCTTCTCGCCACT R- GCTGCCTACTTGGTCCCTGA	AF126247	113	Peters et al. (2005)
TNF- $\alpha$	F- CTGGAGTCGTGAGGCAGTG R- AGGGCTCTTGATGGCAGAGA	Z70046	84	Peters et al. (2005)
TGF- $\beta$	F-AGTTAAAAGCGGAGCAGCATGTGG R- GATCCTTGCGGAAGTCAATGTAGAGC	NM_001003309.1	438	Alves et al. (2009)
GATA3	F- CCCGTCTGTAATGCCTGTG R- TTTTTCGGTTTCTGGTCTGG	NC_006584.2	94	Vanherberghe et al. (2013)
T-bet	F- GAAGCTCACCAACAACAAGG R- CGAGGCTGGTACTTATGGAGA	NC_006591.2	80	Vanherberghe et al. (2013)
MIF	F- CTCCTTCCGAGCTCACTCA R- CGATCTTGCCGATGCTGT	AM049393.1	179	Desenhado

F =direto; R = reverso

A quantificação relativa da expressão de genes das citocinas e fatores de transcrição foi realizada pelo método comparativo de “threshold cycle” ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ) conforme o método descrito por LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de cada gene foi normalizada em relação ao gene de referência da  $\beta$ -actina, utilizando-se como nível basal de expressão gênica as amostras provenientes de cães do grupo controle negativo, os quais não estavam infectados com *Leishmania* sp.

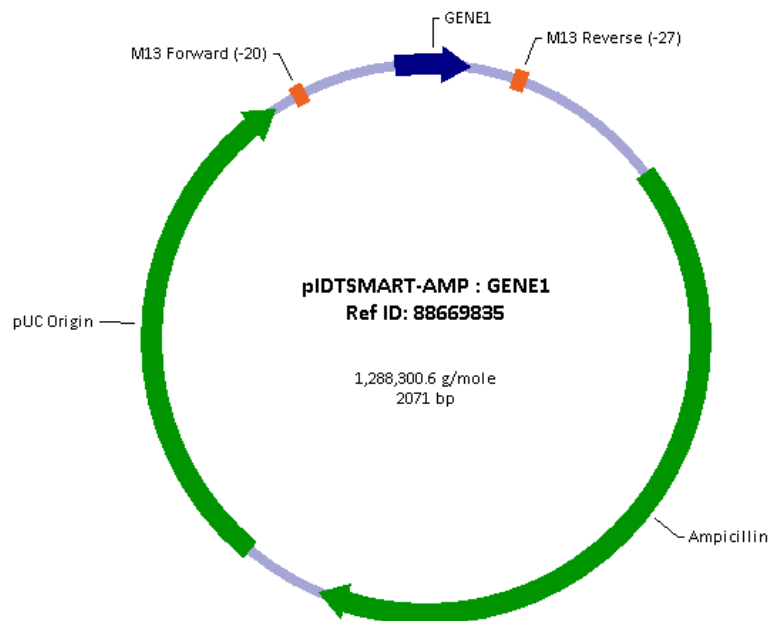
Em resumo, a avaliação da expressão relativa de cada gene (RNAm) de interesse, é representada pela fórmula:

$$\Delta\Delta C_T = (C_{T, \text{gene de interesse}} - C_{T, \beta\text{-actina}})_{\text{grupo infectado}} - (C_{T, \text{gene de interesse}} - C_{T, \beta\text{-actina}})_{\text{grupo controle}}$$

A análise da expressão relativa dos genes de interesse deste estudo foi representada graficamente de acordo com o número de vezes de aumento da expressão gênica em relação ao grupo controle (“fold change”).

#### **4.2.4 Construção da curva padrão para quantificação absoluta de fragmento do gene de *Leishmania (L.) infantum chagasi* por qPCR**

Anteriormente à quantificação absoluta de *Leishmania infantum chagasi* uma curva padrão para o desenvolvimento e otimização para quantificação da *Leishmania chagasi* foi constituída. Para isso, um fragmento de 90 pb do gene alpha da DNA polimerase (GenBank, número de acesso: AF009147), foi inserido no vetor pIDTSMART-AMP: GENE1 (Figura 1) (IDT, USA). O valor obtido da quantificação do DNA plasmidial foi convertido em número de mols utilizando o software Molbio.ru ([www.molgen.mpg.de/~soldatov/protocols/scripts/01\\_07.html](http://www.molgen.mpg.de/~soldatov/protocols/scripts/01_07.html)). O DNA plasmidial foi submetido a diluições seriadas de razão constante igual a 10 ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ), e em seguida à técnica qPCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores, previamente descritos por Bretagne et al. (2001), para amplificação da sequência integral do fragmento genético inserido no plasmídeo.



**Figura 1** - Representação esquemática do vetor pIDTSMART-AMP : GENE1 (IDT, USA), no qual foi inserido um fragmento 90 pb do gene alfa da DNA polymerase de *Leishmania infantum chagasi*.

Os valores de C<sub>q</sub> obtidos a partir da qPCR foram subsequentemente usados para calcular e traçar uma linha de regressão linear através do logaritmo do número de mols da sequência alvo DNA molde (eixo Y) contra o valor correspondente de C<sub>q</sub> (eixo X).

#### 4.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do software Graphpad Prisma 5 (versão 4.0, 2003). Para a determinação das diferenças entre as medianas do número de cópias do gene alfa da DNA polimerase de *L. infantum chagasi* entre os órgãos, bem como da expressão gênica de mRNA das citocinas e fatores de transcrição foram utilizados os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e de Comparação Múltipla de

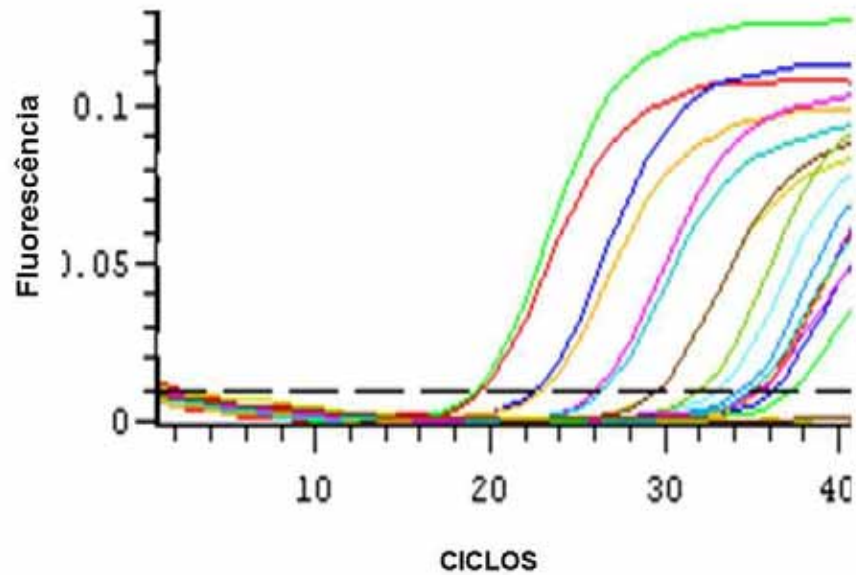
Dunn para comparação dos grupos dentro de cada órgão. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . Os resultados foram representados por gráficos do tipo “box plot”, que possuem uma linha horizontal no interior do “box” que representa a mediana, a extremidade superior e inferior do “box” são os quartis e a linha vertical que estende-se do “box” aos valores mais altos ou mais baixos da quantificação do mRNA, representam as variações extremas destes valores.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 QUANTIFICAÇÃO DE *Leishmania infantum chagasi* por qPCR**

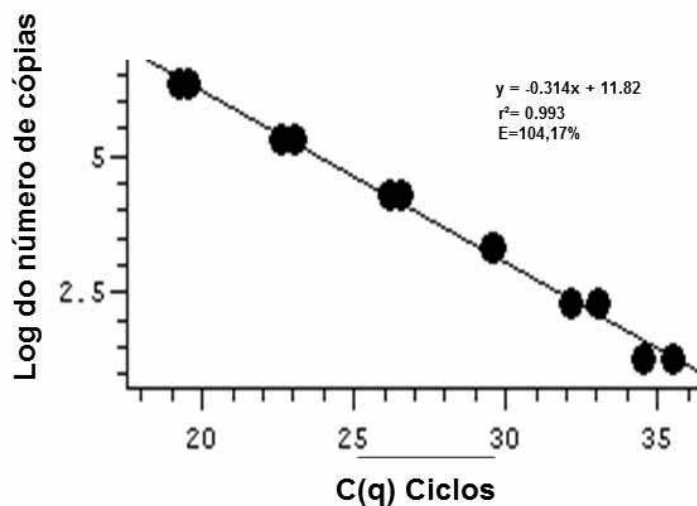
#### **5.1.1. Construção da curva padrão para quantificação absoluta**

A equação linear foi gerada a partir da curva padrão  $y = -0.3141x + 11,82$  com coeficiente de correlação  $r^2 = 0.993$  (Figuras 2 A e B). O teste manteve linearidade por, no mínimo, sete ordens de magnitude; usando-se o coeficiente angular da equação linear, a eficiência do teste foi estimada em 104,17%. O desvio padrão dos valores de Cq obtidos para cada reação contendo de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  cópias de DNA calculadas a partir de nove corridas independentes, variou de 0 a 1,02 ciclos.



