

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CAMPUS ARAÇATUBA

**RELAÇÃO DA EXPRESSÃO DO TLR-2, DA ENZIMA
iNOS, DAS CITOCINAS IL-10, TNF- α E TGF- β COM A
CARGA PARASITÁRIA DA PELE DE CÃES
NATURALMENTE ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE
VISCERAL**

Dandara Camila Morais Pereira

Bióloga

ARAÇATUBA - SP

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CAMPUS ARAÇATUBA

**RELAÇÃO DA EXPRESSÃO DO TLR-2, DA ENZIMA
iNOS, DAS CITOCINAS IL-10, TNF- α E TGF- β COM A
CARGA PARASITÁRIA DA PELE DE CÃES
NATURALMENTE ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE
VISCERAL**

Dandara Camila Morais Pereira

Orientadora: Prof. Adj. Cárís Maroni Nunes

Co-orientadora: Prof. Adj. Valéria Marçal Félix de Lima

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, campus Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP

2015

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

Pereira, Dandara Camila Moraes

P414r

Relação da expressão do TLR-2, da enzima iNOS, das citocinas IL-10, TNF- α e TGF- β com a carga parasitária da pele de cães naturalmente acometidos por Leishmaniose visceral / Dandara Camila Moraes Pereira.

Araçatuba: [s.n], 2015

69f. il.; CD-ROM

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

Orientadora: Prof. Adj. Caris Maroni Nunes

Co-orientador: Prof. Adj. Valéria Marçal Félix de Lima

1. Leishmaniose visceral. 2. Carga parasitária 3. expressão gênica, 4. receptor do tipo Toll 2. I. T.

CDD 616.9364



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



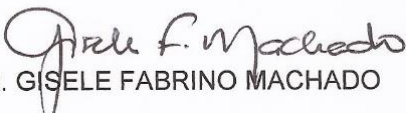
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

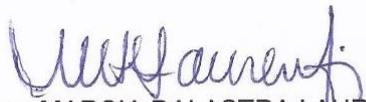
TÍTULO: Relação da expressão do TLR-2, da enzima iNOS, das citocinas IL-10, TNF- α , TGF- β com a carga parasitária da pele de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

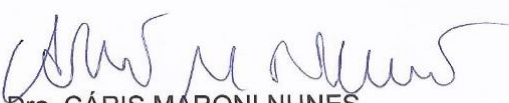
AUTORA: DANDARA CAMILA MORAIS PEREIRA

ORIENTADORA: Dra. CÁRIS MARONI NUNES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRA em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.


Dra. GISELE FABRINO MACHADO


Dra. MARCIA DALASTRA LAURENTI


Dra. CÁRIS MARONI NUNES

DATA DA REALIZAÇÃO: 13 de agosto de 2015.


Presidente da Comissão Examinadora
Dra. CÁRIS MARONI NUNES
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DANDARA CAMILA MORAIS PEREIRA – nascida na cidade de Cuiabá-MT em 06 de outubro de 1986. Possui graduação (bacharelado e licenciatura) em Ciências Biológicas pela Universidade Paulista (UNIP), campus de Araçatuba no ano de 2009. Participou como bolsista do Programa de Aprimoramento Profissional oferecido pela Secretaria de Estado da Saúde, realizado junto a Superintendência de Controle de Endemias (Sucen) de Araçatuba no período de março de 2011 a fevereiro de 2013. Aluna do programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FMVA/UNESP desde março de 2013 e bolsista CAPES no mesmo ano.

“Mantenha seus pensamentos positivos, porque seus pensamentos tornam-se suas palavras. Mantenha suas palavras positivas, porque suas palavras tornam-se suas atitudes. Mantenha suas atitudes positivas, porque suas atitudes tornam-se seus hábitos. Mantenha seus hábitos positivos, porque seus hábitos tornam-se seus valores. Mantenha seus valores positivos, porque seus valores tornam-se seu destino.”

Mahatma Gandhi

DEDICATÓRIA

À minha família, por todo apoio, incentivo, amor e compreensão, os quais foram fundamentais para a conclusão de mais uma etapa em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos à minha orientadora, professora Cárís Maroni Nunes, por sua orientação, dedicação, apoio, pela confiança a mim depositado e principalmente por sua compreensão ao longo de tantas mudanças.

À minha co-orientadora, professora Valéria Marçal Félix de Lima por todos os ensinamentos, por sua disponibilidade e apoio durante todo o projeto.

Aos professores Marcelo Vasconcelos Meireles e Gisele Fabrino Machado, por sempre se mostrarem solícitos quando precisamos.

Aos meus queridos amigos e companheiros de trabalho do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBMA) Flávia, Silvana, Sarita, Rafaela, Yuri, Pier, Adam, Anirene, Tamiris, Ludmilla e ao professor José Fernando Garcia, por todos os momentos compartilhados e por todos os ensinamentos. Em especial, meus sinceros agradecimentos a Fernanda por toda ajuda nos momentos de correria, e principalmente por sua paciência e carinho demonstrados nas horas mais difíceis.

A toda a equipe dos Laboratórios de Imunologia, Patologia e Ornitopatologia pela disposição e auxílio quando necessários.

A todos os funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, em especial ao programa de pós-graduação em Ciência Animal, do campus de Araçatuba.

Ao grupo de pesquisa da Universidade de Warwick na Inglaterra pela colaboração nesse projeto.

A Capes pela concessão de bolsa de mestrado.

E em especial, a toda a minha família, minha base, meu porto seguro, sem o qual eu jamais teria conseguido chegar até aqui. Em especial à minha mãe Carmen, por todo seu carinho, amor, incentivo e cuidado ao longo desses anos. À minha irmã Radhala por todos os momentos de alegria compartilhados, pelo companheirismo e apoio, e por ter me proporcionado a alegria de ser tia e madrinha da Ana Laura, o meu maior presente. Aos meus avós Walter e Maria,

que sempre estiveram presentes em minha vida demonstrando o vosso amor de todas as formas possíveis. Ao meu marido Douglas, por todo seu amor, por seu companheirismo durante todos esses anos juntos e, principalmente, por sua paciência nos vários momentos em que estivemos distantes. O apoio e incentivo de vocês foram fundamentais nessa conquista. A vocês todo meu amor e minha eterna gratidão!

Agradeço principalmente a Deus por todas as oportunidades a mim concedidas, por toda força e conforto nos momentos difíceis e por me permitir conhecer e conviver com pessoas maravilhosas ao longo dessa trajetória.

A todos os que participaram deste projeto, direta ou indiretamente, meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	16
RESERVATÓRIO CANINO DA LEISHMANIOSE VISCERAL	17
RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE VISCERAL	20
REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO 2 – RELAÇÃO DA EXPRESSÃO DO TLR-2, DA ENZIMA iNOS, DAS CITOCINAS IL-10, TNF-α E TGF-β COM A CARGA PARASITÁRIA DA PELE DE CÃES NATURALMENTE ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE VISCERAL	38
INTRODUÇÃO	40
MATERIAIS E MÉTODOS	43
Delineamento Experimental	43
Área de estudo	44
Amostras de cães	44
Avaliação da carga parasitária por qPCR	44
Expressão gênica por qPCR	46
Análise estatística	48
RESULTADOS	48
Relação entre a carga parasitária e a expressão gênica de TLR-2, iNOS, IL-10, TNF- α e TGF- β	49
Correlação da expressão entre os genes de interesse	51

Expressão dos genes nos grupos segundo a carga parasitária	52
DISCUSSÃO	53
CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
APÊNDICES	68
APÊNDICE A. Resultados dos ciclos limiares (Ct) médios da expressão gênica, por RT-PCR em tempo real.....	68
Apêndice 1A – Valores médios dos ciclos limiares (Ct) da expressão gênica do receptor TLR-2, da enzima iNOS, das citocinas TNF-α , TGF-β e IL-10 e do gene de referência HPRT-1, por qPCR da pele de oito cães negativos para LVC (grupo controle).....	68
Apêndice 2A – Sinais clínicos e valores médios dos ciclos limiares (Ct) da expressão gênica do receptor TLR-2, da enzima iNOS, das citocinas TNF-α , TGF-β e IL-10 e do gene de referência HPRT-1 por qPCR da pele de 29 cães naturalmente acometidos por LV (grupo infectado).....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

°C = grau Celsius

ΔCt = Ct do gene alvo – Ct do gene de referência

$\Delta\Delta Ct$ = ΔCt médio do grupo infectado – ΔCt médio do grupo controle

μg = micrograma

μL = microlitro

μM = micromolar

CA = grupo de cães com carga parasitária alta

CB = grupo de cães com carga parasitária baixa

CCZ = centro de controle de zoonoses

cDNA = DNA complementar

CP = carga parasitária

Ct = ciclo limiar (“cycle threshold”)

CT = grupo controle

DNA = ácido desoxirribonucléico

ELISA = ensaio imunoenzimático

FOA = Faculdade de Odontologia de Araçatuba

FMVZ = Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

HPRT-1 = “hipoxanthine phosphoribosyltransferase 1”

IFN- γ = interferon gama

IL-10 = interleucina 10

iNOS = óxido nítrico síntase induzível

kDNA = DNA do citenoplasto

LDU = “Leishman Donovan Units”

log = logaritmo na base 10

logCP = logaritmo na base 10 da carga parasitária

LPG = lipofosfoglicano

LPS = lipopolissacárideo

LV = leishmaniose visceral

LVC = leishmaniose visceral canina

mL = mililitro

mRNA = RNA mensageiro

NO = óxido nítrico ("nitric oxide")

ng = nanograma

nM = nanomolar

pb = pares de base

PCR = reação em cadeia da polimerase

PRR = receptor de reconhecimento padrão ("pattern recognition receptors")

qPCR = PCR em tempo real

r^2 = coeficiente de determinação

RIFI = reação de imunofluorescência indireta

RNA = ácido ribonucléico

RT-qPCR = reação da transcriptase reversa seguida de PCR em tempo real

TGF- β = fator de crescimento transformador beta

Th1 = linfócito T auxiliar ("helper") tipo 1

Th2 = linfócito T auxiliar ("helper") tipo 2

TLR = receptor do tipo toll ("toll like receptor")

TLR-2 = receptor do tipo toll 2

TNF- α = fator de necrose tumoral alfa

Treg = linfócito T regulatório

**RELAÇÃO DA EXPRESSÃO DO TLR-2, DA ENZIMA iNOS, DAS
CITOCINAS IL-10, TNF- α E TGF- β COM A CARGA PARASITÁRIA DA PELE
DE CÃES NATURALMENTE ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE
VISCERAL**

RESUMO – A progressão da leishmaniose visceral canina (LVC) depende do perfil da resposta imune, sendo que a imunidade celular efetiva está relacionada à predominância de citocinas Th1, como o TNF- α , e o desenvolvimento da doença está mais relacionado à resposta imune humoral exacerbada, com predominância de citocinas Th2, como a IL-10 e o TGF- β . O TLR-2, por sua vez, é um receptor da imunidade inata que tem importante papel na leishmaniose visceral por participar na indução da produção de citocinas e ativação da iNOS. Para entender como a pele pode se tornar um microambiente permissivo à multiplicação do parasita, a expressão dos genes que codificam o TLR-2, a enzima iNOS e as citocinas IL-10, TNF- α e TGF- β foi avaliada na pele de cães naturalmente acometidos por LVC e relacionada à carga parasitária deste tecido, em comparação a cães não infectados. Observou-se que a pele de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral apresenta perfil misto Th1/Th2 de resposta imune, com aumento da expressão do TLR-2, da IL-10 e do TNF- α , aumento este que se correlaciona com o aumento da carga parasitária neste tecido, atribuindo a estes mediadores um papel importante na patogênese da LVC.

Palavras-chave: carga parasitária, expressão gênica, leishmaniose visceral canina, receptor do tipo Toll 2

RELATIONSHIP BETWEEN THE EXPRESSION OF TLR-2, iNOS ENZYME, IL-10, TNF- α AND TGF- β CYTOKINES AND THE SKIN PARASITE LOAD OF DOGS NATURALLY AFFECTED BY VISCERAL LEISHMANIASIS

SUMMARY – The progression of the canine visceral leishmaniasis (CVL) is related to the immune response profile. The effective cellular immunity is related to the predominance of Th1 cytokines such as TNF- α and the disease is related to an exacerbated humoral immune response, with the predominance of Th2 cytokines such as IL-10 and TGF- β . TLR-2 is an important receptor of the innate immunity involved in the induction of the cytokines production and the activation of iNOS in visceral leishmaniasis. To understand how the skin may become a permissive microenvironment for the multiplication of this parasite, the expression of genes encoding to TLR-2, to the iNOS enzyme and to the cytokines IL-10, TNF- α and TGF- β was evaluated in skin of dogs naturally affected by CVL and were then was related to the parasite load of this tissue. We observed that the skin of dogs naturally affected by visceral leishmaniasis has a mixed Th1/Th2 immune response profile, with an increased expression of TLR-2, IL-10 and TNF- α that correlates to the increasing of the parasitic load in this tissue, giving these mediators an important role in the pathogenesis of CVL.