**Figura 2A** - Resultados dos Cqs das duplicatas obtidos a partir das diluições seriadas de razão constante igual a 10 ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ).

O desvio padrão dos valores de Cq obtidos para cada reação contendo de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  cópias de DNA calculadas a partir de nove corridas independentes, variou de 0 a 1,02 ciclos.

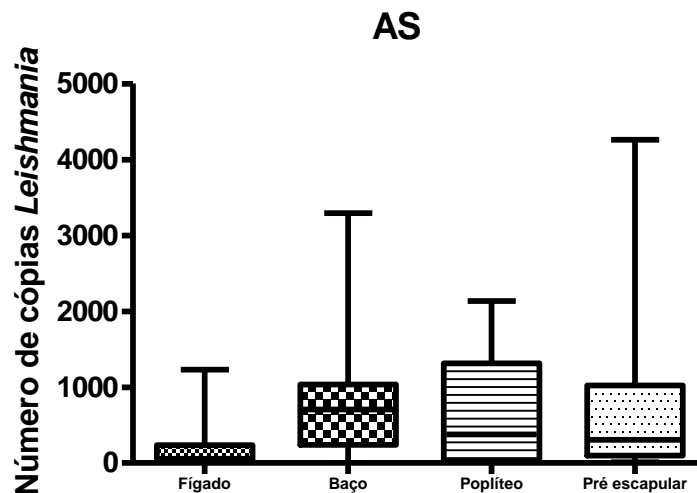


**Figura 2B** - Curva padrão gerada com uso dos valores de C(q) vs.  $\text{Log}_{10}$  das diluições seriadas de razão 10 ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) do DNA plasmidial correspondente a um fragmento de 90 pb da região do gene alpha da DNA polymerase da *Leishmania infantum chagasi*. A eficiência da reação foi de 104,17%, estimada com base no coeficiente angular da reta como indicado pela fórmula.

### 5.1.2 Quantificação absoluta de *Leishmania infantum chagasi*

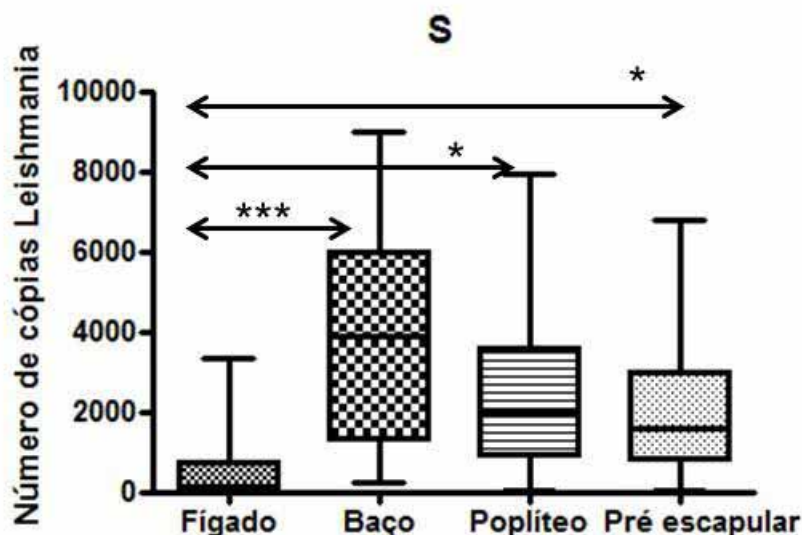
Nos dados referentes à quantificação absoluta de *L. infantum chagasi* por qPCR no grupo assintomático (AS) observou-se que os tecidos com o maior número de cópias do gene de *Leishmania infantum chagasi* foram o baço, seguido do linfonodo poplíteo e linfonodo pré-escapular (Figura 3, Tabela 2). O fígado apresentou o menor número de cópias do gene de *L. infantum chagasi*. Os “whiskers” mostram a grande variação no número de formas amastigotas nos diferentes tecidos analisados. Os valores contidos

dentro da caixa representam a mediana e os valores extremos (quartis) superiores e inferiores mostram as discrepâncias entre cada órgão, dentro do grupo assintomático. No entanto não foram observadas diferenças estatísticas entre os diferentes órgãos analisados quanto ao número de cópias nos animais do grupo assintomático.



**Figura 3** – Quantificação do DNA de *Leishmania infantum chagasi* no fígado, baço, linfonodo poplíteo e linfonodo pré-escapular. AS = cães assintomáticos. Teste de comparação múltipla de Dunn ( $P=0,1606$ ).

Na quantificação do número de cópias de *L. infantum chagasi* em amostras de cães do grupo sintomático (S) verificou-se que os tecidos com o maior número de cópias do gene foram o baço, seguido dos linfonodos poplíteo e pré-escapular (Figura 4, Tabela 2). O fígado apresentou a menor quantidade de número de cópias. Na análise estatística foram observadas diferenças significativas encontradas no fígado e baço ( $P<0,0001$ ), bem como naquelas encontradas no fígado e ambos os linfonodos ( $P<0,05$ ).



**Figura 4** – Quantificação do DNA de *Leishmania infantum chagasi* no fígado, baço, linfonodo poplíteo e linfonodo pré-escapular de cães sintomáticos. S = cães sintomáticos. Teste de comparação múltipla de Dunn. \* ( $P < 0,05$ ); \*\*\* ( $P < 0,0001$ ).

Todos os animais do grupo controle mostraram-se negativos na qPCR para *Leishmania infantum chagasi*, nos tecidos hepático, esplênico e nos linfonodos periféricos.

### 5.1.3 Quantificação relativa de mRNA dos genes IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , T-bet, GATA-3 e MIF no linfonodo poplíteo

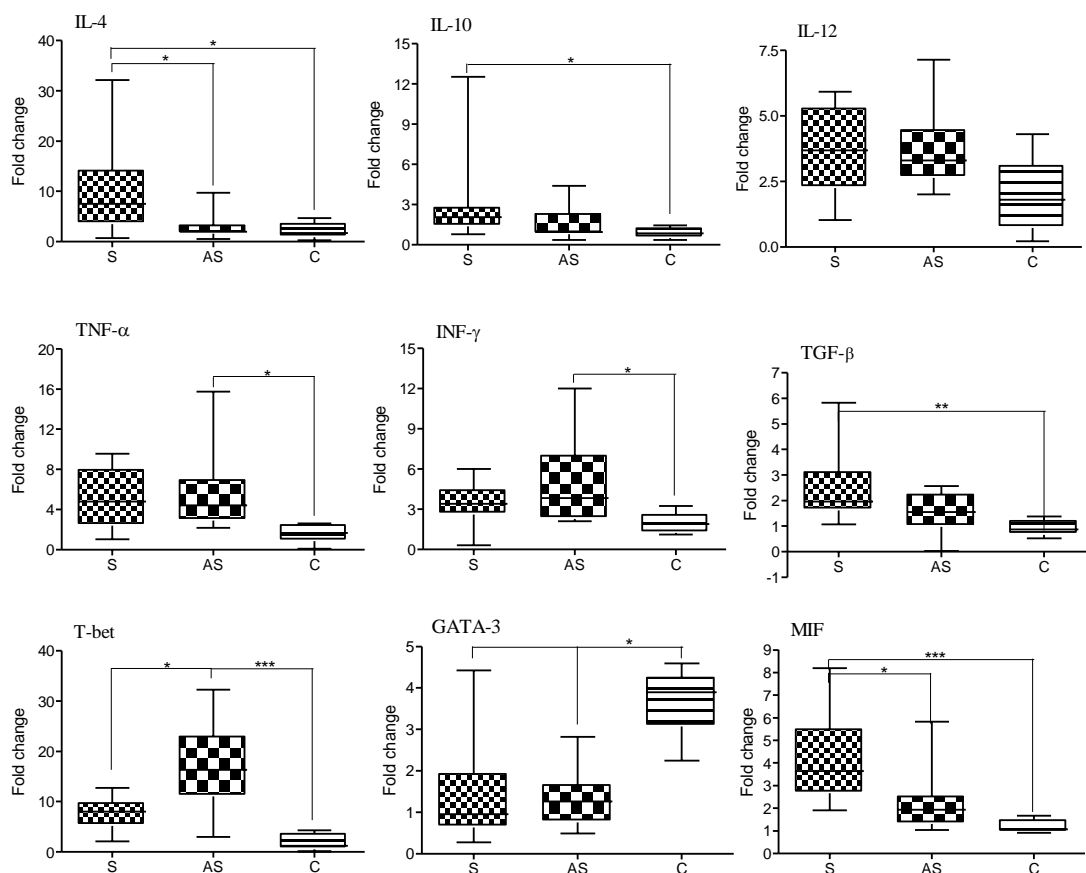
Na quantificação de mRNA de citocinas no linfonodo poplíteo de cães infectados e controle (Figura 5, Tabela 2) observou-se diferença significativa nos níveis de expressão de IL-4 ( $P = 0,0053$ ) entre o grupo sintomático (S) em relação ao assintomático (AS) e controle (C).

Considerando a expressão gênica de IL-10, observou-se diferenças significativas apenas entre os grupos S e C ( $P= 0,0123$ ). Os grupos infectados não diferiram entre si e os cães AS não diferiram do grupo C.

Não foram observadas diferenças significativas ( $P= 0,0599$ ) entre os grupos estudados para a expressão da citocina IL-12. As citocinas TNF- $\alpha$  ( $P= 0,0269$ ) e INF- $\gamma$  ( $P= 0,0328$ ) diferiram significativamente apenas nos cães AS em relação ao grupo C, não havendo diferenças significativas entre o grupo de cães sintomáticos com os grupos assintomáticos e controle.

A expressão de TGF- $\beta$  mostrou diferenças significativas entre os grupos S e C ( $P= 0,0035$ ), sendo que os demais grupos não diferiram entre si. A expressão do gene responsável pelo fator de transcrição T-bet apresentou diferença significativa ( $P=0,0001$ ) do grupo AS com os grupos S e C. Ainda observou-se que para GATA 3, os grupos de cães infectados (AS e S) diferiram significativamente ( $P= 0,0162$ ) do grupo C.

Para MIF observou-se que o grupo S diferiu significativamente ( $P= 0,0001$ ) do grupo C e do AS, sendo que o grupo S apresentou os maiores valores de MIF. Os grupos C e AS não diferiram entre si.



**Figura 5** – Quantificação de mRNA das citocinas (IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , MIF) e dos fatores de transcrição (Tbet e GATA-3) em linfonodo poplíteo de cães sintomáticos (S), assintomáticos (AS) e controle (C). Os “whiskers” representam os maiores e os menores valores observados para expressão de cada citocina ou fator de transcrição dentro de cada grupo. Teste de comparação múltipla de Dunn. \* (P<0,05); \*\* (P<0,01); \*\*\* (P<0,0001). Fold change = número de vezes de aumento da expressão gênica em relação ao grupo controle.

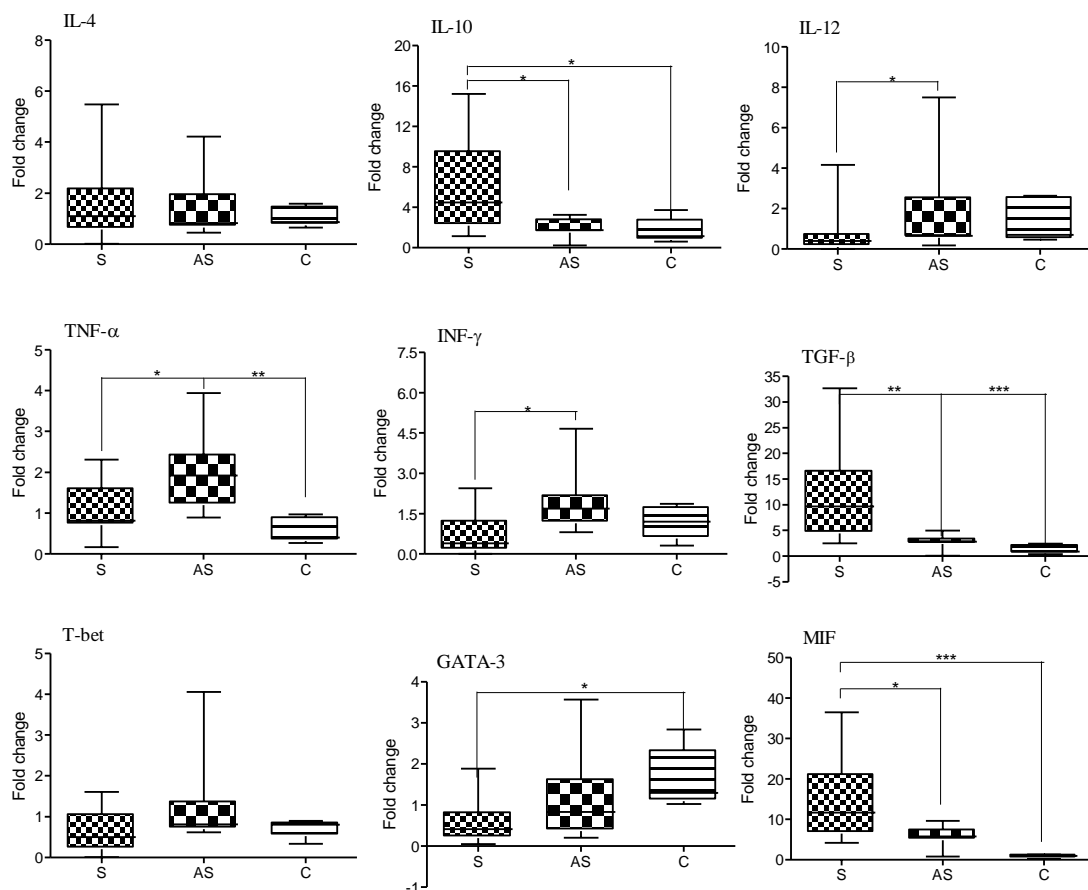
#### 5.1.4 Quantificação relativa de mRNA dos genes IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , T-bet, GATA-3 e MIF em linfonodo pré-escapular

Os valores referentes à quantificação das citocinas no linfonodo pré-escapular (Figura 6, Tabela 2) mostraram que para IL-4 (P= 0,9848) e Tbet (P= 0,1115) os grupos estudados não diferiram entre si.

Para IL-10 observou-se que o grupo S diferiu significativamente ( $P=0,0104$ ) dos grupos AS e C. A expressão de IL-12 apresentou diferenças significativas ( $P=0,0312$ ) entre os grupos S e AS. Para TNF- $\alpha$  observou-se diferenças significativas ( $P= 0,0014$ ) entre o grupo AS e os grupos S e C.

O grupo S diferiu significativamente ( $P=0,0096$ ) do grupo AS para a expressão da citocina INF- $\gamma$ . Para TGF- $\beta$  observou-se que o grupo S diferiu dos grupos AS e C ( $P=0.0001$ ).

Observou-se que para GATA-3, o grupo C diferiu do grupo S ( $P= 0,0117$ ). Com relação ao MIF, observou-se que o grupo S diferiu dos grupos C e AS ( $P= 0,0001$ ).



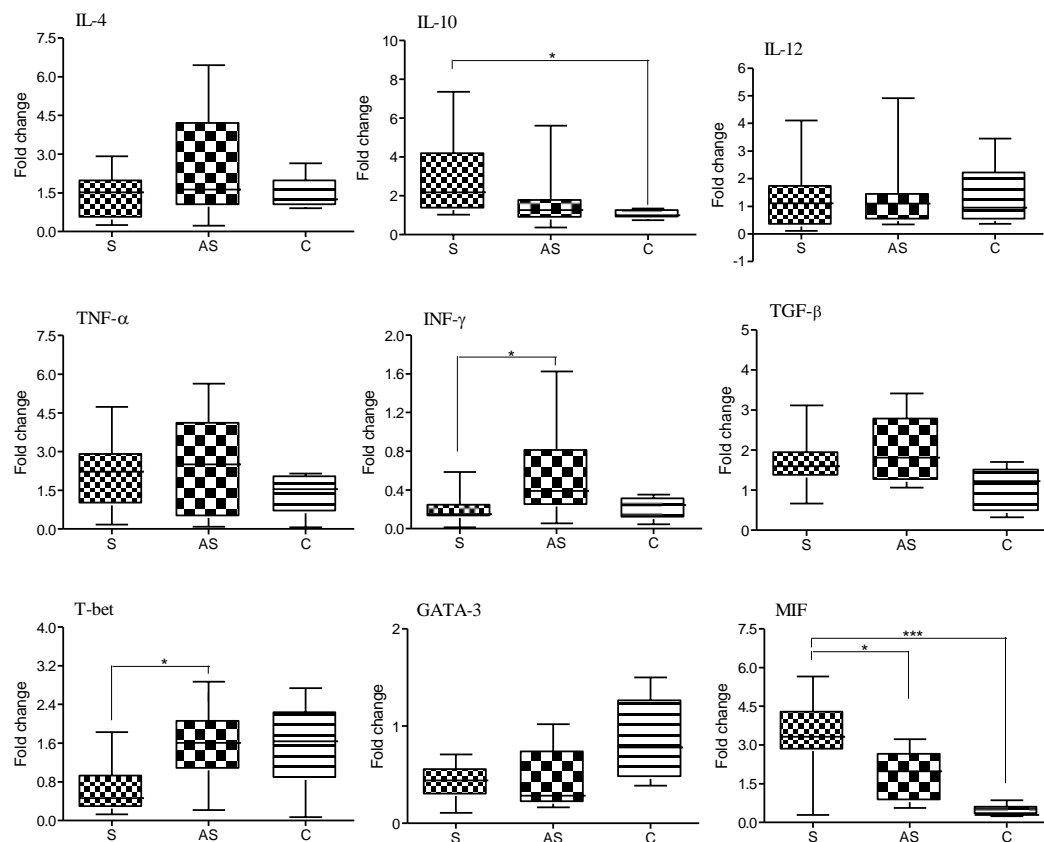
**Figura 6** - Quantificação de mRNA das citocinas (IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , MIF) e dos fatores de transcrição (Tbet e GATA-3) em linfonodo pré-escapular de cães sintomáticos (S), assintomáticos (AS) e controle (C). Os "whiskers" representam os

maiores e os menores valores observados para a expressão de cada citocina ou fator de transcrição dentro de cada grupo. Teste de comparação múltipla de Dunn. \* ( $P < 0,05$ ); \*\* ( $P < 0,01$ ); \*\*\* ( $P < 0,0001$ ). Fold change = número de vezes de aumento da expressão gênica em relação ao grupo controle.