Keywords: canine visceral leishmaniasis, gene expression, immune response, parasitic load, Toll like receptor 2

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários digenéticos pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Tripanosomatidae, gênero *Leishmania*, os quais têm o seu ciclo de vida alternado entre hospedeiros vertebrados e invertebrados (DESJEUX, 2004; LAINSON; SHAW, 1987).

Sua ocorrência abrange 88 países podendo apresentar-se com diferentes manifestações clínicas, geralmente divididas em leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose cutânea (LC), geralmente menos agressiva; e a leishmaniose visceral (LV), forma mais grave da doença (DESJEUX, 2004; MURRAY et al., 2005).

A leishmaniose visceral é uma zoonose de evolução crônica que se apresenta como uma das principais endemias causadas por parasitas, sendo considerada um importante problema de saúde pública por sua incidência e alta letalidade quando associados a indivíduos que não recebem tratamento, crianças com má nutrição ou indivíduos portadores de HIV (BRASIL, 2006; DESJEUX, 2004). As manifestações clínicas da LV, em geral decorrentes de alterações do fígado, baço e órgãos linfoides, resultam em febre, perda de peso, hepatomegalia e esplenomegalia (FREITAS; PINHEIRO, 2010).

A LV ocorre em 65 países, sendo que 90% dos casos ocorrem em populações rurais de baixa renda e áreas suburbanas de 5 países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (DESJEUX, 2004). Uma incidência de 500.000 casos humanos de LV tem sido estimada anualmente sendo que 350 milhões de pessoas estão em áreas de risco (DESJEUX, 1996).

Nas Américas o principal agente etiológico da LV é o protozoário *Leishmania chagasi* (CUNHA; CHAGAS, 1937; LAINSON; SHAW, 1987), atualmente denominada *Leishmania (L.) infantum chagasi*, devido sua

similaridade com *L. (L.) infantum* (MAURÍCIO et al., 2000). A LV ocorre em pelo menos 12 países da América Latina. No Brasil a LV ocorre nas cinco regiões, incluindo a região Sul do país, de ocorrência mais recente (BRASIL, 2011a), demonstrando sua capacidade de expansão e adaptação.

O processo de expansão e urbanização da LV no Brasil vem ocorrendo desde a década de 80, estando associado aos constantes desmatamentos, ao crescimento urbano desordenado e aos processos migratórios, incluindo à migração de casos humanos e de cães infectados para cidades de grande e médio porte. Assim, o ciclo de transmissão antes considerado essencialmente de áreas rurais, demonstrou adaptação ao ambiente urbano (GONTIJO; MELO, 2004; MENDES et al., 2000), resultando em novo perfil epidemiológico desta zoonose.

No Brasil, os principais vetores da *Leishmania infantum chagasi*, são os flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* (LAINSON; RANGEL, 2005). Durante o repasto sanguíneo, as fêmeas infectadas inoculam as formas promastigotas metacíclicas (infectantes) do parasita na pele do hospedeiro vertebrado, as quais são fagocitadas por macrófagos sendo, em seguida, diferenciadas em amastigotas (formas intracelular obrigatória) no hospedeiro vertebrado (HANDMAN; BULLEN, 2002) sendo distribuídos aos órgãos alvos, como linfonodo, medula óssea, baço e fígado (ALVAR et al., 2004; PAPADOGIANNAKIS; KOUTINAS, 2015; REIS et al., 2006). Assim, o ciclo biológico do protozoário recomeça com um flebotomíneo não infectado se alimentando no hospedeiro infectado, adquirindo as formas amastigotas, as quais se transformam em promastigotas no trato digestório do inseto vetor, tornando-o capaz de infectar outros mamíferos (KILLICK-KENDRICK, 1990).

Reservatório canino da leishmaniose visceral

Nas Américas, os principais reservatórios da LV são os canídeos domésticos e silvestres, sendo também relatada a infecção de *L. infantum*

chagasi em gatos (*Felis catus*), canídeos silvestres (*Cerdocyon thous*, *Lycalopex vetulus*), marsupiais (*Didelphis marsupialis*, *D. albiventris*) e roedores (*Proechymis oris*) (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006).

Devido à alta prevalência da leishmaniose visceral em cães domésticos (*Canis familiaris*), associada ao processo de urbanização e à incidência de LV em humanos (HARHAY et al., 2011), o cão é considerado o principal reservatório urbano, representando importante papel na epidemiologia da doença por participar da manutenção do ciclo do parasito e atender às condições necessárias para o desenvolvimento da *L. infantum chagasi* (ALVAR et al., 2004).

Uma vez infectados, os cães podem se apresentar clinicamente como doentes ou assintomáticos, de acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos e/ou alterações clinicopatológicas, respectivamente (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Os sinais clínicos podem variar amplamente na leishmaniose visceral canina (LVC) sendo as lesões na pele (dermatite esfoliativa, úlceras cutâneas e alopecia), onicogribose, linfadenopatia, hiperqueratose nasal e digital, anemia, perda de peso progressiva, atrofia muscular generalizada, diminuição do apetite, letargia, esplenomegalia, lesões oculares (uveíte, conjuntivite, ceratoconjuntivite seca, blefarite) e epistaxe, os mais frequentemente observados (ALVAR, 2004; BANETH et al., 2008; CIARAMELLA et al., 1997).

Em áreas endêmicas, a prevalência de LVC é maior em cães assintomáticos (BANETH et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2001). Além disto, os cães assintomáticos são capazes de transmitir a *L. infantum chagasi* aos flebotomíneos (LAURENTI et al., 2013), reforçando seu papel na disseminação da doença.

Diferentes métodos diagnósticos têm sido utilizados na LVC como o exame parasitológico de punção biopsia aspirativa de medula óssea, linfonodo, baço, fígado, pele ou sangue, testes sorológicos como a fixação de

complemento, a reação de imuno-histoquímica (IHQ), a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e técnicas moleculares como a amplificação de DNA pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) (LAURENTI, 2009; PEREIRA-CHIOCCOLA, 2009).

As medidas de controle da LV adotadas no Brasil são baseadas na detecção e tratamento precoces dos casos humanos, na diminuição da densidade do vetor por meio de manejo ambiental e uso de inseticidas e no diagnóstico e eliminação dos cães sorologicamente positivos (BRASIL, 2006), visto seu potencial de transmissão da LV. A eutanásia é a medida de controle mais controversa, não somente pelo aspecto de proteção da vida animal, como pela sua efetividade em diminuir a incidência de LV em humanos (COSTA, 2011; COURTENAY et al., 2002). Contribuem para o limitado sucesso da eliminação do reservatório canino o método diagnóstico utilizado, o longo período de tempo entre diagnóstico e eliminação dos cães positivos e a própria implementação desta medida (GRIMALDI et al., 2012; REITHINGER et al., 2002).

Como forma de diminuir a influência destes fatores os inquéritos sorológicos têm sido realizados por meio do teste rápido “Dual Path Platform-DPP” (Bio-Manguinhos[®]) para triagem dos cães e subsequente confirmação dos cães positivos, por meio do teste de EIE-ELISA (Bio-Manguinhos[®]) (BRASIL, 2011b). O DPP tem como vantagem a maior praticidade de execução e o uso de antígeno mais específico.

Resposta Imune na leishmaniose visceral

Mecanismos complexos estão envolvidos na capacidade das espécies de *Leishmania* em invadir e sobreviver dentro das células do hospedeiro, com a participação do parasita e de componentes da superfície de células do

hospedeiro (GUERRA et al., 2010). Uma resposta inflamatória inicial eficiente contra o parasita pode ser influenciada pela ativação dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs – “pattern recognition receptors”) que são capazes de reconhecer padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs – “pathogen-associated molecular patterns”).

Uma das principais funções de PRRs é sinalizar para a célula apresentadora de antígeno, ativando vários fatores de transcrição que são capazes de desencadear a produção e liberação de determinadas citocinas e quimiocinas, os quais determinam a natureza da resposta imune adquirida direcionada contra o patógeno que estimulou o PRRs (MERCIER et al., 2012; TUON et al., 2012).

Um dos mais importantes PRRs são os receptores do tipo Toll (TLRs “Toll like receptos”), família de proteínas do sistema imune inato, conservadas e expressas em vários tipos de células que participam da ativação da resposta imune contra agentes infecciosos, constituindo-se em um dos primeiros sistemas de defesa contra a *Leishmania* spp. (BAZZOCCHI et al., 2005; TUON et al., 2008; TUON et al., 2012), podendo levar à produção de óxido nítrico (NO) e de espécies reativas de oxigênio (ROS) (KAVOOSI et al., 2010).

O reconhecimento do PAMP por um receptor TLR geralmente é associado a diversos fenômenos incluindo a fagocitose, a atividade microbicida dos fagossomos e a ativação de fatores de transcrição capazes de desencadear a produção de citocinas pró-inflamatória e anti-inflamatórias (SINGH et al., 2012; TUON et al., 2012). Assim, a avaliação destas citocinas é importante para determinar os efeitos da ativação dos TLRs durante a leishmaniose (FIGUEIREDO et al., 2013).

Um candidato ao PAMP para os TLRs é o lipofosfoglicano (LPG), glicolípido encontrado em maior quantidade na superfície de promastigotas de *Leishmania* (HANDMAN; BULLEN, 2002; MCCONVILLE et al., 1995). Em estudo realizado por De Veer et al. (2003) observou-se que, na interação do

LPG com os TLRs, somente o TLR-2 foi capaz de promover as reações intracelulares responsáveis pela produção de citocinas da resposta imune inata, além de aumentar a produção de IFN- γ , TNF- α (TUON et al., 2008), confirmando assim a importância do TLR-2 na leishmaniose.

Outros estudos descreveram o potencial papel efetor antiparasita do TLR-2 em modelos experimentais de leishmaniose (TUON et al., 2008; GUERRA et al., 2010; KAVOOSI et al., 2010) porém, os padrões de expressão deste receptor em cães têm sido pouco investigados (AMORIM et al., 2011; BAZZOCCHI et al., 2005).

Em modelo experimental, o aumento de TLR-2 foi detectado em baço de camundongos infectados com *L. chagasi*, na fase aguda da doença, estando correlacionado com maior parasitismo e altos níveis de citocinas e óxido nítrico (CEZÁRIO et al., 2011). Neste estudo, os autores citam que a maior expressão do TLR-2 no pico do parasitismo possa ter sido decorrente da modulação da expressão destes receptores pelo parasita e/ou citocinas (CEZÁRIO et al., 2011).

Evidências de que TLR-2 desempenha um papel importante durante a LVC e na compartimentalização da resposta imunitária também foi observado por Melo et al. (2014) em cérebro, baço e linfonodo de cães infectados, com regulação positiva do TLR-2.

Além deste papel, o TLR-2 induz, por meio do fator de transcrição, a transdução do sinal que pode levar a produção de NO (GATTO et al., 2015; KAVOOSI et al., 2010), um dos principais mecanismos efetores para a morte da *Leishmania*, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (BOGDAN, 2001; SISTO et al., 2001).

Em macrófagos ativados, o NO é produzido pela isoforma do tipo 2 da enzima óxido nítrico síntase (NOS2), também conhecida como óxido nítrico síntase induzível (iNOS), o qual resulta em maior produção de NO (WILKINS-RODRÍGUEZ et al., 2010).

Apesar da importância do NO na leishmaniose, sua medição direta ainda é um desafio devido à sua baixa concentração e tempo de vida curto (KIECHLE; MALINSKI, 1993). Portanto, métodos indiretos de medições de NO, como a expressão da enzima iNOS por imuno-histoquímica (SANCHES et al., 2014; ZAFRA et al., 2008) e por meio da RT-qPCR (AREVALO et al., 2002; KAIM et al., 2006) e estimativa dos níveis de nitrato/nitrito, têm sido utilizados.

Numerosas citocinas e produtos microbianos atuam muitas vezes em sinergia para estimular a ativação e expressão de iNOS (MACMICKING et al., 1997). Assim, a indução da iNOS pode ser regulada pela produção de citocinas como IFN- γ e TNF- α (SANTOS et al., 2011). Em modelo murino, a produção de NO é induzida ao nível da transcrição de várias citocinas, em particular, por IFN- γ , que atua de forma sinérgica com o TNF- α e alguns produtos bacterianos, tais como LPS, enquanto que o TGF- β , e IL-10 tem um efeito inibidor (BOGDAN et al., 2001; MACMICKING et al., 1997). Um perfil misto de expressão de iNOS, de TNF- α , de TGF- β e IL-10 tem sido observados em linfonodos de cães assintomáticos (MAIA; CAMPINO, 2012).

Porém, para escapar dos efeitos microbicidas como os do óxido nítrico, as leishmânias utilizam alguns mecanismos para garantir sua sobrevivência nas células do hospedeiro. Um aumento da atividade da arginase tem sido detectado em sítios da infecção na leishmaniose visceral humana (ABEBE et al., 2013). Como esta enzima compete com a iNOS na utilização de L-arginina como substrato, sua presença pode prejudicar a produção de NO.