### **5.1.5 Quantificação relativa de mRNA dos genes IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , T-bet, GATA-3 e MIF no fígado**

Na Figura 7/Tabela 2 se encontram os resultados da quantificação das citocinas no compartimento hepático e pode-se constatar que não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para IL-4 ( $P = 0,5463$ ), IL-12 ( $P = 0,9632$ ), TNF- $\alpha$  ( $P = 0,4911$ ), TGF- $\beta$  ( $P = 0,0920$ ) e GATA-3 ( $P = 0,1882$ ).

A expressão de IL-10 diferiu significativamente somente entre os grupos S e C ( $P = 0,0148$ ). Por outro lado, a expressão de INF- $\gamma$  ( $P = 0,0125$ ) e T-bet ( $P = 0,0036$ ) diferiram estatisticamente entre os grupos S e AS. Em relação a MIF observou-se que o grupo S diferiu significativamente dos grupos AS e C ( $P = 0,0001$ ).



**Figura 7** - Quantificação de mRNA das citocinas (IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , MIF) e dos fatores de transcrição (Tbet e GATA-3) em fígado de cães sintomáticos (S), assintomáticos (AS) e controle (C). Os “whiskers” representam os maiores e os menores valores observados para a expressão de cada citocina ou fator de transcrição dentro de cada grupo. Teste de comparação múltipla de Dunn. \* ( $P < 0,05$ ); \*\*\* ( $P < 0,0001$ ). Fold change = número de vezes de aumento da expressão gênica em relação ao grupo controle.

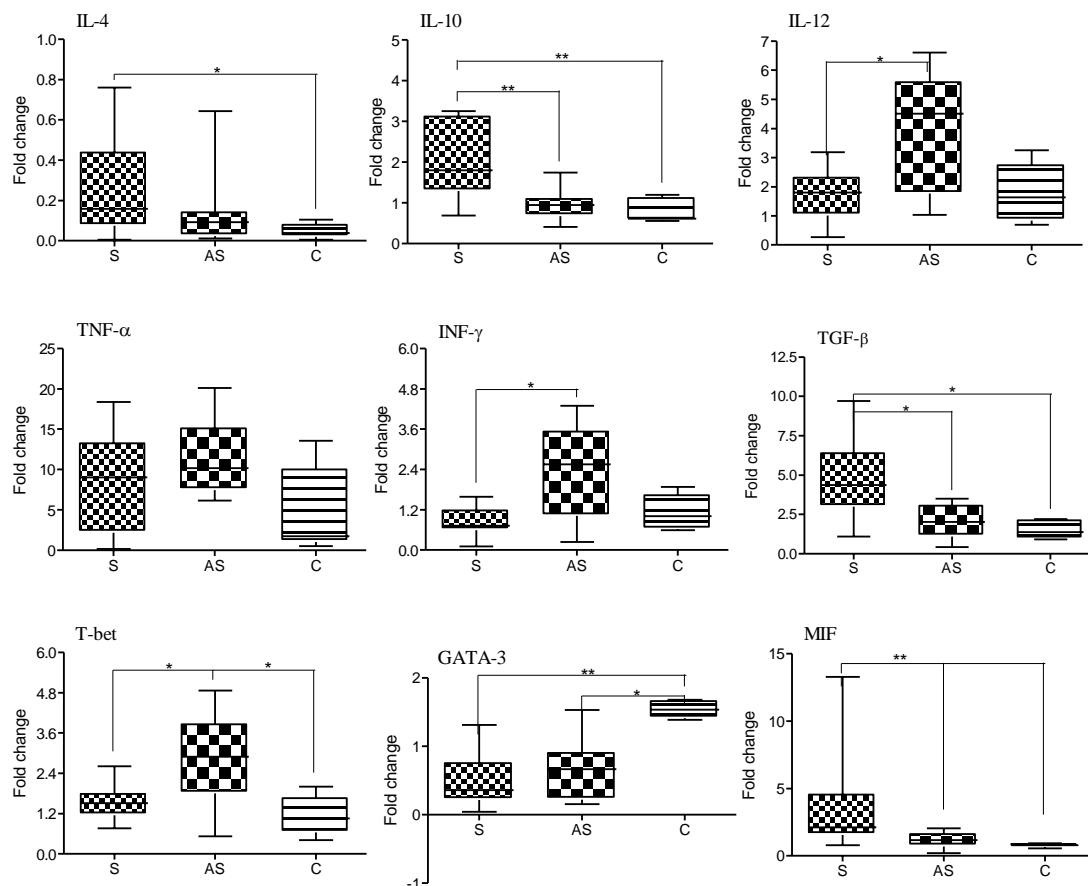
### 5.1.6 Quantificação relativa de mRNA dos genes IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , T-bet, GATA-3 e MIF no baço

No que se refere à quantificação de citocinas no baço (Figura 8, Tabela 2) pôde-se observar que a expressão de IL-4 diferiu significativamente entre os grupos S e C ( $P = 0,0331$ ). IL-10 apresentou diferenças significativas somente entre o grupo S dos grupos AS e C ( $P = 0,0007$ ).

Para a expressão da citocina IL-12 constatou-se que o grupo S diferiu significativamente do grupo AS ( $P= 0,0241$ ). Na quantificação da expressão da citocina TNF- $\alpha$  não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ( $P= 0,1136$ ).

Para INF- $\gamma$  observou-se que o grupo S diferiu significativamente do grupo AS ( $P= 0,0043$ ). TGF- $\beta$  mostrou diferenças significativas entre os grupos, onde o grupo S teve a expressão aumentada do gene desta citocina quando comparado aos grupos AS e C ( $P=0,0016$ ).

Para a expressão de Tbet verificou-se que o grupo AS diferiu significativamente dos grupos C e S ( $P= 0,0049$ ) e para GATA3 constatou-se que o grupo C diferiu significativamente dos grupos AS e S ( $P= 0,0020$ ). A citocina MIF diferiu significativamente entre o grupo S e os grupos AS e C ( $P= 0,0004$ ).



**Figura 8** - Quantificação de mRNA das citocinas (IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , MIF) e dos fatores de transcrição (Tbet e GATA-3) em baço de cães sintomáticos (S), assintomáticos (AS) e controle (C). Os “whiskers” representam os maiores e os menores valores observados para a expressão de cada citocina ou fator de transcrição dentro de cada grupo. Teste de comparação múltipla de Dunn. \* (P<0,05); \*\* (P<0,01). Fold change = número de vezes de aumento da expressão gênica em relação ao grupo controle.

Na Tabela 2 estão descritas as medianas da expressão gênica das citocinas, fatores de transcrição e da carga parasitária, em cada órgão e grupo de cães infectados e controle.

Tabela 2 – Valores de Medianas da expressão gênica das citocinas, fatores de transcrição e da carga parasitária nos grupos de cães com Leishmaniose Visceral e controle, dentro de cada órgão.