A pele é a primeira barreira do sistema imunológico e o primeiro local de contato do cão com a *Leishmania* durante o repasto sanguíneo de vetor infectado (MAIA; CAMPINO, 2012). Assim, a resposta imune contra a infecção por *Leishmania* é iniciada na pele, no local da inoculação do parasito, por células fagocitárias como as células dendríticas (CDs ou células de Langerhans) e macrófagos (RITTIG; BOGDAN, 2000) e pelos linfócitos T (MAIA; CAMPINO, 2012). A predominância de infiltrado de macrófagos em

biopsias de pele de cães infectados com LV tem sido associada à maior carga parasitária durante a avaliação histopatológica, seguida pela presença de linfócitos e plasmócitos (REIS et al., 2009). Os macrófagos atuam como células apresentadoras de antígenos e células produtoras de citocinas, além de serem células alvo na multiplicação do parasito (FREITAS; PINHEIRO, 2010).

A apresentação de antígenos feita pelos macrófagos aos linfócitos TCD4⁺ estimula a produção de interleucinas, os quais podem desenvolver o perfil Th1, com predominância de linfócitos T auxiliares do tipo 1 ("T helper 1") ou Th2, com predominância de linfócitos tipo 2 ("T helper 2") (ALEXANDER; BRYSON, 2005).

Na LVC, a indução da resposta imune do tipo Th1 tem sido relacionada aos cães assintomáticos e oligossintomáticos, sendo mediada por citocinas pró-inflamatórias como IL-2, IFN- γ e TNF- α e resultando em imunidade celular protetora específica, associada a baixos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* (PINELLI et al., 1994; REIS et al., 2006).

Já nos cães sintomáticos, o perfil Th2 tem sido observado, com indução da síntese de citocinas como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e TGF- β , ocorrendo assim à proliferação de linfócitos B e produção de anticorpos (BARBIÉRI, 2006; MARTÍNEZ-MORENO et al., 1995; REIS et al., 2009; SANTOS-GOMES et al., 2002; STRAUSS-AYALI et al., 2005).

Um equilíbrio na produção de citocinas do tipo Th1 e Th2 têm sido sugerido na LVC, com ligeira tendência para um ou outro perfil de resposta (CHAMIZO et al., 2001; 2005; LAGE et al., 2007; PINELLI et al., 1994, 1999; SANTOS-GOMES et al., 2002). O predomínio nos níveis de IL-10 relacionado com a progressão da doença e aumento da carga parasitária sugere um papel imunomodulador da resposta Th1 para esta citocina, além de inibir a atividade microbicida dos macrófagos infectados (LAGE et al., 2007). Porém, estudo realizado por Menezes-Souza et al. (2011) mostra que, em cães assintomáticos ou em cães com baixo parasitismo na pele, um misto do perfil de resposta

imune inflamatória e resposta reguladora é importante tanto para a manutenção do estado clínico dos cães, quanto para a replicação do parasita em níveis baixos. Além dos linfócitos Th2, têm sido sugerido que os linfócitos T regulatórios (Treg) tem um papel importante na produção de citocinas supressoras como TGF- β e IL-10 (CAMPANELLI et al., 2006; GANTT et al., 2003; ZHU; PAUL, 2010), participando na modulação da resposta imune. Um aumento na produção de IL-10 por células Treg foi observado em cães infectados por *Leishmania* spp. ainda que não tenha sido associado com a carga parasitária (SILVA et al., 2014).

A avaliação do perfil de resposta Th1 e Th2 em diferentes tecidos e órgãos de cães infectados é importante para auxiliar no entendimento dos mecanismos do sistema imune induzidos pela infecção (MAIA; CAMPINO et al., 2012). Ao avaliar o perfil de citocinas por qPCR em linfonodos de cães com leishmaniose, Alves et al. (2009) observaram maiores níveis de IFN- γ e TNF- α além de menor carga parasitária no grupo de cães assintomáticos, sendo que os cães sintomáticos tiveram maior parasitismo e uma maior expressão de citocinas reguladoras como IL-10 e TGF- β . Menezes-Souza et al. (2011) observaram que cães naturalmente infectados com *L. chagasi* e assintomáticos expressaram maior nível de IFN- γ e de TNF- α na pele, enquanto que os cães com alto parasitismo na pele expressaram maior nível de IL-10 e TGF- β , sugerindo que o aumento dessas citocinas imunoreguladoras pode levar à manutenção da multiplicação do parasita.

A progressão e a gravidade da LVC dependem da complexa interação entre o cão e o protozoário. Em última instância, depende da capacidade dos macrófagos em destruírem a *Leishmania* de forma efetiva (SANTOS-GOMES et al., 2002). Portanto, os mecanismos envolvidos na resposta imune da pele de cães acometidos por LV, porta de entrada e via de eliminação do parasita tornam-se alvos importantes para o melhor entendimento desta doença.

Assim, o objetivo do presente estudo foi determinar a expressão gênica de componentes da resposta imune como o receptor TLR-2 e a enzima iNOS, além da citocina pró-inflamatória TNF- α e das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β e sua relação com a carga parasitária da pele de cães acometidos por LV.

REFERÊNCIAS

- ABEBE, T.; TAKELE, Y.; WELDEGEBREAL, T.; CLOK, T.; CLOSS, E.; CORSET, C.; HAILU, A.; HAILU, W.; SISAY, Y.; CORWARE, K.; CORSET, M.; MODOLELL, M.; MUNDER, M.; TACCHINI-COTTIER, F.; MULLER, I.; KROPF, P. Arginase activity – marker of disease status in patients with visceral leishmaniasis in Ethiopia. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.3, p.E2134, 2013.
- ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper(h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunology Letters**, v.99, p.17-23, 2005.
- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v.57, p.1-88, 2004.
- 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- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.128, p.349-358, 2009.
- AMORIM, I.F.G.; SILVA, S.M.; FIGUEIREDO, M.M.; MOURA, E.P.; CASTRO, R.S.; LIMA, T.K.S.; GONTIJO, N.F.; MICHALICK, M.S.M.; GOLLOB, K.J.; TAFURI, W.L. Toll receptors type-2 and CR3 expression of canine monocytes and its correlation with immunohistochemistry and xenodiagnosis in visceral leishmaniasis. **Plos One**, v.6, n.11, p.E27679, 2011.
- AREVALO, I.; WARD, B.; MATLASHEWSKI, G. Detection of iNOS gene expression in cutaneous leishmaniasis biopsy tissue. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.121, p.145-147, 2002.
- BARBIERI, C.L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.28, p.329-337, 2006.

BANETH, G.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALLEG0, L.; BOURDEAU, P.; FERRE, L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v.4, n.7, p.324-330, 2008.

BAZZOCHI, C.; MORTARINO, M.; COMAZZI, S.; BANDI, C.; FRANCESCHI, A.; GENCHI, C. Expression and function of Toll-like receptor 2 in canine blood phagocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.104, p.15-19, 2005.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v.2, n.10, p.907-916, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília (DF): MS, 2006. p.122.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema Nacional de Vigilância em Saúde Relatório de Situação Rio Grande do Sul**. Brasília (DF): MS, 2011a. p.16.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Esclarecimentos sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde, **NOTA TÉCNICA** nº/2011 – UVR/CGDT/DEVEP/SVS/MS, 2011b.

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

CEZÁRIO, G.A.G.; OLIVEIRA, L.R.C.; PERESI, E.; NICOLETE, V.C.; POLETTINI, J.; LIMA, C.R.G.; GATTO, M.; CALVI, S.A. Analysis of the expression of toll-like receptors 2 and 4 and cytokine production during

experimental *Leishmania chagasi* infection. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.106, p.573-583, 2011.

CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.103, n.1-2, p.67-75, 2005.

CHAMIZO, C.; RUBIO, J.M.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of multiple cytokines in canine peripheral blood mononuclear cells by a single tube RT-PCR. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.83, p.191-202, 2001.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R.D.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Record**, v.141, n.21, p.539-543, 1997.

COSTA, C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, p.232-242, 2011.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R.J.; GARCEZ, L.M.; SHAW, J.J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **The Journal of Infectious Diseases**, v.186, p.1314-1320, 2002.

CUNHA, A.M.; CHAGAS, E. Leishmaniose Visceral Americana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.32, p.321-389, 1937.

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

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

DESJEUX, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. **Clinics in Dermatology**, v.14, n.5, p.417-423, 1996.

DE VEER, M.J.; CURTIS, J.M.; BALDWIN, T.M.; DIDONATO, J.A.; SEXTON, A.; MCCONVILLE, M.J.; HANDMAN, E.; SCHOFIELD, L. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. **European Journal of Immunology**, v.33, n.10, p.2822-2831, 2003.

FIGUEIREDO, M.M.; AMORIM, I.F.G.; PINTO, A.J.W.; BARBOSA, V.S.; PINHEIRO, L.J.; DEOTI, B.; FARIA, A.M.C.; TAFURI, W.L. Expression of Toll-like receptors 2 and 9 in cells of dog jejunum and colon naturally infected with *Leishmania infantum*. **BMC Immunology**, v.14, p.14-22, 2013.

FREITAS, J.C.C.; PINHEIRO, D.C.S.N. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania* spp. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.105, p.11-20, 2010.

GATTO, M.; ABREU, M.M.; TASCA, K.I.; GOLIM, M.A.; SILVA, L.D.M.; SIMÃO, J.C.; CASTELO, C.M.; FORTALEZA, B.; SOARES, A.M.V.C.; CALVI, S.A. The involvement of TLR2 and TLR4 in cytokine and nitric oxide production in visceral leishmaniasis patients before and after treatment with anti-leishmanial drugs. **Plos One**, v.10, n.2, p.E0117977, 2015.

GANTT, K.R.; SCHULTZ-CHERRY, S.; RODRIGUEZ, N.; JERONIMO, S.M.B.; NASCIMENTO, E.T.; GOLDMAN, T.L.; RECKER, T.J.; MILLER, M.A.; WILSON, M.E. Activation of TGF- β by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. **The Journal of Immunology**, v.170, p.2613-2620, 2003.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.7, n.3, p.338-349, 2004.

GRIMALDI, J.R.G.; TEVA, A.; FERREIRA, A.L.; SANTOS, C.B.; PINTO, I.S.; AZEVEDO, C.T.; FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.106, n.1, p.54-59, 2012.

GUERRA, C.S.; SILVA, R.M.M.; CARVALHO, L.O.P.; CALABRESE, K.S.; BOZZA, P.T.; CÔRTE-REAL, S. Histopathological analysis of initial cellular response in TLR-2 deficient mice experimentally infected by *Leishmania (L.) amazonensis*. **International Journal of Experimental Pathology**, v.91, p.451-459, 2010.

HANDMAN, E.; BULLEN, D.V.R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends Parasitology**, v.18, p.332-334, 2002.

HARHAY, M.O.; OLLIARO, P.L.; COSTA, D.L.; COSTA, C.H.N. Review: Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v.27, n.9, p.403-409, 2011.

KAIM, U.; MORITZ, A.; FAILING, K.; BAUMGARTNER, W. The regression of a canine Langerhans cell tumour is associated with increased expression of IL-2, TNF- α , IFN- γ and iNOS mRNA. **Immunology**, v.118, p.472-482, 2006.

KAVOOSI, G.; ARDESTANI, S.K.; KARIMINIA, A.; ALIMOHAMMADIANET, M.H. *Leishmania major* lipophosphoglycan: discrepancy in toll-like receptor signaling. **Experimental Parasitology**, v.124, p.214-218, 2010.

KIECHLE, F.L.; MALINSKI, T. Nitric oxide. Biochemistry, pathophysiology, and detection. **American Journal of Clinical Pathology**, v.100, n.5, p.567-575, 1993.

KILLICK-KENDRICK, R. The life cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Annual Parasitology Human Complete**, v.65, p.37-42, 1990.

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

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.100, p.811-827, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987, v.1, p.1-120.

LAURENTI, M.D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **Bepa**, v.6, p.13-23, 2009.

LAURENTI, M.D.; ROSSI, C.N.; MATTA, V.L.R.; TOMOKANE, T.Y.; CORBETT, C.E.P.; SECUNDINO, N.F.C.; PIMENTA, P.F.P.; MARCONDES, M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v.196, p.296-300, 2013.

MACMICKING, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**, v.15, p.323-350, 1997.

MAIA, C; CAMPINO, L. Cytokine and phenotypic cell profiles of *Leishmania infantum* infection in the dog. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p.541571.

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

MAURÍCIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v.16, n.5, p.188-189, 2000.

MCCONVILLE, M.J.; SCHNUR, L.F.; JAFFE, C.; SCHNEIDER, P. Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter and intra-specific polymorphism in Old World species. **Biochemical Journal**, v.310, p.807-818, 1995.

MERCIER, E.; PETERS, I.R.; DAY, M.J.; CLERCX, C.; PEETERS, D. Toll-and NOD-like receptor mRNA expression in canine sino-nasal aspergillosis and idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.145, p.618-624, 2012.

MELO, G.D.; SILVA, J.E.S.; GRANO, F.G.; HOMEM, C.G.; MACHADO, G.F. Compartmentalized gene expression of toll-like receptors 2, 4 and 9 in the brain and peripheral lymphoid organs during canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.36, p.726-731, 2014.

MENDES, W.S.; TROVÃO, J.R.; SILVA, A.A.M. Dinâmica da ocupação do espaço na cidade de São Luís e a leishmaniose visceral. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.16, n.3, p.872, 2000.

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

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, N.G.; SARAIVA, N.G. Advances in leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v.366, p.1561-1577, 2005.

PANARO, M.A.; ACQUAFREDDA, A.; LISI, S.; LOFRUMENTO, D.D.; MITOLO, V.; SISTO, M.; FASANELLA, A.; TROTTA, T.; BERTANI, F.; CONSENTI, B.; BRANDIONISIO, O. Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.24, p.187-195, 2001.

PAPADOGIANNAKIS, E.I.; KOUTINAS, A.F. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.163, p.94-102, 2015.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. Diagnóstico molecular das leishmanioses: contribuição ao Programa de Vigilância e Controle da LVA no Estado de São Paulo. **Bepa**, v.6, p.4-13, 2009.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v.62, n.1, p.229-235, 1994.

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

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W.L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.28, n.1-3, p.87-95, 2009.

REIS, A.B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A.M.; MARQUES, M.J.; GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GUERRA, L.L.; ANDRADE, R.A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in

brazilian dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.112, p.102-116, 2006.

REITHINGER, R.; QUINNELL, R.J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C.R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.7, p.2352-2356, 2002.

RITTIG, M.G.; BOGDAN, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitology Today**, v.16, n.7, p.292-297, 2000.

SANCHES, F.P.; TOMOKANE, T.Y.; DA MATTA, V.L.R.; MARCONDES, M.; CORBETT, C.E.P.; LAURENTI, M.D. Expression of inducible nitric oxide synthase in macrophages inversely correlates with parasitism of lymphoid tissues in dogs with visceral leishmaniasis. **Acta Veterinaria Scandinavica**, p.56-57, 2014.

SANTOS, F.R.; VIEIRA, P.M.A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; REIS, A.B.; MALAQUIAS, L.C.C. Qualitative and quantitative immunohistochemical evaluation of iNOS expression in the spleen of dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Parasitology Research**, v.108, n.6 p.1397-1403, 2011.

SANTOS-GOMES, G.M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMÃO, P.; SILVEIRA, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*.

Veterinary Immunology and Immunopathology, v.88, p.21-30, 2002.

SILVA, K.L.O.; ANDRADE, M.M.C.; MELO, L.M.; PEROSSO, J.; VASCONCELOS, R.O.; MURANI, D.P.; LIMA, V.M.F. CD4+FOXP3+ cells produce IL-10 in the spleens of dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.202, p.313-318, 2014.

SINGH R.K.; SRIVASTAVA, A.; SINGH, N. Toll-like receptor signaling: A perspective to develop vaccine against leishmaniasis. **Microbiological Research**, v.167, p.445-451, 2012.

SISTO, M.; BRANDONISIO, O.; PANARO, M.A.; ACQUAFREDDA, A.; LEOGRANDE, D.; FASANELLA, A.; TROTTA, T.; FUMAROLA, L.; MITOLO, V. Inducible nitric oxide synthase expression in *Leishmania*- infected dog macrophages. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.24, p.247-254, 2001.

SOLANO-GALEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.560-563, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G., FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.165, p.1-18, 2009.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G.; SHOR, S.; OKANO, F.; JAFFE, C.L. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. **International Journal for Parasitology**, v.35, p.63-73, 2005.

TUON, F.F.; FERNANDES, E.R.; DUARTE, M.I.S.; AMATO, V.S. Expression of TLR2 and TLR4 in lesions of patients with tegumentary American leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.54, p.159-63, 2012.

TUON, F.F.; AMATO, V.S.; BACHA, H.A.; ALMUSAWI, T.; DUARTE, M.I.; NETO, V.A. Toll-Like Receptors and leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v.76, n.3, p.866-872, 2008.

WILKINS-RODRÍGUEZ, A.A.; ESCALONA-MONTAÑO, A.R.; AGUIRRE-GARCÍA, M.; BECKER, I.; GUTIÉRREZ-KOBEH, L. Regulation of the expression of nitric oxide synthase by *Leishmania mexicana* amastigotes in murine dendritic cells. **Experimental Parasitology**, v.126, p.426-434, 2010.

ZAFRA, R.; JABER, J.R.; PÉREZ-ÉCIJA, R.A.; BARRAGÁN, A.; MARTÍNEZ-MORENO, A.; PÉREZ, J. High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.123, p.353-359, 2008.

ZHU, J.; PAUL, W.E. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. **Cell Research**, v.20, p.4-12, 2010.

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2 - RELAÇÃO DA EXPRESSÃO DO TLR-2, DA ENZIMA INOS, DAS CITOCINAS IL-10, TNF- α E TGF- β COM A CARGA PARASITÁRIA DA PELE DE CÃES NATURALMENTE ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO - A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose de evolução crônica que tem o cão como o principal reservatório urbano. A progressão da leishmaniose visceral no cão está relacionada ao perfil de sua resposta imune, podendo apresentar imunidade celular efetiva, com predominância de citocinas Th1 como o TNF- α , ou resposta imune humoral exacerbada, com predominância de citocinas Th2, como a IL-10 e o TGF- β . O TLR-2 é um dos receptores importantes na resposta imune por participar na indução da produção de citocinas e consequente ativação da enzima iNOS. Para entender como a pele pode se tornar um microambiente permissivo à multiplicação do parasita, a expressão dos genes que codificam o TLR-2, a enzima iNOS e as citocinas IL-10, TNF- α e TGF- β foi avaliada, por RT-qPCR, na pele de 29 cães acometidos por LV e de oito cães não infectados. A expressão de cada gene foi relacionada à carga parasitária avaliada por qPCR. Houve maior expressão relativa de todos os genes avaliados nos cães infectados em relação aos cães controles, sendo observado diferença estatisticamente significativa entre o aumento da carga parasitária e a expressão da IL-10 ($p=0,007$), do TNF- α ($p=0,031$) e TLR-2 ($p=0,0003$). Observou-se correlação positiva entre o aumento da carga parasitária e a expressão do receptor TLR-2 ($r=0,625$) bem como para as citocinas IL-10 ($r=0,489$) e TNF- α ($r=0,401$). A pele de cães naturalmente acometidos por LV apresenta perfil misto de resposta imune Th1/Th2, com aumento da expressão do TLR-2, da IL-10 e do TNF- α , conferindo a estes componentes inflamatórios da pele um papel importante na patogênese da LVC.

Palavras-chave: carga parasitária, expressão gênica, leishmaniose visceral canina, PCR em tempo real, receptor do tipo Toll 2, resposta imune

RELATIONSHIP BETWEEN THE EXPRESSION OF TLR-2, iNOS ENZYME, IL-10, TNF- α AND TGF- β CYTOKINES AND THE SKIN PARASITE LOAD OF DOGS NATURALLY AFFECTED BY VISCERAL LEISHMANIASIS

SUMMARY – Visceral leishmaniasis (VL) is a chronic zoonotic disease that has the dog as its main urban reservoir. Progression of visceral leishmaniasis in dogs is related to the profile of their immune response that can be an effective cellular immunity with predominance of Th1 cytokines such as TNF- α , or an exacerbated humoral immune response, mainly with Th2 cytokines such as IL-10 and TGF- β . The TLR-2 is an important receptor of the adaptive immune response involved in the induction of cytokine production and subsequent activation of the iNOS enzyme. To understand how the skin may become a permissive microenvironment for the multiplication of this parasite, the expression of genes encoding to TLR-2, to the iNOS enzyme and to the IL-10, TNF- α and TGF- β cytokines was evaluated by RT-qPCR in the skin from 29 VL affected dogs and eight uninfected dogs. The expression of each gene was related to its parasitic load measured by qPCR. There was a higher relative expression of all evaluated genes in affected dogs compared to the control dogs. Statistically significant difference between the increase of the parasitic load and IL-10 ($p = 0.007$), TNF- α ($p = 0.031$) and TLR-2 ($p = 0.0003$). There was a positive correlation between the parasite load increase and the expression of TLR-2 receptor ($r=0.625$) as well as IL-10 ($r=0.489$) and TNF- α ($r=0.401$) cytokines. The skin of dogs naturally affected by VL presents a mixed Th1/Th2 immune response profile, with an increased expression of TLR-2, IL-10 and TNF- α , giving these inflammatory components an important role in the pathogenesis of CVL.

Key-words: canine visceral leishmaniasis, immune response, gene expression, Toll like receptor 2, parasite load, real-time PCR

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose causada por protozoário digenético pertencente à ordem Kinetoplastida, família Tripanosomatidae, gênero *Leishmania* o qual tem o seu ciclo de vida alternado entre hospedeiros vertebrados e invertebrados (DESJEUX, 2004; LAINSON; SHAW, 1987).

No Brasil, os principais vetores da *Leishmania infantum chagasi*, protozoário que causa a LV, são os flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* (LAINSON; RANGEL, 2005).

Devido à alta prevalência da leishmaniose visceral canina (LVC), associada ao processo de urbanização e à incidência de LV em humanos (HARHAY et al., 2011), o cão doméstico (*Canis familiaris*) tem sido considerado o principal reservatório urbano, sendo fundamental para a manutenção do ciclo do parasito neste cenário (ALVAR et al., 2004).

A progressão e gravidade da doença na LVC estão relacionadas a diversos fatores como a infectividade do parasita e fatores imunogenéticos do hospedeiro (PAPADOGIANNAKIS; KOUTINAS, 2015). Cães que não desenvolvem a doença clínica apresentam imunidade celular efetiva, com perfil Th1 mediado pelas citocinas pró-inflamatórias como a IL-2, o IFN- γ e o TNF- α , enquanto que cães doentes apresentam resposta imune humoral exacerbada com proliferação de linfócitos B e produção de anticorpos e perfil Th2 predominante, com citocinas como a IL-10 e o TGF- β (ALVES et al., 2009; BARBIÉRI, 2006; CARRILLO et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2013; MARTÍNEZ-MORENO et al., 1995; MENEZES-SOUZA et al., 2011; REIS et al., 2006; REIS et al., 2009; SANTOS-GOMES et al., 2002; STRAUSS-AYALI et al., 2005).

Uma resposta inflamatória inicial eficiente contra o parasita pode ser influenciada pela ativação de receptores de reconhecimento padrão (PRRs -

“pattern recognition receptors”). Um dos mais importantes PRRs são os receptores do tipo Toll (TLRs – “Toll like receptors”), proteínas do sistema imune inato que são reguladores da resposta imune contra vários patógenos e se constituem num dos primeiros sistemas de defesa contra a *Leishmania* spp. (BAZZOCCHI et al., 2005; TUON et al., 2008; TUON et al., 2012).

Os TLRs são capazes de reconhecer padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs – “pathogen-associated molecular patterns”), ativando fatores de transcrição capazes de desencadear a produção de citocinas e quimiocinas (TUON et al., 2012). O lipofosfoglicano (LPG), presente na superfície de promastigotas de *Leishmania* spp. (MCCONVILLE et al., 1995), constitui-se em PAMP para o TLR-2 (DE VEER et al., 2003), resultando em reações intracelulares responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (BECKER et al., 2003; SINGH et al., 2012; TUON et al., 2008).

Alguns autores descreveram o potencial papel efetor anti-*Leishmania* do TLR-2 em modelos experimentais (CEZÁRIO et al., 2011; GUERRA et al., 2010; KAVOOSI et al., 2010; TUON et al., 2008), bem como os padrões de expressão deste receptor em cães naturalmente acometidos por LV (AMORIM et al., 2011; ESTEVE et al., 2015; FIGUEIREDO et al., 2013; MELO et al., 2014). Uma maior expressão do TLR-2 foi relacionada à menor carga parasitária na pele de cães naturalmente infectados bem como à ausência de infectividade ao vetor (AMORIM et al., 2011).

O TLR-2 induz, por meio do fator de transcrição, a transdução do sinal que pode levar à produção de óxido nítrico (NO) (GATTO et al., 2015; KAVOOSI et al., 2010), um dos principais mecanismos efetores para a morte da *Leishmania* (BOGDAN, 2001; SISTO et al., 2001; ZAFRA et al., 2008). Em macrófagos ativados, o NO é produzido pela enzima óxido nítrico síntase induzível (iNOS) (WILKINS-RODRÍGUEZ et al., 2010). A indução da iNOS pode ser regulada pela produção de citocinas como o IFN- γ e o TNF- α .

(MACMICKING et al., 1997; PANARO et al., 2001; SANTOS et al., 2011; SISTO et al., 2001), e por alguns produtos bacterianos como lipopolissacarídeos (LPS) (SISTO et al., 2001), enquanto que o TGF- β e IL-10 parecem ter efeito inibidor para esta enzima (BOGDAN et al., 2001; MACMICKING et al., 1997).

Tem sido demonstrado que a IL-10 parece ser capaz de aumentar a expressão de arginase (CORRALIZA et al., 1995; MODOLELL et al., 1995). Além disso, aumento da atividade da arginase foi detectado em sítios da infecção na leishmaniose visceral humana (ABEBE et al., 2013), prejudicando a produção de NO pela limitação do substrato L-arginina e, conseqüentemente, favorecendo a replicação da *Leishmania* spp.