<b>Linfonodo Poplíteo</b>										
<b>Grupo</b>	<b>IL-4</b>	<b>IL-10</b>	<b>IL-12</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<b>Tbet</b>	<b>GATA-3</b>	<b>MIF</b>	<b>CP</b>
S	7,53 <sup>a</sup>	2,07 <sup>a</sup>	3,68 <sup>ns</sup>	4,78 <sup>ab</sup>	3,40 <sup>ab</sup>	1,95 <sup>a</sup>	8,04 <sup>b</sup>	0,95 <sup>b</sup>	3,64 <sup>a</sup>	2008,0
AS	1,97 <sup>b</sup>	0,94 <sup>ab</sup>	3,30 <sup>ns</sup>	4,43 <sup>a</sup>	3,83 <sup>a</sup>	1,55 <sup>ab</sup>	16,35 <sup>a</sup>	1,26 <sup>b</sup>	1,94 <sup>b</sup>	377,3
C	1,72 <sup>b</sup>	0,87 <sup>b</sup>	1,80 <sup>ns</sup>	1,67 <sup>b</sup>	1,89 <sup>b</sup>	0,87 <sup>b</sup>	1,23 <sup>b</sup>	3,90 <sup>a</sup>	1,07 <sup>b</sup>	0,0
<b>Linfonodo Pré-escapular</b>										
<b>Grupo</b>	<b>IL-4</b>	<b>IL-10</b>	<b>IL-12</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<b>Tbet</b>	<b>GATA-3</b>	<b>MIF</b>	<b>CP</b>
S	1,10 <sup>ns</sup>	4,47 <sup>a</sup>	0,41 <sup>b</sup>	0,81 <sup>b</sup>	0,40 <sup>b</sup>	9,72 <sup>a</sup>	0,49 <sup>ns</sup>	0,41 <sup>b</sup>	11,68 <sup>a</sup>	1584,0
AS	0,83 <sup>ns</sup>	1,76 <sup>b</sup>	0,66 <sup>a</sup>	1,92 <sup>a</sup>	1,68 <sup>a</sup>	2,83 <sup>b</sup>	0,81 <sup>ns</sup>	0,83 <sup>ab</sup>	5,78 <sup>b</sup>	308,1
C	0,86 <sup>ns</sup>	1,44 <sup>b</sup>	0,69 <sup>ab</sup>	0,40 <sup>b</sup>	1,21 <sup>ab</sup>	0,89 <sup>b</sup>	0,80 <sup>ns</sup>	1,29 <sup>a</sup>	0,99 <sup>b</sup>	0,0
<b>Fígado</b>										
<b>Grupo</b>	<b>IL-4</b>	<b>IL-10</b>	<b>IL-12</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<b>Tbet</b>	<b>GATA-3</b>	<b>MIF</b>	<b>CP</b>
S	1,52 <sup>ns</sup>	2,19 <sup>a</sup>	1,10 <sup>ns</sup>	2,22 <sup>ns</sup>	0,15 <sup>b</sup>	1,60 <sup>ns</sup>	0,47 <sup>b</sup>	0,44 <sup>ns</sup>	3,32 <sup>a</sup>	145,0
AS	1,63 <sup>ns</sup>	1,27 <sup>ab</sup>	1,09 <sup>ns</sup>	2,51 <sup>ns</sup>	0,39 <sup>a</sup>	1,82 <sup>ns</sup>	1,60 <sup>a</sup>	0,28 <sup>ns</sup>	1,99 <sup>b</sup>	54,3
C	1,25 <sup>ns</sup>	1,00 <sup>b</sup>	0,94 <sup>ns</sup>	1,55 <sup>ns</sup>	0,24 <sup>ab</sup>	1,22 <sup>ns</sup>	1,64 <sup>ab</sup>	0,78 <sup>ns</sup>	0,29 <sup>b</sup>	0,0
<b>Baço</b>										
<b>Grupo</b>	<b>IL-4</b>	<b>IL-10</b>	<b>IL-12</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<b>Tbet</b>	<b>GATA-3</b>	<b>MIF</b>	<b>CP</b>
S	0,16 <sup>a</sup>	1,80 <sup>a</sup>	1,80 <sup>b</sup>	9,03 <sup>ns</sup>	0,72 <sup>b</sup>	4,37 <sup>a</sup>	1,51 <sup>b</sup>	0,36 <sup>b</sup>	2,12 <sup>a</sup>	3864,0
AS	0,09 <sup>ab</sup>	0,95 <sup>b</sup>	4,51 <sup>a</sup>	10,2 <sup>ns</sup>	2,55 <sup>a</sup>	2,02 <sup>b</sup>	2,89 <sup>a</sup>	0,67 <sup>b</sup>	1,17 <sup>b</sup>	706,1
C	0,04 <sup>b</sup>	0,62 <sup>b</sup>	1,64 <sup>ab</sup>	1,75 <sup>ns</sup>	1,00 <sup>ab</sup>	1,38 <sup>b</sup>	1,06 <sup>b</sup>	1,53 <sup>a</sup>	0,80 <sup>b</sup>	0,0

S = sintomático; AS = assintomático; C = Controle; CP = carga parasitária; Letras minúsculas diferentes na coluna mostram diferenças significativas pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunn ( $P < 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo analisou-se a resposta imune frente ao parasito *Leishmania infantum chagasi*, em animais com e sem sinais clínicos de LV e, em diferentes órgãos destes cães, comparando os resultados ao grupo controle. Portanto foi possível observar que existem diferenças nos níveis de expressão de mRNA que codifica as citocinas e os fatores de transcrição, bem como na quantidade de DNA do parasito em cada órgão analisado. Da mesma forma, verificou-se que havia muita variação em cada grupo para a proporção de mRNA das citocinas e fatores de transcrição, representados nos gráficos pelos “whiskers”. Na literatura não existem trabalhos que comparem este tipo de resposta entre vários órgãos, apenas um perfil de citocinas e/ou fatores de transcrição em um único órgão. Neste estudo foi possível verificar que a resposta imune variável de cada órgão frente ao parasito poderia estar relacionada a sua susceptibilidade ou resistência.

A quantificação absoluta do DNA de *L. infantum chagasi* foi maior no grupo sintomático, com maiores níveis de cópias do gene alvo do parasita no baço, seguido do linfonodo poplíteo, linfonodo pré-escapular e em menor proporção o fígado. Os resultados obtidos para o baço concordam com os resultados descritos por Penha (2011), que demonstrou que o baço foi o sítio mais susceptível quando comparado ao fígado, em cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp. pela qPCR. Estes resultados também coincidem com estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, em que observou-se maior detecção do parasito pela imuno-histoquímica nos granulomas esplênicos e do linfonodo poplíteo (MOREIRA, 2013, MOREIRA et al. 2010). A susceptibilidade destes órgãos provavelmente está relacionada com o padrão celular diferenciado encontrado nos granulomas, os quais eram desorganizados e pobres em linfócitos no baço e no linfonodo, diferindo dos granulomas hepáticos que eram bem definidos e com maior proporção de linfócitos (MOREIRA et al., 2010, MOREIRA, 2013). Estudos futuros que demonstrem as subpopulações de linfócitos (Treg, CD4<sup>+</sup>,

CD8<sup>+</sup>), macrófagos (M1 e M2) e células dendríticas presentes nestes granulomas poderiam esclarecer estas diferenças, pois sabe-se que existem subpopulações de leucócitos com função regulatória e que poderiam estar interferindo na eficiência da imunidade celular nos cães com LV.

Wilson; Jeronimo e Pearson (2005) relataram que em camundongos e em pessoas imunodeficientes, os granulomas hepáticos são pobremente formados na fase de visceralização da LV e que estes necessitam de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  para o controle do agente agressor. No presente estudo, não foi possível determinar a fase da infecção nos cães, já que estes eram naturalmente infectados. Os animais assintomáticos também apresentaram visceralização da LV e possivelmente não representam um grupo resistente ao parasito como foi destacado na literatura no passado, mas provavelmente estariam em uma fase inicial da infecção, que depois evoluiria para a apresentação dos sinais clínicos e perda do controle da proliferação do parasito nos órgãos-alvo.

No presente estudo os níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  mostraram-se baixos no fígado, o órgão com níveis mais baixos de DNA do parasito nos grupos infectados (AS e S), em relação ao baço e linfonodo poplíteo. Estes achados poderiam ser relacionados aos relatos de Moreira (2013), que verificou que as células de Kupffer e as células natural "killer" hepáticas parecem contribuir com a resistência do compartimento hepático à multiplicação do parasito. Em modelos murinos relatou-se que camundongos infectados com diferentes espécies de *Leishmania* tiveram uma rápida multiplicação do parasito no fígado, nas primeiras semanas da infecção e após o mesmo foi eliminado. No baço o aumento da carga parasitária foi mais lento (WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005). Possivelmente, a maior resistência hepática à multiplicação do parasito *Leishmania* sp. poderia também estar associada à ativação das células estreladas hepáticas, residentes no espaço de Disse e responsáveis pelo armazenamento de vitamina A quando não ativadas. As mesmas podem expressar um fenótipo inflamatório de acordo com o estímulo e produzir citocinas, quimiocinas, óxido nítrico, expressar moléculas de adesão e apresentar antígenos que estimulam linfócitos, entre outras (FRIEDMAN, 2008).

Strauss-Ayali, Baneth e Jaffe (2007) detectaram o parasito no baço de cães experimentalmente infectados com *L. infantum* aos 30 dias p.i. e esta taxa manteve-se constante em 3-5 meses p.i. Estes relatos podem explicar a prevalência de formas amastigotas no baço canino, assim como observado no presente estudo pela q PCR, sugerindo que o parasito consegue modular o microambiente esplênico e criar condições favoráveis à sua sobrevivência.