Um perfil imunorregulador predominante caracterizado por aumento da expressão de IL10 e TGF- β foi observado na pele de cães com alto parasitismo, tendo sido correlacionado com o aumento da carga parasitária (MENEZES-SOUZA et al., 2011).

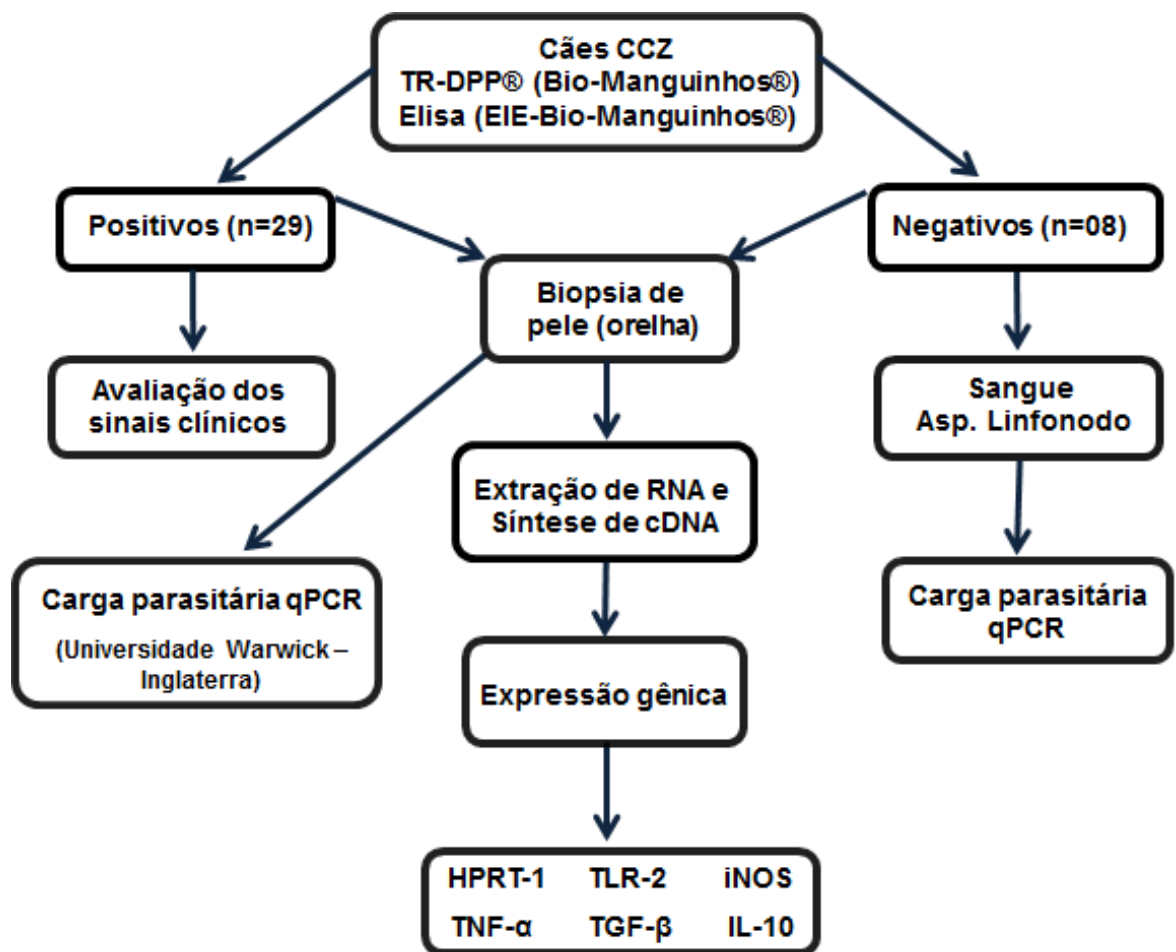
A IL-10, principal citocina imunossupressora, que além de inibir da atividade microbicida dos macrófagos infectados, inibe a ativação da iNOS (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997), parece contribuir significativamente para a manutenção na LV estando relacionada à progressão da doença e ao aumento da carga parasitária, sugerindo exercer papel imunomodulador da resposta de Th1 (LAGE et al., 2007).

Além das células Th2, as células T regulatórias (Treg) têm sido relacionadas à produção das citocinas TGF- β e IL-10 (ALEXANDER; BRYSON, 2005; CAMPANELLI et al., 2006; GANTT et al., 2003; ZHU; PAUL, 2010), participando na modulação da resposta imunitária, tendo sido observado aumento na produção de IL-10 por células Treg em cães infectados por *Leishmania* spp. (SILVA et al., 2014).

Considerando a importância da pele na transmissão da *Leishmania* spp. e que o entendimento dos mecanismos imunológicos que tornam a pele um microambiente permissivo à multiplicação do parasita o objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão gênica dos componentes da resposta imune TLR-2, iNOS, TNF- α , IL-10 e TGF- β em amostras de pele de cães naturalmente acometidos por LV, e relacioná-los à carga parasitária da pele destes cães.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento experimental



Esta pesquisa tem aprovação do Comitê de Ética para uso Animal (FOA–FMVZ, processo 01984-2012).

Área de estudo

O município de Araçatuba, área endêmica para leishmaniose visceral desde 1999, está localizado na região noroeste do estado de São Paulo (Latitude: 21°12'41" Sul, Longitude: 50°25'34" Oeste). Inquéritos soro-epidemiológicos censitários são realizados pelo Controle de Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde anualmente e, os cães com sorologia positiva ou que apresentam formas amastigotas em biopsia de linfonodo, são recolhidos e submetidos à eutanásia, após consentimento do proprietário, de acordo com recomendações do Ministério da Saúde para o controle da LV (BRASIL, 2006).

Amostras de cães

Os cães utilizados no estudo foram àqueles provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Araçatuba, sendo divididos em dois grupos: grupo de cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp., composto de 29 animais com resultados sorológicos (TR-DPP® e ELISA) e qPCR (pele) positivos para LV e oito (08) cães com resultados sorológicos e qPCR (sangue e aspirados de linfonodo) negativos para LV. Os cães positivos tinham idade estimada entre 01 e 10 anos, sendo 10 machos e 19 fêmeas, de diferentes raças, embora a maioria fosse sem raça definida (SRD).

Avaliação da carga parasitária por qPCR

Para confirmar a ausência de infecção, os cães sorologicamente negativos para LVC (controles negativos) foram também avaliados para a

presença de kDNA de *Leishmania* spp., em amostras de sangue e aspirado de linfonodo, por meio da PCR em tempo real (qPCR), utilizando-se os oligonucleotídeos descritos por Rodgers et al. (1990). Para tal, o DNA foi extraído com kit comercial QIAamp DNA mini kit (Qiagen®), segundo as instruções do fabricante. Para as amostras de sangue, o DNA foi eluído em volume final de 50 µL e, para as amostras de linfonodo, em 40 µL. As amostras foram avaliadas por qPCR, em duplicata, segundo Oliveira et al. (2015), utilizando-se 40 ng de DNA. Para obtenção dos valores de eficiência da reação, do coeficiente de determinação (r^2) e do coeficiente angular (“slope”), foram utilizadas diluições seriadas, na base 10, de DNA de *Leishmania chagasi* (L579 MHOM/BR/1974/PP75).

A presença de infecção nos cães sorologicamente positivos para LVC foi confirmada na pele, sendo o DNA extraído e amplificado no Laboratório de Ecologia e Epidemiologia da “School of Life Sciences”, da University of Warwick, Inglaterra, com o kit Ear Tissue-ET (Chemagen cmg-1011, Perkin Elmer®), de acordo com as instruções do fabricante.

Para a amplificação da região conservada de kDNA da *Leishmania* spp. de 120 pares de bases, foram utilizados 900nM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores Leish1 (AACTTTTCTggTCCTCCgggTAg) e Leish2 (ACCCCCAgTTTTCCgCC), descritos por Francino et al. (2006) e modificado por Calvo-Bado (não publicado), e 250nM da sonda 6FAM 5' AAAAATgggTgCAgAAACCCCgTTC-3' –BBQ, em volume final de 15 µL contendo 2X TaqMan master mix (Applied Biosystems®). As condições da reação foram: 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, em termociclador 7500 “Fast Real-Time PCR System” (Applied Biosystems®). A quantificação da carga parasitária foi realizada comparando-se os valores dos limiares de fase exponencial (Ct - “cycle threshold”) das amostras, com os obtidos da curva padrão construídos a partir da diluição seriada, na base 10, de formas promastigotas de *Leishmania infantum* (ITAMP-263 DD8), de 10^5 a 10^{-2} parasitas/mL. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata.

Para avaliação da relação dos componentes da resposta imune da pele e a carga parasitária, os cães foram divididos em grupos de acordo com a carga parasitária, definidos segundo a análise dos quartis: Grupo 1 composto de cães não infectados por *Leishmania* spp. (controle) e sem carga parasitária (n=8); Grupo 2 composto de cães com CP entre $2,19 \times 10^2$ e $2,27 \times 10^5$ parasitas/mL (n=11) e Grupo 3 composto de cães com CP $> 2,27 \times 10^5$ parasitas/mL (n=18).

Expressão gênica por qPCR

As amostras de pele armazenadas a -80°C em RNAlater-ICE (AM7030 Ambion – Life Technologies®/USA) foram colocadas à temperatura ambiente, e a extração de RNA foi realizada utilizando-se o kit comercial RNeasy Mini Kit (QIAGEN® – Cat. N°. 74104), seguindo-se as especificações do fabricante. O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® (ND-100), e foi armazenado a -80°C , até o momento da transcrição reversa.

Para a produção de cDNA, 200 ng de RNA de cada amostra foi submetido à transcrição reversa utilizando-se o kit comercial QuantiTect Reverse Transcription (205311-QIAGEN®, Hilden/Alemanha), de acordo com as especificações do fabricante.

Para análise da expressão dos genes que codificam TLR-2, iNOS, IL-10, TNF- α , TGF- β , bem como do gene de referência HPRT-1 (“hipoxanthine phosphoribosyltransferase 1”), os oligonucleotídeos iniciadores para a espécie canina foram selecionados a partir da literatura científica (Tabela 1).

As amostras foram avaliadas em duplicatas, por qPCR, utilizando-se SsoFast™ EvaGreen Supermix (Bio-Rad Laboratories®-CA/USA), 320 nM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1 μL de cDNA, em volume total de 25 μL . As amostras foram incubadas a 95°C por 30 segundos, seguindo-se por 45 ciclos de 95°C por 5 segundos e 60°C por 10 segundos, momento onde os dados de

fluorescência foram coletados, seguido pela curva de dissociação de 65°C a 95°C, com aumento de 0,5°C, por 10 segundos.

Diluições seriadas de pool de cDNA de ambos os grupos (cães infectados e controle) foram utilizadas para obtenção dos valores de eficiência da reação, do coeficiente de determinação (r^2) e do coeficiente angular ("Slope") para cada uma dos gene avaliados.

A quantificação da expressão dos genes de interesse (TLR-2, iNOS, IL-10, TNF- α , TGF- β) foi avaliada pelo método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK e SCHMITTGEM, 2001), usando-se como gene de referência o HPRT-1 para normalização dos dados. Os resultados foram apresentados como a expressão gênica relativa.

Tabela 1- Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para avaliação da expressão dos genes de interesse.

Gene	Sequência de nucleotídeos (5' → 3')	Nº acesso GenBank	Tamanho do produto (pb)	Eficiência da reação %	r^2	Slope	Referência
HPRT-1	F - CACTGGGAAAACAATGCAGA	AY283372	123	105,5	0,986	-3,191	Peters et al., 2007
	R - ACAAAGTCAGGTTTATAGCCAACA						
TLR-2	F - TCGAGAAGAGCCACAAAACC	NM_001005264.2	91	108,8	0,981	-3,127	Mercier et al., 2012
	R - CGAAAATGGGAGAAGTCCAG						
iNOS	F - AGACACACTTCACCACAAGG	AF077821	285	107	0,848	-3,165	Kaim et al., 2006
	R - TGCTTGGTGCGAAGATGAGC						
IL-10	F- CGACCCAGACATCAAGAACC	U33843	101	104,9	0,986	-3,209	Peters et al., 2005
	R - CACAGGGAAGAAATCGGTGA						
TGF-β	F - CTGGAGTCGTGAGGCAGTG	L34956	96	103	0,997	-3,253	Peters et al., 2005
	R - GCAGTGTTATCTTTGCTGTCA						
TNF-α	F - ACCCATGTGCTCCTCACC	Z70046	87	100,7	0,946	-3,305	Melo et al., 2013
	R - AGGGCTCTTGATGGCAGAGA						

A expressão dos genes TGF- β , IL-10, TNF- α e TLR-2 foi avaliada nos 29 cães e a expressão da enzima iNOS foi avaliada em 24 cães infectados, além dos oito cães controles (não infectados).