Neste estudo observaram-se diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) na expressão de mRNA das citocinas IL-4 (linfonodo poplíteo e baço), IL-10 (linfonodo pré-escapular, fígado, baço e poplíteo), TGF- $\beta$  (linfonodo pré-escapular, poplíteo e baço) e MIF (todos os órgãos) no grupo de cães sintomáticos (Tabela 1), diferindo dos achados de Alves et al. (2009) quanto ao perfil de citocinas nos linfonodos. Estes autores verificaram que os linfonodos pré-escapulares de cães assintomáticos para *L. chagasi* apresentaram altos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  associados a baixa carga parasitária. No grupo sintomático, o perfil parasitário foi elevado e os níveis de IL-10 e TGF- $\beta$  estavam aumentados. Em modelos murinos, há diferença da resposta imune entre espécies de *Leishmania* sistêmicas (*L. donovani*; *L. infantum chagasi*) com a cutânea (*L. major*). Os autores verificaram um desequilíbrio entre as respostas Th1 / Th2 nas infecções por *L. major*. No entanto, nas espécies visceralizantes esta dicotomia não foi observada, pois parece existir uma exacerbação das duas respostas (WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005). Os resultados do presente estudo concordam com os relatos dos modelos murinos com espécies visceralizantes do parasito, pois os níveis mais elevados de mRNA das citocinas do grupo de cães sintomáticos ocorreram para IL-4, IL-10, IL-12, TGF- $\beta$  e MIF em todos os órgãos.

Neste estudo, a expressão de algumas citocinas mostrou-se elevada (IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ ) no linfonodo poplíteo e no fígado, nos grupos de cães infectados (S, AS) que diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) do grupo controle. Estes dados reforçam os achados de Moreira (2013) que avaliou por imuno-histoquímica, o baço e o fígado de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* e observou que TNF- $\alpha$  teve maior imunomarcagem em cães assintomáticos e TGF- $\beta$  nos cães sintomáticos, em ambos os órgãos. Na literatura destaca-se que em modelos murinos de LV, TGF- $\beta$

parece ter um efeito inibitório sobre IFN- $\gamma$  (WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005) o que corrobora com os resultados do presente estudo, pois os valores de TGF- $\beta$  foram mais elevados que IFN- $\gamma$  no baço, fígado e linfonodo pré-escapular. O grupo sintomático apresentou as maiores concentrações desta citocina, exceto no fígado, sugerindo assim que o parasito tem efeitos diretos sobre o ambiente local da infecção, por ativar o TGF- $\beta$  latente na matriz extracelular (MEC). Da mesma forma pode suprimir a ativação dos macrófagos frente ao IFN- $\gamma$ . Estudos em cães com LV também verificaram um padrão misto Th1/Th2 (STRAUSS-AYALI; BANETH; JAFFE, 2007; MENEZES-SOUZA et al., 2011). No presente estudo foi possível verificar que mesmo nos cães sintomáticos existe um estímulo para a produção de citocinas Th1 e Th2.

No presente estudo, os níveis de mRNA da citocina IL-12 foram baixos e quando houve diferença significativa entre grupos, os maiores valores foram observados no grupo assintomático. Estudos em modelos experimentais murinos demonstraram que na ausência de IL-12 pode ocorrer um aumento compensatório de TGF- $\beta$  (WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005). A IL-12 é produzida por células apresentadoras de antígenos (macrófagos e células dendríticas) e IFN- $\gamma$  por linfócitos T. A ação destas duas citocinas está relacionada com o controle da infecção pelo parasito. A citocina IL-10 pode inibir a produção de IL-12, como descrito na LV humana (NYLÉN e SACKS, 2007). Nos animais do presente estudo verificou-se níveis mais elevados de IL-10 no grupo de cães sintomáticos, concordando com os relatos de LV em humanos.

O baço foi o órgão com maior tropismo do parasito e com diferença significativa na expressão dos genes das citocinas IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  e de MIF nos animais sintomáticos, sugerindo uma resposta pró-parasito. Este resultado pode ser associado com os resultados descritos na literatura nos quais, na infecção por *L. donovani* ocorre uma falha na migração das células dendríticas no baço, da zona marginal para a região linfóide periarteriolar, que é rica em linfócitos T. Essa alteração resultou em falha na apresentação antigênica, por influência das citocinas IL-10 e TNF- $\alpha$ , que inibiram a produção de quimiocinas responsáveis pela migração das células dendríticas (WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005). Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, a

desorganização estrutural do baço foi observada (MOREIRA, 2013), porém estudos futuros seriam necessários para confirmar o papel das células dendríticas na LV canina.

A expressão da citocina IL-10 apresentou diferenças significativas em todos os órgãos analisados, sendo expressa em maior quantidade nos animais do grupo sintomático. Estudos com LV humana destacam que esta citocina foi expressa na fase aguda da infecção simultaneamente à expressão de INF- $\gamma$  (WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005). No presente estudo, os níveis de expressão de IL-10 e IFN- $\gamma$  foram mais elevados no linfonodo poplíteo, dos cães infectados (S, AS). Em estudos anteriores foi verificada severa inflamação granulomatosa e elevada carga parasitária neste órgão (MOREIRA et al., 2010; BANDARRA, 2010). No presente estudo, não foi possível afirmar em que fase do desenvolvimento da doença os níveis de IFN- $\gamma$  começaram a elevar-se, pois utilizou-se cães naturalmente infectados, no entanto sugere-se que esta citocina não está atuando eficientemente na ativação de macrófagos, quando considera-se os resultados atuais com os de estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa.

Neste estudo, a maior expressão de IL-10 ocorreu no grupo sintomático (em todos os órgãos), que apresentou uma carga parasitária cerca de cinco vezes superior ao grupo assintomático. Esta correlação está de acordo com VERMA et al. (2010) que verificaram existir uma correlação significativa entre a carga parasitária e os níveis de IL-10 em pessoas com LV. Os efeitos deletérios do aumento da expressão de IL-10 podem favorecer a sobrevivência do parasito no hospedeiro. Entre eles foi destacado a inibição da atividade microbicida de macrófagos (sub-regulação da produção de óxido nítrico e TNF- $\alpha$ ), da maturação das células dendríticas, da apresentação antigênica, da sub-regulação de MHC-II e de moléculas co-estimulatórias (ativação de linfócitos T), ativação de linfócitos B (hipergamaglobulinemia) e a indução da apoptose em linfócitos T mediada por Fas e FasL (NYLÉN e SACKS, 2007). Talvez o parasito estimule a síntese da citocina IL-10 por macrófagos infectados ou até mesmo em células Treg presentes nos órgãos-alvo, o que poderia contribuir com sua multiplicação e permanência no hospedeiro.

O parasito pode contribuir diretamente na modulação da resposta imune do hospedeiro, pois ele produz proteases que estão associadas à sua virulência. A cathepsina B, uma protease presente em muitos tipos celulares e ativada no ambiente lisossomal, pode ser produzida pelo parasito e promove a sobrevivência do mesmo, pois ativa o TGF- $\beta$  latente na MEC e com isso leva a imunossupressão local (WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005). Tais achados corroboram com os resultados deste estudo, onde os níveis de TGF- $\beta$  foram maiores nos cães sintomáticos, em órgãos com elevada carga parasitária (baço e linfonodos). Talvez a ação desta protease parasitária esteja ativando a produção desta citocina.

Neste estudo, a expressão de MIF foi maior no grupo de cães sintomáticos em todos os órgãos avaliados. BANDARRA (2010) observou a predominância de células imunomarcadas para MIF nos linfonodos poplíteo e pré-escapular de cães do grupo sintomático. Possivelmente a citocina pró-inflamatória MIF possa ser utilizada pelo parasito, para favorecer sua permanência e multiplicação no interior de macrófagos no grupo S, pois ela tem o papel de manter os macrófagos por mais tempo no local da injúria. No grupo AS é possível que exista um efeito pró-inflamatório de MIF associado a outros fatores na tentativa de controlar a infecção.

No presente estudo, os níveis de Tbet foram elevados no linfonodo poplíteo dos cães infectados (AS e S). Nos outros órgãos (linfonodo pré-escapular, fígado e baço), os maiores níveis foram observados nos grupos assintomático e controle. Os níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  se comportaram de forma similar no grupo S no poplíteo e nos demais órgãos foram mais elevados somente no grupo AS. Tbet está envolvido na ativação de uma resposta imune Th1 (ROSAS, et. al., 2006; SZABO et. al., 2000). Na literatura destacou-se que TGF- $\beta$  pode bloquear o desenvolvimento inicial de linfócitos T Th1 e Th2, por inibir os fatores de transcrição Tbet e GATA-3 (WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005). Menezes-Souza et al. (2011) avaliaram a pele de cães naturalmente infectados com *L. infantum chagasi* e verificaram que a carga parasitária elevada estava associada a altos níveis de IL-10 e TGF- $\beta$ . Estes achados tiveram correlação significativa negativa com IL-12. Da mesma forma a expressão de Tbet, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$

foram maiores nos grupos de cães infectados, independente da presença ou não de sinais clínicos de LV. Strauss-Ayali; Baneth; Jaffe (2007) investigaram a resposta imune esplênica em cães natural e experimentalmente infectados por *L. infantum* e observaram um aumento de IFN- $\gamma$ , Tbet, IL-4, IL-5 e das quimiocinas Rantes e IP-10 na infecção natural. No presente estudo os níveis de TGF- $\beta$  foram maiores no grupo sintomático e em todos os órgãos exceto o fígado.