Análise estatística

O valor médio de Ct para cada gene avaliado foi convertido para o número relativo de quantas vezes foi mais ou menos expresso pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A diferença das médias do $-\Delta Ct$ entre cães controle e cães infectados foi avaliada pelo teste t, com intervalo de confiança de 95%. Um modelo linear ajustado foi realizado para avaliar a expressão dos genes em função da carga parasitária bem como em função dos grupos (1, 2 e 3) definidos segundo a distribuição da carga parasitária nos quartis. Valores obtidos da equação $-\Delta Ct$ foram utilizados para análise estatística da expressão dos genes em função dos grupos (1, 2 e 3) utilizando o teste Anova e teste de Tukey. A correlação entre a expressão gênica dos mediadores alvos e a carga parasitária foi avaliada pelo teste de Pearson.

RESULTADOS

Todos os cães positivos foram classificados como doentes em estágio II (SOLANO-GALLEGO et al., 2009) por apresentarem sinais clínicos compatíveis com LVC. Os sinais clínicos aparentes mais frequentemente observados foram: onicogribose (n=25); seguido por alterações dermatológicas (n=24) como dermatites, alopecia, hiperqueratose e lesões ulceradas; linfadenomegalia (n=22); alterações oftalmológicas (n=18) como conjuntivite, ceratoconjuntivite e uveíte; e caquexia (n=3). Dos cães positivos avaliados (n=29), 50% apresentavam quatro sinais clínicos, 21% apresentaram três sinais clínicos; 16% apresentaram dois sinais clínicos, 10% apresentaram cinco sinais clínicos e 3% apresentaram um sinal clínico sugestivo da LVC.

Relação entre a carga parasitária e a expressão gênica de TLR-2, iNOS, IL-10, TNF- α e TGF- β

A expressão gênica relativa do TLR-2, iNOS, IL-10, TNF- α e TGF- β foi maior na pele dos cães infectados por LV quando comparada à expressão gênica destes componentes nos cães não infectados.

Resultados estatisticamente significativos foram observados para a expressão gênica do TLR-2 ($p=0,001$) que foi 2,55 vezes maior nos cães infectados, e para o TNF- α ($p=0,043$) que se apresentou 1,45 vezes mais expresso quando comparados aos cães não infectados. Em relação aos demais genes, não houve diferença estatisticamente significativa, sendo a expressão gênica relativa para IL-10 de 1,43 vezes ($p=0,254$), para iNOS de 0,94 vezes ($p=0,398$) e para o TGF- β de 0,80 vezes ($p=0,439$) maior nos cães infectados em relação aos cães não infectados (controle).

A relação entre a expressão dos genes de interesse e a carga parasitária (CP) da pele dos cães foi avaliada a partir de um modelo linear ajustado em função da CP. Observou-se diferença estatisticamente significativa entre o aumento da CP e as citocinas IL-10 ($p=0,007$), TNF- α ($p=0,031$), e o receptor TLR-2 ($p=0,0003$) (Figura 1 - B, C e D, respectivamente).

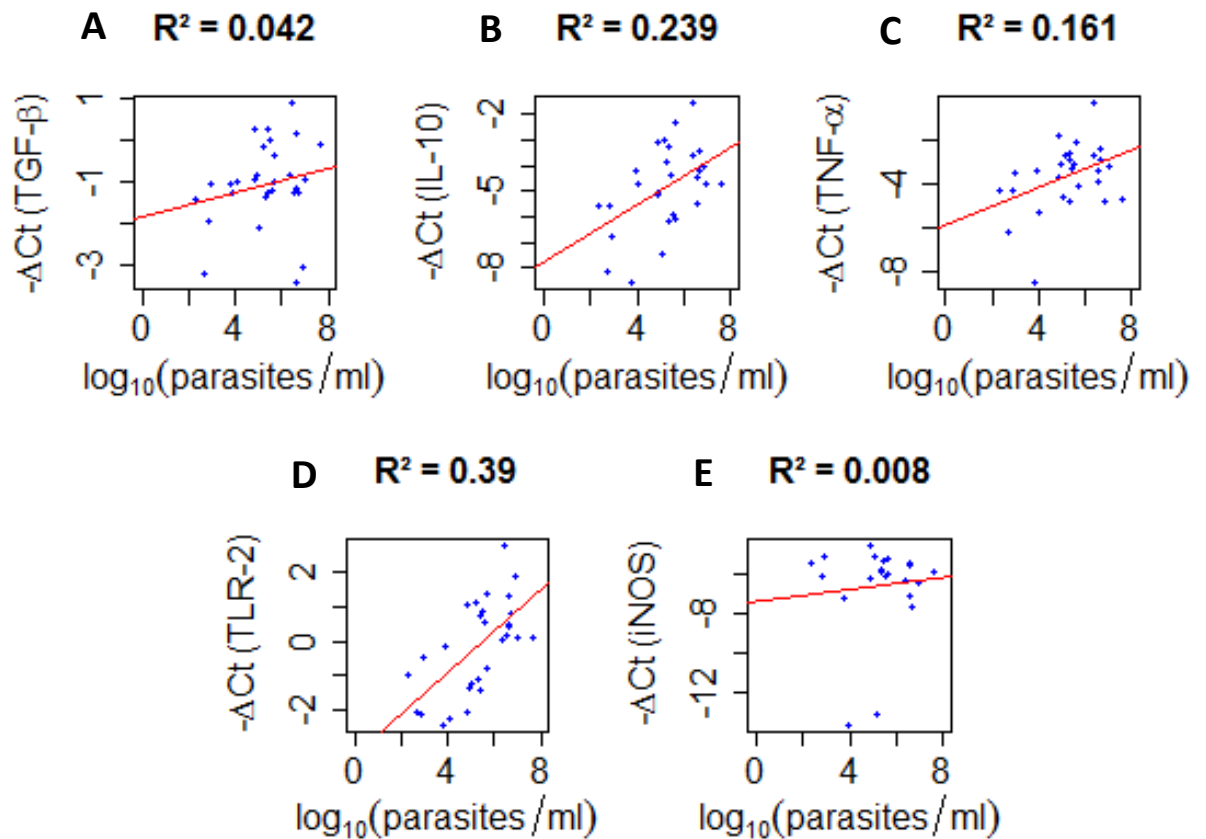


FIGURA 1 - Diagrama de dispersão baseado no valor de $-\Delta\text{Ct}$ dos genes, A) TGF- β , B) IL-10, C) TNF- α , D) TLR-2, E) iNOS em relação ao $\log_{10}$ da carga parasitária. Os valores de R^2 indica o quanto a expressão do gene é explicada pelo aumento da carga parasitária para IL-10 ($R^2 = 0,239$), TNF- α ($R^2 = 0,161$) e TLR-2 ($R^2 = 0,390$).

A expressão gênica do TRL-2 apresentou correlação de Pearson positiva e moderada ($r=0,625$) em relação à carga parasitária, enquanto que a IL-10 e o TNF- α apresentaram correlação positiva fraca ($r=0,489$ e $r=0,401$, respectivamente). Não houve correlação entre a carga parasitária e a expressão dos genes do TGF- β e iNOS (Figura 2).

Correlação da expressão entre os genes de interesse

A expressão da IL-10 revelou correlação de Pearson positiva forte com TNF- α ($r=0,827$), positiva moderada com o TLR-2 ($r=0,738$), positiva fraca com TGF- β ($r=0,419$) e correlação negativa fraca com a iNOS ($r= -0,299$) (Figura 2).

A expressão do TNF- α teve correlação positiva moderada com o TLR-2 ($r=0,704$) e fraca com o TGF- β ($r=0,398$) (Figura 2).

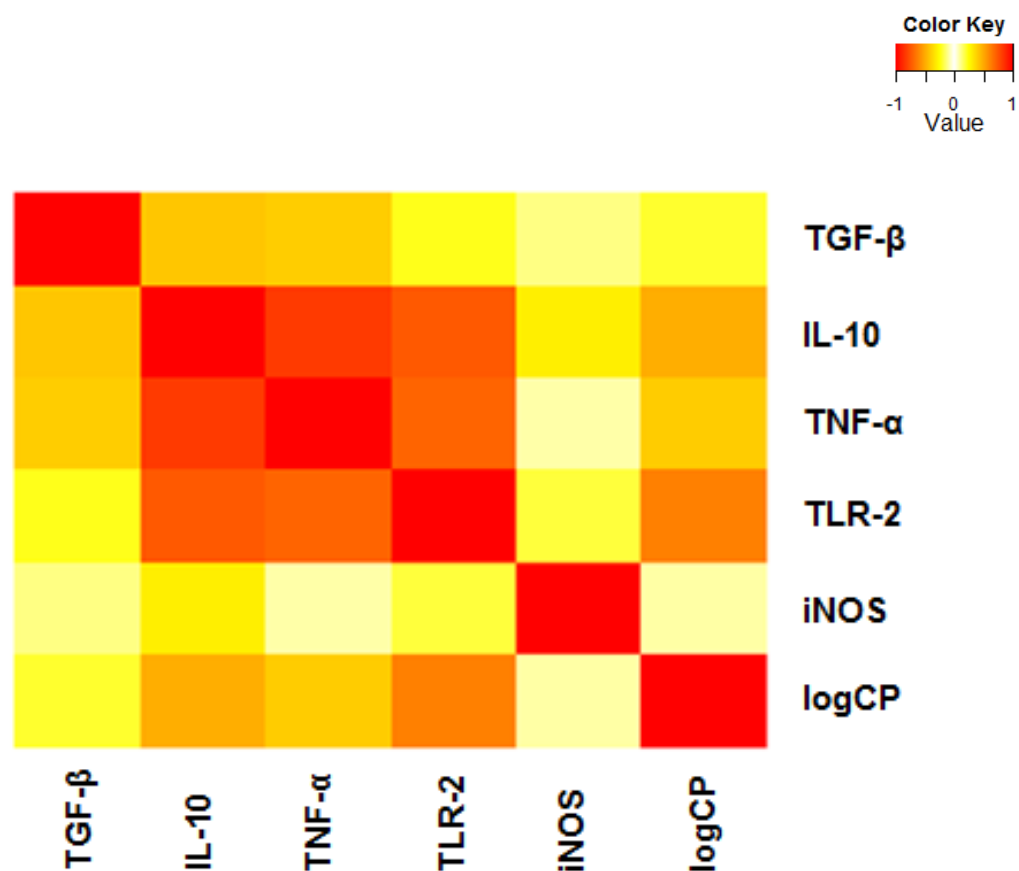


FIGURA 2 - “Heatmap” representando a correlação de Pearson entre a expressão dos genes de interesse e a carga parasitária da pele de cães, e da expressão dos genes entre si. Correlação forte está representada por cores mais quentes.

Expressão dos genes nos grupos segundo a carga parasitária

Quando a expressão relativa dos genes alvos foi analisada considerando-se os grupos segundo a carga parasitária, os cães do Grupo 3 apresentaram maior expressão gênica relativa para TLR-2 (4,08), para IL-10 (2,21), para TNF- α (2,03) e para TGF- β (0,88), em relação ao Grupo 1 (controle). Nos cães do Grupo 2 a diferença na expressão foi de 1,18 vezes para TLR-2, de 0,83 para TNF- α , de 0,70 para IL-10 e de 0,66 para TGF- β . Para o gene da iNOS observou-se maior expressão relativa (1,01 vezes) para os cães do Grupo 2, enquanto para o Grupo 3, a expressão relativa foi 0,90 vezes maior em relação ao controle.

A expressão dos genes de interesse em função dos grupos (1, 2 e 3) revelou diferença estatisticamente significativa para a expressão de IL-10 ($p=0,008$), de TNF- α ($p=0,006$) e de TLR-2 ($p=5,87 \times 10^{-6}$) (Figura 3).

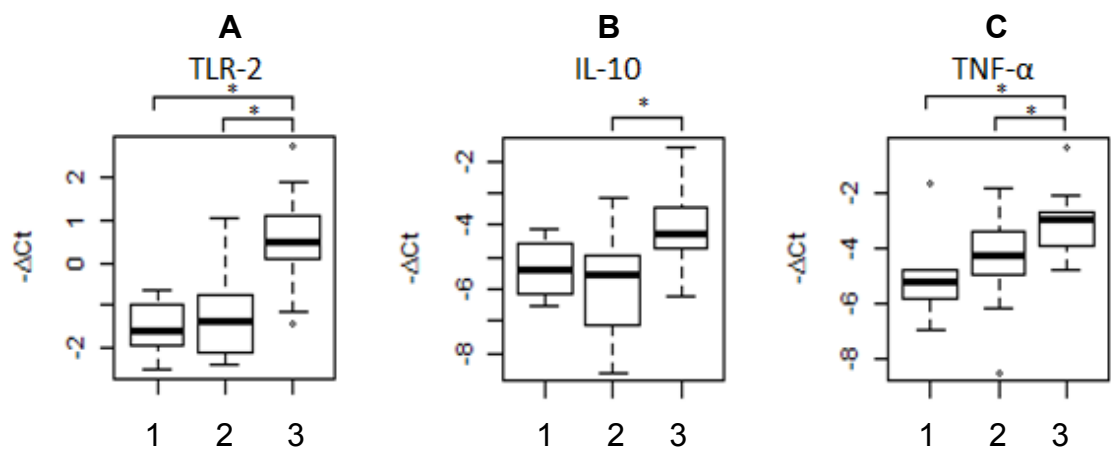


FIGURA 3 - “Boxplot” do $-\Delta Ct$ para TLR-2 (A), IL-10 (B) e TNF- α (C) em relação aos grupos: Grupo 1 (controle); Grupo 2 (CP entre $2,19 \times 10^2$ e $2,27 \times 10^5$); Grupo 3 (CP $> 2,27 \times 10^5$), representando os valores da mediana, mínimo e máximo. Diferença significativa ao teste de Tukey para TLR-2 entre os grupos 1-3 ($p=6,6 \times 10^{-5}$) e 2-3 ($p=9,1 \times 10^{-5}$); para IL-10 entre os grupos 2-3 ($p=0,008$); para TNF- α entre os grupos 1-3 ($p=0,009$) e sugestivo para 2-3 ($p=0,059$). *Diferença estatisticamente significante ($p<0,05$).