No presente estudo, o fator de transcrição GATA-3 teve sua maior expressão no grupo controle, no baço e linfonodos (poplíteo e pré-escapular). A sua expressão foi baixa em todos os grupos de cães. A citocina IL-4 ligada ao receptor precursor de linfócitos Th pode induzir a rápida expressão de GATA-3 (ZHENG E FLAVELL, 1997; OUYANG et al., 2000). Em nosso estudo esta citocina apresentou baixa expressão em todos os grupos, porém foi maior nos animais infectados em relação ao grupo controle. Em modelos experimentais com roedores ou com cães foi relatado que IL-4 teve maior expressão na fase precoce de LV e reduziu com a progressão da doença (WILSON, JERONIMO, PEARSON, 2005; STRAUSS-AYALI, BANETH, JAFFE, 2007). GATA-3 é um importante ativador da resposta imune do tipo Th2, porém no presente estudo possivelmente outros fatores estariam influenciando, como por exemplo as citocinas regulatórias IL-10 e TGF- $\beta$ , que podem ser produzidas por linfócitos Treg, entre outros tipos celulares. ANDRADE (2012) avaliou as células Treg no baço de cães com LV e verificou, por citometria de fluxo, que houve um aumento da produção de IL-10 pelas Treg e paralelamente uma redução desta população de células nos cães infectados quando comparados ao grupo controle. A redução deste tipo celular foi atribuída a persistência da resposta imune nos cães infectados. MENEZES-SOUZA et al. (2011) verificaram uma redução de GATA-3 no grupo de cães sintomáticos e uma correlação negativa alta com a evolução clínica de LV, bem como, uma correlação positiva com os níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 na pele destes animais.

Os resultados do presente estudo estão de acordo com os relatos em modelos experimentais em camundongos, em cães e no homem, de que a resposta imune a espécies de *Leishmania* sp., que causam visceralização ou disseminação sistêmica do

parasito, não são polarizadas para um perfil Th1 ou Th2, mas sim caracterizam-se por um padrão de resposta misto (Th1/Th2), que pode ser modulado inicialmente por produtos do próprio protozoário, para favorecer a sua sobrevivência e disseminação sistêmica. As citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  parecem exercer um papel fundamental na progressão da LV no cão, pois inibem uma resposta imune específica e por sub-regularem os fatores de transcrição T-bet e GATA-3. A citocina MIF claramente está atuando a favor do protozoário e pode ser responsável pela sobrevivência deste nos macrófagos. Da mesma forma gostaríamos de ressaltar que os cães assintomáticos também apresentam visceralização do parasito para diferentes tecidos, com menor proporção do número de formas amastigotas quando comparados ao grupo sintomático, mas estes cães também podem ser muito importantes como fontes de infecção para o homem.

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições deste estudo permitiram concluir que:

- Os níveis de DNA do parasito foram mais elevados no baço e linfonodos poplíteo e pré-escapular dos cães sintomáticos.
- O fígado teve um padrão diferenciado, por apresentar baixa expressão do DNA de *Leishmania infantum chagasi* e um perfil misto de citocinas Th1 e Th2, em ambos os grupos infectados em relação ao grupo controle, possivelmente por um efeito adicional da resposta imune inata (células de kupffer, células natural “killer” hepáticas).
- As citocinas IL-4, IL-10, TGF $\beta$  e MIF tiveram maior nível de expressão de mRNA no grupo sintomático, em todos os órgãos;
- As citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  tiveram maiores níveis nos cães assintomáticos;
- O fator de transcrição T-bet teve sua expressão genica aumentada nos animais do grupo assintomático;
- O fator de transcrição GATA-3 teve a expressão genica diminuída nos cães infectados.
- Os cães assintomáticos são tão importantes quanto os sintomáticos na cadeia epidemiológica da LV canina, por apresentarem visceralização do parasita.

## 8. REFERENCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Editora Saunders Elsevier, 2011. 545p.

ALVES, C. F.; AMORIM, I. F. G.; MOURA, E. P.; RIBEIRO, R. R.; ALVES, C. F.; MICHALICK, M. S.; KALAPOTHAKIS, E.; ROMERO, O. B.; TAFURI, W. L.; TEIXEIRA, M. M.; MELO, M. N. Expression of IFN-g, TNF-a, IL-10 and TGF-b in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*, **Veterinary immunology and immunopathology**, vol. 128, p. 349–358, 2009.

ANDRADE, M. M. C. **Células CD4+FOXP3+ produzem IL-10 no baço de cães com Leishmaniose Visceral**. 2012. 39f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) - Faculdade de Medicina Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2012.

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

AUGUSTIJN, K. D.; KLEEMANN, R.; THOMPSON, J.; KOOISTRA, T.; CRAWFORD, C. E.; REECE, S. E.; PAIN, A.; SIEBUM, A. H. G.; JANSE, C. J.; WATERS, A. P. Functional characterization of the *Plasmodium falciparum* and *P. berghei* homologues of macrophage migration inhibitory factor. **Infection and Immunity**, Washington, v. 75, n. 3, p. 1116–1128, 2007.

BANDARRA, M. B. **Análise da carga parasitária e imunodeteção de MIF em linfonodos de cães com Leishmaniose Visceral**. 2010. 45f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 28, n. 7, p. 329-337, 2006.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The immune response to leishmania mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 1, p.121-134, 1998.

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

BRITO, F. L. C. **Patologia, resposta imune humoral e diagnóstico em cães com oftalmopatias decorrentes da infecção natural por *Leishmania (Leishmania chagasi)***. 2006. 55f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária), - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

CHO, Y.; S.; JONES, B. F.; VERMEIRE, J. J.; LENG, L.; DiFEDELE, L.; HARRISON, L. M.; XIONG, H.; KWONG, Y. K. A.; CHEN, Y.; BUCALAI, R.; LOLIS, E.; CAPPELLO, M. Structural and functional characterization of a secreted hookworm macrophage migration inhibitory factor (MIF) that interacts with the human MIF receptor CD74. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 282, p. 23447–23456, 2007.

CORDERY, D. V.; KISHORE, U.; KYES, S.; SHAFI, M. J.; WATKINS, K. R.; WILLIAMS, T. N.; MARSH, K.; URBAN, B. C. Characterization of a *Plasmodium falciparum* macrophage-migration inhibitory factor homologue. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 195, n. 6, p. 905–912, 2007.

DUARTE, M. I. S. **Análise subcelular qualitativa e morfométrica dos hepatócitos e da região sinusoidal na leishmaniose visceral humana**. 1987. 235p. Livre Docência - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. São Paulo, 1987.

DUARTE, M. I. S.; ANDRADE J. R.; TAKAMURA, C. F. H.; SESSO, A.; TUON, F. F. TGF-beta and mesenchymal hepatic involvement after visceral leishmaniasis. **Parasitol Res**, v.104, p.1129-1136, 2009.

FALQUETO, A.; SESSA, P. A. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: VERONESI - **Tratado de infectologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. v.1, p.1543-1557.

FRIEDMAN, S.L. Hepatic Stellate Cells: Protean Multifunction and Enigmatic cells of the Liver. **Physiology Review**, n. 88, p. 125-172, 2008.

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

GIUNCHETTI, R. C.; MARTINS-FILHO, O. A.; CARNEIRO, C. M.; MAYRINK, W.; MARQUES, M. J.; TAFURI, W. L.; CORREIA-OLIVEIRA, R.; REIS, A. B. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis, **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 121, n. 1-2, p. 23-33, 2008.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 4, p. 615-623, 2004.

GRIMALDI, J. G.; TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of geographical distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Nothkrook, v. 4, p. 687-725, 1989.

IVENS, A. C.; PEACOCK, C. S.; WORTHEY, E. A.; MURPHY, L.; AGGARWAL, G.; BERRIMAN, M.; SISK, E.; RAJANDREAM, M. A.; ADLEM, E.; AERT, R. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, Washington, v. 309, n. 5733, p. 436–442, 2005.

JAWORSKI, D. C.; JASINSKAS, A.; METZ, C. N.; BUCALA, R.; BARBOUR, A. G. Identification and characterization of a homologue of the pro-inflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor in the tick, *Amblyomma americanum*. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 10, n. 4, p. 323–331, 2001.

JÜTTNER, S.; BERNHAGEN, J.; METZ, C. N.; RÖLLINGHOFF, M.; BUCALA, R.; GESSNER, A. Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF- $\alpha$ . **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 161, n. 5, p. 2383-2390, 1998.

KAMIR, D.; ZIEROV, S.; LENG, L.; CHO, Y.; DIAZ, Y.; GRIFFITH, J.; MCDONALD, C.; MERK, M.; MITCHELL, R. A.; TRENT, J.; CHEN, Y.; KWONG, Y. K. A.; XIONG, H.; VERMEIRE, J.; CAPPELO, M.; MCMAHON-PRATT, D.; WALKER, J.; BERNHAGEN, J.; LOLIS, E.; BUCALA, R. A. *Leishmania* Ortholog of Macrophage Migration Inhibitory Factor Modulates Host Macrophage Responses. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 180, n.12, p. 8250-8261, 2008.

LIMA, W. G.; MICHALICK, M. S. M.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**, Basel, v. 92, n. 1, p. 43-53, 2004.

LIMA, V. M. F.; PEIRO, J. R.; VASCONCELOS, R. O. IL-6 and TNF  $\alpha$  productions during active canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 115, n. 1-2, p.189-193, 2007.

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

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

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

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SABROZA, P. C.; SOUZA, M. A.; SOUZA, P. P.; TOLEDO, L. M.; FILHO, F. B. R. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro – Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 4, p. 432-446, 1985.

MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. In: CONGRESSO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETISIOSES, 1., 2004, Ouro Preto. **Anais...** CD-ROM.

MELO, F. A. **Alterações da matriz extracelular do fígado, baço e linfonodos cervicais de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 2008. 101f. Tese (Doutorado em Patologia Geral), - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

MENEZES-SOUZA, D.; OLIVEIRA, R. C.; GUERRA-SAC, R.; GIUNCHETTIA, R. C.; CARVALHO, A. T.; 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.

MISKA, K. B.; FETTERER, R. H.; LILEHOJ, H. S.; JENKINS, M. C.; ALLEN, P. C.; HARPER, S. B. Characterisation of macrophage migration inhibitory factor from *Eimeria* species infectious to chickens. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 151, n. 2, p. 173–183, 2007.

MOREIRA, P. R. R. **Resposta imune diferenciada no fígado e no baço de cães com Leishmaniose Visceral**. 2013. 66f. Tese (Doutorado em Patologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

MOREIRA, P. R. R.; BANDARRA, M. B.; MAGALHÃES, G. M.; MUNARI, D. P.; MACHADO, G. F.; PRANDINI, M. M.; ALESSI, A. C.; VASCONCELOS, R. O. Influence of apoptosis on the cutaneous and peripheral lymph node inflammatory response in dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**. v. 192, p. 149-457, 2013.

MOREIRA, P. R. R.; VIEIRA, L. M.; ANDRADE, M. M. C.; BANDARRA, M. B.; MACHADO, G. F.; MUNARI, D. P.; VASCONCELOS, R. O. Immune response pattern of the popliteal lymph nodes of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**. v. 107, p. 605-613, 2010.

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

MYLONAKIS, M. E.; PAPAIOANNOU, N.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; KOUTINAS, A. F.; BILLINIS C.; KONTOS, V. I. Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 34, n. 3, p. 243-247, 2005.

NAVEDA, L. A. B.; MOREIRA, E. C.; MACHADO, J. G.; MORAES, J. R. C.; MARCELINO, A. P. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, 2003. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 6, p. 988-993, 2006.

NILÉN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends Immunology**, v. 28, n. 9, p. 378-384, 2007.

NUNES, V. L. B.; GALATI, E. A. B.; NUNES, D. A.; ZINEZZI, R. O.; SAVANI, E. S. M. M.; ISHIKAWA, E.; CAMARGO, M. C. G. O.; D'AURIA, S. R. N.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C. Ocorrência de leishmaniose visceral canina em assentamento agrícola no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Salvador, v. 34, n. 3, p. 301-302, 2001.

OUYANG, W.; LOHNING, M.; GAO, Z.; ASSENMACHER, M.; RANGANATH, S.; RADBRUCH, A.; MURPHY, K. M. Stat6 independent GATA-3 autoactivation directs. **Immunity**. v. 12, p. 27-37, 2000.

PASTRANA, D. V.; RAGHAVAN, N.; FITZGERALD, P.; EISEINGER, S.W.; METZ, C.; BUCALA, R.; SCLEIMER, R. P.; BICKEL, C.; SCOTT, A. L. Filarial nematode parasites secrete a homologue of the human cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF). **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 12, p. 5955–5963, 1998.

PENHA, T. A. **Expressão das quimiocinas MIP-1 $\alpha$  e MCP-1 em relação a carga parasitária em cães com Leishmaniose Visceral**. 2011. 53f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2011.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical Infection Diseases**, Chicago, v. 22, n. 1, p. 1-11, 1996.

PETERS, I. R.; HELPS, C. R.; CALVERT, E. L.; HALL, E. J.; DAY, M. J. Cytokine mRNA quantification in histologically normal canine duodenal mucosa by real-time RT-PCR. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 103 p. 101–111, 2005.

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

REY, L. Principais grupos de protozoários e metazoários, parasitos do homem e seus vetores. In:\_\_\_\_\_ (Ed.). **Parasitologia**. 3<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 9, p. 123-134.

REYES, J. L.; TERRAZAS, L .I.; ESPINOZA, B.; CRUZ-ROBLES, D.; SOTO, V.; RIVERA-MONTOYA, I.; GÓMEZ-GARCIA, L.; SINIDER, H.; SATOSKAR, A. R.; RODRIGUEZ-SOSA, M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 74, n. 6, p. 3170-3179, 2006.

RICHARDSON, J. M.; MORRISON, L. S.; BLAND, N. D.; BRUCE, S.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C.; WALKINSHAW, M. D. Structures of *Leishmania major* orthologues of macrophage migration inhibitory factor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 380, p. 442-448, 2009.

ROSAS, L. E.; SNIDER, H. M.; BARBI, J.; SATOSKAR, A. A.; LUGO-VILLARINO, G.; KEISER, T.; PAPENFUSS, T.; DURBIN, J. E.; RADZIOCH, D.; GLIMCHER, L. H.; SATOSKAR, A. R. State1 and T-bet play distinct roles in determining outcome of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. **Journal Immunology**, v. 177, p. 22-25, 2006.

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

SAVANI, E. S. M. M.; SCHIMONSKY, B. V.; CAMARGO, M. C. G. O.; D'AURIA, S. R. N. Vigilância de leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 260-262, 2003.

SLAPPENDEL, R. J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: Greene, C.E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: Editora W.B. Saunders Co, 1990. p. 450–458.

SATOSKAR, A. R.; BOZZA, M.; SOSA, M. R.; LIN, G.; DAVID, J. R. Migrationinhibitory factor gene-deficient mice are susceptible to cutaneous *Leishmania major* infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 2, p. 906-911, 2001.

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

SZABO, S. J.; KIM, S. T.; COSTA, G. L.; ZHANG, X.; FATHMAN, C. G.; GLIMCHER, L. H.; A novel transcription factor T-bet directs Th1 lineage commitment. **Cell**. v. 6, n. 100, p. 655-659, 2000.

TAFURI, W. L.; SANTOS, R. L.; ARANTES, R. M. E.; GONÇALVES, R.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. M.; TAFURI, W. L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.292, n. 1-2, p. 17-23, 2004.

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

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

WHO - **Research to support the elimination of visceral leishmaniasis**. Disponível em: <<http://apps.who.int/tdr/svc/publications/about-tdr/annual-reports/visceral-leishmaniasis-elimination-2008>>. Acesso em: 11/jan./2010.

VANHERBERGHEN, M.; BUREAU F.; PETERS, I. R.; DAY, M. J.; LYNCH, A.; FIEVEZ, L.; BILLEN, F.; CLERCX, C.; PEETERS, D. Cytokine and transcription factor

expression by *Aspergillus fumigatus*-stimulated peripheral blood mononuclear cells in dogs with sino-nasal aspergillosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, p. 111–120, 2013.

VERMA, S.; KUMAR, R.; KATARA, G. K.; SINGH, L. C.; NEGI, N. S.; SALOTRA, P. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. **Plos One**, v. 5, n. 4, p. 1-8, 2010.

XAVIER, S. C.; CHIARELLI, I. M.; LIMA, W. G.; GONÇALVES, R.; TAFURI, W. L. Canine visceral Leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal reported from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 6, p. 994-1000, 2006.

ZHENG, W.; FLAVELL, R.A.; The Transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. **Cell**, v.4, n. 89, p. 587-596, 1997.

WILSON, M.E.; JERONIMO, S.M.B.; PEARSON, R.D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microbial Pathogenesis**, v. 38, p. 147-160, 2005).

WU, Z.; BOONMARS, T.; NAGAMO, I.; NAKADA, T.; TAKAHASHI, Y. Molecular expression and characterization of a homologue of host cytokine macrophage migration inhibitory factor from *Trichinella* spp. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 89, n. 3, p. 507–515, 2003.