DISCUSSÃO

A pele tem importante papel na imunopatogenia e na transmissão da leishmaniose visceral (LV) e neste estudo demonstramos a expressão aumentada dos genes componentes da resposta imune, TLR-2, TNF- α e IL-10 na pele de cães naturalmente acometidos por LV, quando comparado aos cães não infectados.

O aumento da expressão de TLR-2 na pele de cães infectados foi observado por Esteve et al. (2015), e pode estar relacionado à maior presença de antígenos de *Leishmania*, indicando a participação do TLR-2 na patogênese da leishmaniose canina (ESTEVE et al., 2015).

Melo et al. (2014) também observaram aumento na expressão relativa de TLR-2 em amostras de cérebro, baço e linfonodo de cães infectados. Esses resultados corroboram também com os observados por Cezário et al. (2011) em baço de camundongos experimentalmente infectados com *L. chagasi*.

Além da maior expressão relativa do gene TLR-2 em cães acometidos por LV, observamos maior expressão de TLR-2 na pele de cães com carga parasitária mais alta (Grupo 3), quando comparado aos cães com menor carga parasitária (Grupo 2). Resultado semelhante foi observado por Figueiredo et al. (2013) em amostras de cólon de cães naturalmente infectados com *L. infantum*, o que poderia sugerir que o TLR-2 possa estar associado à progressão da infecção. Entretanto, Amorim et al. (2011) relacionaram a maior expressão do TLR-2 à menor carga parasitária da pele de cães naturalmente infectados. Em nosso estudo os cães também foram naturalmente infectados e o estágio da doença em que se encontravam pode ser fatores que colaboram para esta diferença. Além destes, a diferença dos métodos utilizados também deve ter contribuído para a diferença dos resultados visto que estes autores avaliaram a carga parasitária por IHQ enquanto que, na presente pesquisa, a mesma foi avaliada por qPCR.

A expressão do TLR-2 foi também correlacionada positivamente com a citocina pró-inflamatória TNF- α e com a citocina anti-inflamatória IL-10. Gatto et al. (2015) observaram resultados semelhantes quando avaliaram pacientes humanos com leishmaniose visceral ativa. Estes resultados sugerem que a maior expressão do TLR-2 poderia estar regulando as citocinas TNF- α e IL-10, na tentativa de combater a infecção inicial, muito embora os cães do presente estudo apresentassem sinais clínicos de LV estabelecida e não em fase inicial da doença. Estes dados reforçam a participação do receptor TLR-2 na resposta adaptativa da pele ao parasita e subsequente produção de citocinas pró e anti-inflamatórias.

O aumento da expressão de TNF- α observado nos cães com maior carga parasitária pode indicar que esta citocina esteja atuando na resposta inflamatória, recrutando células para o local da infecção. De fato, infiltrado inflamatório com predominância de macrófagos foi observado na pele de cães infectados por *L. infantum* (BRACHELENTE et al., 2005). Maiores níveis observados dessa citocina, correlacionado com a carga parasitária no baço de cães infectados indicaram que a presença do parasita induz uma resposta imune com expressão relevante do TNF- α (MICHELIN et al., 2011). Entretanto, Brachelente et al. (2005) e Menezes-Souza et al. (2011) não observaram diferença significativa da expressão de TNF- α na pele de cães com maior carga parasitária. Essa diferença pode estar associada ao método utilizado para quantificação da carga parasitária (LDU – “Leishman Donovan Units”, com menor sensibilidade diagnóstica), bem como pelos valores de carga parasitária utilizados para classificação (de 09 à 4.356 parasitas), os quais diferiram bastante dos valores do presente estudo.

Neste estudo observamos correlação positiva da IL-10 com o TNF- α , sendo que a coexistência de citocinas do perfil Th1 com a citocina IL-10 tem sido relatada durante a LVC (CHAMIZO et al., 2005; SANTOS-GOMES et al., 2002). A IL-10 pode atuar como um modulador responsável por manter o

equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2, além de regular possíveis danos causados pelo aumento da expressão de TNF- α (LAGE et al., 2007).

A IL-10, que tem sido relacionada com a modulação de processos inflamatórios e sobrevivência do parasita, foi correlacionada positivamente com a carga parasitária neste estudo, corroborando com o observado por Menezes-Souza et al. (2011), onde o aumento da expressão da IL-10 foi observado na pele de cães com alto parasitismo e correlacionado ao aumento da carga parasitária. Esses resultados são semelhantes também ao observado por Lage et al. (2007) onde o aumento de RNAm para IL-10 foi observado em baço de cães exibindo maior número de parasitas/célula (LDU), bem como com o observado por Alves et al. (2009) em linfonodo de cães naturalmente infectados com LV, que observaram tendência à expressão aumentada dos genes das citocinas reguladoras IL-10 e TGF- β em cães com maior parasitismo, o que sugere que a ação imunossupressora da IL-10 possa estar favorecendo a persistência do protozoário nos tecidos. À semelhança de nosso estudo, estes autores não avaliaram as células Treg, importante fonte de produção de citocinas supressoras como TGF- β e IL-10 (CAMPANELLI et al., 2006; GANTT et al., 2003).

Embora o TGF- β tenha sido considerado determinante para garantir a sobrevivência e multiplicação de formas amastigotas de *Leishmania* spp. na pele de cães naturalmente infectados (MENEZES-SOUZA et al., 2011), na presente pesquisa nenhuma correlação foi observada com a carga parasitária, apesar de estar aumentada em relação ao grupo controle.

Não se observou correlação entre a expressão da iNOS e a carga parasitária neste estudo, o que difere do observado por Santos et al. (2011), onde cães com alto parasitismo no baço apresentaram marcada expressão de iNOS, relacionado ao agravamento dos sinais clínicos. Este resultado também difere do observado por Sanches et al. (2014), em baço e linfonodo de cães infectados, que observaram correlação negativa entre o número de células

com parasitas e o número de células expressando iNOS. Diferem também dos resultados obtidos por Zafra et al. (2008), onde macrófagos ativados de cães infectados com alta expressão de iNOS foram capazes de destruir e/ou impedir a multiplicação de amastigotas. Porém, diferentemente do nosso estudo, estes autores utilizaram a IHQ para avaliação da presença da iNOS enquanto que a presente pesquisa avaliou a expressão gênica. Em conjunto, esses resultados sugerem que a resposta imunológica depende dos mediadores localmente produzidos e que há compartimentalização da resposta imune (CORREA et al., 2007; REIS et al., 2009).

Alguns eventos podem contribuir para a persistência da *Leishmania* spp., como a oportunidade de escapar dos efeitos microbicidas do NO. O aumento da atividade da arginase tem sido detectado em sítios da infecção na leishmaniose visceral humana (ABEBE et al., 2013). Como a arginase compete com a iNOS na utilização de L-arginina como substrato, sua presença poderia ter prejudicado a produção de NO pela limitação do substrato, ainda que a iNOS estivesse sendo produzida na pele dos cães no presente estudo. Futuros estudos para avaliação da atividade arginase na pele de cães infectados seriam importante para esclarecer essa hipótese. Além disto, nosso estudo revelou que a expressão da iNOS está correlacionada negativamente com a IL-10, citocina indutora da atividade da arginase (MODOLELL et al., 1995) e isto sugere uma possível competição pelo substrato L-arginina, o que prejudicaria a liberação de NO.

Algumas limitações de nosso estudo, como o fato de termos avaliado a expressão dos genes e não a produção da citocina, além do fato dos cães serem naturalmente infectados apresentando-se, portanto, em diferentes estágios da infecção, podem ter contribuído para os resultados divergentes observados.

No geral, o perfil misto de citocinas observados na pele de cães naturalmente acometidos por LV sugere que, a exemplo da observação de

Papadogiannakis e Koutinas (2015), o paradigma Th1 ou Th2 não se ajusta perfeitamente na leishmaniose visceral canina.

CONCLUSÃO

A expressão dos componentes da resposta imune TLR-2, IL-10 e TNF- α está aumentada na pele de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral e correlaciona-se com o aumento da carga parasitária neste tecido, atribuindo a estes componentes um papel importante na patogênese da LVC.

AGRADECIMENTOS

Aos professores (as) Dra. Valéria M. F. Lima, Dra. Gisele F. Machado e Dr. Marcelo V. Meireles. As equipes dos Laboratórios de Bioquímica e Biologia Molecular, Imunologia e Patologia Aplicada pela colaboração neste trabalho e ao Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba. À Capes pelo consentimento da bolsa de Mestrado.

REFERÊNCIAS

- ABEBE, T.; TAKELE, Y.; WELDEGEBREAL, T.; CLOK, T.; CLOSS, E.; CORSET, C.; HAILU, A.; HAILU, W.; SISAY, Y.; CORWARE, K.; CORSET, M.; MODOLELL, M.; MUNDER, M.; TACCHINI-COTTIER, F.; MULLER, I.; KROPF, P. Arginase activity – marker of disease status in patients with visceral leishmaniasis in Ethiopia. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.3, p.E2134, 2013.
- ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper(h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunology Letters**, v.99, p.17-23, 2005.
- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v.57, p.1-88, 2004.
- 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- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.128, p.349-358, 2009.
- AMORIM, I.F.G.; SILVA, S.M.; FIGUEIREDO, M.M.; MOURA, E.P.; CASTRO, R.S.; LIMA, T.K.S.; GONTIJO, N.F.; MICHALICK, M.S.M.; GOLLOB, K.J.; TAFURI, W.L. Toll receptors type-2 and CR3 expression of canine monocytes and its correlation with immunohistochemistry and xenodiagnosis in visceral leishmaniasis. **Plos One**, v.6, n.11, p.E27679, 2011.
- BARBIERI, C.L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.28, p.329-337, 2006.
- BAZZOCHI, C.; MORTARINO, M.; COMAZZI, S.; BANDI, C.; FRANCESCHI, A.; GENCHI, C. Expression and function of Toll-like receptor 2 in canine blood

phagocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.104, p.15-19, 2005.

BECKER, I.; SALAIZA, N.; AGUIRRE, M.; DELGADO, J.; CARRILLO-CARRASCO, N.; KOBEH, L.G.; RUIZ, A.; CERVANTES, R.; TORRES, A.P.; CABRERA, N.; GONZÁLEZ, A.; MALDONADO, C.; ISIBASI, A. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.130, p.65-74, 2003.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v.2, n.10, p.907-916, 2001.

BRACHELENTE, C.; MULLER, N.; DOHERR, M.G.; SATTLER, U.; WELLE, M. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T-helper-2-biased immune response. **Veterinary Pathology** v.42, p.166-175, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília (DF): M.S, 2006, p.122.

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

CARRILLO, E.; AHMED, S.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; NIETO, J.; OSORIO, Y.; TRAVIC, B.; MORENO, J.; MCMAHON-PRATT, D. Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v.25, n.8, p.1534-1543, 2007.

CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.128, p.67-70, 2009.

CEZÁRIO, G.A.G.; OLIVEIRA, L.R.C.; PERESI, E.; NICOLETE, V.C.; POLETTINI, J.; LIMA, C.R.G.; GATTO, M.; CALVI, S.A. Analysis of the expression of toll-like receptors 2 and 4 and cytokine production during experimental *Leishmania chagasi* infection. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.106, p.573-583, 2011.

CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.103, n.1-2, p.67-75, 2005.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Resolução nº1000 de 11 de maio de 2012. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 17 de maio de 2012. Seção 1, p.124-125.

CORRALIZA, I.M.; SOLER, G.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE₂) in murine bone-marrow derived macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.206, n.2, p.667-673, 1995.

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

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

DE VEER, M.J.; CURTIS, J.M.; BALDWIN, T.M.; DIDONATO, J.A.; SEXTON, A.; MCCONVILLE, M.J.; HANDMAN, E.; SCHOFIELD, L. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-

like receptor 2 signaling. **European Journal of Immunology**, v.33, n.10, p.2822-2831, 2003.

ESTEVE, L.O.; SAZ, S.V.; HOSEIN, S.; SOLANO-GALLEGU, L. Histopathological findings and detection of toll-like receptor 2 in cutaneous lesions of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.209, p.157-163, 2015.

FIGUEIREDO, M.M.; AMORIM, I.F.G.; PINTO, A.J.W.; BARBOSA, V.S.; PINHEIRO, L.J.; DEOTI, B.; FARIA, A.M.C.; TAFURI, W.L. Expression of Toll-like receptors 2 and 9 in cells of dog jejunum and colon naturally infected with *Leishmania infantum*. **BMC Immunology**, v.14, p.14-22, 2013.

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

GANTT, K.R.; SCHULTZ-CHERRY, S.; RODRIGUEZ, N.; JERONIMO, S.M.B.; NASCIMENTO, E.T.; GOLDMAN, T.L.; RECKER, T.J.; MILLER, M.A.; WILSON, M.E. Activation of TGF- β by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. **The Journal of Immunology**, v.170, p.2613-2620, 2003.

GATTO, M.; ABREU, M.M.; TASCA, K.I.; GOLIM, M.A.; SILVA, L.D.M.; SIMÃO, J.C.; CASTELO, C.M.; FORTALEZA, B.; SOARES, A.M.V.C.; CALVI, S.A. The involvement of TLR2 and TLR4 in cytokine and nitric oxide production in visceral leishmaniasis patients before and after treatment with anti-leishmanial drugs. **Plos One**, v.10, n.2, p.E0117977, 2015.

GUERRA, C.S.; SILVA, R.M.M.; CARVALHO, L.O.P.; CALABRESE, K.S.; BOZZA, P.T.; CÔRTE-REAL, S. Histopathological analysis of initial cellular response in TLR-2 deficient mice experimentally infected by *Leishmania* (L.)

amazonensis. **International Journal of Experimental Pathology**, v.91, p.451-459, 2010.

HARHAY, M.O.; OLLIARO, P.L.; COSTA, D.L.; COSTA, C.H.N. Review: Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v.27, n.9, p.403-409, 2011.

KAIM, U.; MORITZ, A.; FAILING, K.; BAUMGARTNER, W. The regression of a canine Langerhans cell tumour is associated with increased expression of IL-2, TNF- α , IFN- γ and iNOS mRNA. **Immunology**, v.118, p.472-482, 2006.

KAVOOSI, G.; ARDESTANI, S.K.; KARIMINIA, A.; ALIMOHAMMADIANET, M.H. *Leishmania major* lipophosphoglycan: discrepancy in toll-like receptor signaling. **Experimental Parasitology**, v.124, p.214-218, 2010.

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

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.100, p.811-827, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987, v.1, p.1-120.

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

MAIA, C.; CAMPINO, L. Cytokine and phenotypic cell profiles of *Leishmania infantum* infection in the dog. **Journal of Tropical Medicine**, doi:10.1155/2012/541571, 2012.

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

MACMICKING, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**, v.15, p.323-350, 1997.

MCCONVILLE, M.J.; SCHNUR, L.F.; JAFFE, C.; SCHNEIDER, P. Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter and intra-specific polymorphism in Old World species. **Biochemical Journal**, v.310, p.807-818, 1995.

MELO, G.D.; SERAGUCI, T.F.; SCHWEIGERT, A.; SILVA, J.E.S.; GRANO, F.G.; PEIRO, J.R.; LIMA, V.M.F.; MACHADO, G.F. Pro-inflammatory cytokines predominate in the brains of dogs with visceral leishmaniasis: A natural model of neuroinflammation during systemic parasitic infection. **Veterinary Parasitology**, v.192, p.57-66, 2013.

MELO, G.D.; SILVA, J.E.S.; GRANO, F.G.; HOMEM, C.G.; MACHADO, G.F. Compartmentalized gene expression of toll-like receptors 2, 4 and 9 in the brain and peripheral lymphoid organs during canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.36, p.726-731, 2014.

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

MERCIER, E.; PETERS, I.R.; DAY, M.J.; CLERCX, C.; PEETERS, D. Toll-and NOD-like receptor mRNA expression in canine sino-nasal aspergillosis and idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.145, p.618-624, 2012.

MICHELIN, A.F.; PERRI, S.H.V.; LIMA, V.M.F. Evaluation of TNF- α , IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of *L.(L.) chagasi* naturally infected dogs. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v.105, n.5, p.373–383, 2011.

MODELELL, M.; CORRALIZA, I.M.; LINK, F.; SOLER, G.; EICHMANN, K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. **European Journal of Immunology**, v.25, p.1101-1104, 1995.

OLIVEIRA, F.M.; COSTA, L.H.C.; BARROS, T.L.; ITO, P.K.R.K.; COLOMBO, F.A.; CARVALHO, C.; PEDRO, W.A.; QUEIROZ, L.H.; NUNES, C.M. First detection of *Leishmania* spp. DNA in Brazilian bats captured in urban areas. **Acta Tropica**, (ahead of publishing) doi: 10.1016/j.actatropica.2015.07.010 2015.

PANARO, M.A.; ACQUAFREDDA, A.; LISI, S.; LOFRUMENTO, D.D.; MITOLO, V.; SISTO, M.; FASANELLA, A.; TROTTA, T.; BERTANI, F.; CONSENTI, B.; BRANDIONISIO, O. Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.24, p.187-195, 2001.

PAPADOGIANNAKIS, E.I.; KOUTINAS, A.F. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.163, p.94-102, 2015.

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.

PETERS, I.R.; PEETERS, D.; HELPS, C.R.; DAY, M.J. Development and application of multiple internal reference (housekeeper) gene assays for accurate normalization of canine gene expression studies. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.117, p.55-66, 2007.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W.L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.28, n.1-3, p.87-95, 2009.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J.C.; GIUNCHETTI, R.C.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v.81, n.1, p.68–75, 2006.

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

SANCHES, F.P.; TOMOKANE, T.Y.; DA MATTA, V.L.R.; MARCONDES, M.; CORBETT, C.E.P.; LAURENTI, M.D. Expression of inducible nitric oxide synthase in macrophages inversely correlates with parasitism of lymphoid tissues in dogs with visceral leishmaniasis. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.56, p.57, 2014.

SANTOS, F.R.; VIEIRA, P.M.A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; REIS, A.B.; MALAQUIAS, L.C.C. Qualitative and quantitative immunohistochemical evaluation of iNOS expression in the spleen of dogs

naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Parasitology Research**, v.108, n.6 p.1397-1403, 2011.

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

SILVA, K.L.O.; ANDRADE, M.M.C.; MELO, L.M.; PEROSSO, J.; VASCONCELOS, R.O.; MURANI, D.P.; LIMA, V.M.F. CD4+FOXP3+ cells produce IL-10 in the spleens of dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.202, p.313-318, 2014.

SINGH R.K.; SRIVASTAVA, A.; SINGH, N. Toll-like receptor signaling: A perspective to develop vaccine against leishmaniasis. **Microbiological Research**, v.167, p.445-451, 2012.

SISTO, M.; BRANDONISIO, O.; PANARO, M.A.; ACQUAFREDDA, A.; LEOGRANDE, D.; FASANELLA, A.; TROTTA, T.; FUMAROLA, L.; MITOLO, V. Inducible nitric oxide synthase expression in *Leishmania*- infected dog macrophages. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.24, p.247-254, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G., FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.165, p.1-18, 2009.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G.; SHOR, S.; OKANO, F.; JAFFE, C.L. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. **International Journal for Parasitology**, v.35, p.63-73, 2005.

TUON, F.F.; FERNANDES, E.R.; DUARTE, M.I.S.; AMATO, V.S. Expression of TLR2 and TLR4 in lesions of patients with tegumentary American leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.54, p.159-63, 2012.

TUON, F.F.; AMATO, V.S.; BACHA, H.A.; ALMUSAWI, T.; DUARTE, M.I.; NETO, V.A. Toll-Like Receptors and leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v.76, n.3, p.866-872, 2008.

WILKINS-RODRÍGUEZ, A.A.; ESCALONA-MONTAÑO, A.R.; AGUIRRE-GARCÍA, M.; BECKER, I.; GUTIÉRREZ-KOBEH, L. Regulation of the expression of nitric oxide synthase by *Leishmania mexicana* amastigotes in murine dendritic cells. **Experimental Parasitology**, v.126, p.426-434, 2010.

ZAFRA, R.; JABER, J.R.; PÉREZ-ÉCIJA, R.A.; BARRAGÁN, A.; MARTÍNEZ-MORENO, A.; PÉREZ, J. High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.123, p.353-359, 2008.

ZHU, J.; PAUL, W.E. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. **Cell Research**, v.20, p.4-12, 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Resultados dos ciclos limiares (Ct) médios da expressão gênica, por RT-PCR em tempo real.

Apêndice 1A – Valores médios dos ciclos limiares (Ct) da expressão gênica do receptor TLR-2, da enzima iNOS, das citocinas TNF- α , TGF- β e IL-10 e do gene de referência HPRT-1, por qPCR da pele de oito cães negativos para LVC (grupo controle).

Cães negativos				qPCR	Expressão gênica - Média Ct				
Amostra	Raça	Sexo 1=M 2=F	Carga parasitária	HPRT-1	TGF- β	IL-10	TNF- α	TLR-2	iNOS
N1	SRD	2	0,00E+00	28,04	28,96	34,58	33,29	29,46	34,34
N2	SRD	2	0,00E+00	26,53	27,51	31,19	31,69	27,26	34,23
N3	SRD	1	0,00E+00	26,20	27,49	32,36	31,04	27,98	31,12
N4	SRD	1	0,00E+00	25,98	25,68	31,53	31,53	28,04	32,79
N5	SRD	2	0,00E+00	26,69	26,42	31,92	31,52	27,30	31,18
N6	SRD	2	0,00E+00	26,49	26,34	30,59	32,67	27,66	33,61
N7	SRD	1	0,00E+00	27,64	27,95	32,03	29,30	29,44	33,21
N8	SRD	2	0,00E+00	26,97	29,93	33,13	33,94	29,48	32,92

- Os valores do Ct para cada gene foram obtidos em duplicatas. Amostra N=negativos. Raça SRD=sem raça definida

Apêndice 2A – Sinais clínicos e valores médios dos ciclos limiares (Ct) da expressão gênica do receptor TLR-2, da enzima iNOS, das citocinas TNF- α , TGF- β e IL-10 e do gene de referência HPRT-1 por qPCR da pele de 29 cães naturalmente acometidos por LV (grupo infectado).

Cães infectados			Sinais clínicos					qPCR	Expressão gênica - Média Ct					
Amostra	Raça	Sexo 1=M 2=F	Alterações dermatológicas	Onicogrifose	Alterações oftálmicas	Linfadenomegalia	Score corporal	Carga parasitária	HPRT-1	TGF- β	IL-10	TNF- α	TLR-2	iNOS
P1	Teckel	1	1	1	0	1	3	4,50E+06	26,66	26,52	30,83	31,11	26,20	N/A
P2	SRD	2	1	1	1	1	2	7,00E+04	26,77	26,50	29,87	29,99	25,70	33,05
P3	SRD	2	1	1	1	1	2	4,61E+05	27,02	28,02	33,09	36,60	27,79	32,29
P4	Pinscher	2	1	1	0	1	1	3,52E+05	26,36	27,59	32,26	30,90	25,79	32,50
P5	SRD	2	0	1	0	1	2	3,84E+06	26,63	27,80	31,10	31,53	26,22	32,12
P6	Teckel	1	1	1	1	1	3	6,28E+03	26,67	27,75	35,27	32,61	29,08	33,88
P7	SRD	2	1	1	0	1	2	4,13E+07	24,66	24,79	29,38	30,63	24,55	30,65
P8	Poodle	1	1	1	1	1	2	2,27E+06	29,24	30,08	32,87	33,35	29,20	35,56
P9	SRD	2	1	1	0	1	3	4,64E+06	25,65	26,93	29,07	29,50	24,85	33,35
P10	SRD	1	1	1	0	1	3	7,20E+02	26,64	28,61	32,20	32,52	28,75	32,84
P11	SRD	2	1	1	0	1	2	2,27E+05	27,19	28,47	30,48	31,71	26,46	33,09
P12	SRD	2	1	1	1	0	1	1,15E+05	28,09	30,20	35,59	33,95	29,32	33,23
P13	Poodle	1	1	1	0	1	3	4,30E+05	30,68	31,07	33,00	34,14	29,33	36,78
P14	SRD	2	1	1	1	1	2	2,84E+05	26,43	26,42	30,81	31,28	25,59	31,85
P15	SRD	2	1	1	1	1	2	8,15E+04	26,93	27,78	32,03	31,48	28,28	31,54
P16	SRD	2	1	0	1	0	3	9,19E+02	27,51	28,57	34,26	32,54	27,99	32,71
P17	SRD	2	1	1	1	1	2	7,20E+06	27,98	31,03	32,05	34,11	26,09	0,00
P18	SRD	2	0	0	0	1	2	8,60E+03	29,88	31,13	34,08	34,54	30,04	43,44
P19	SRD	2	1	0	1	1	2	2,24E+05	25,61	25,34	31,81	31,93	27,05	31,45
P20	SRD	1	1	1	1	1	2	9,35E+06	26,80	27,77	31,53	31,51	26,69	33,25
P21	SRD	1	1	1	1	1	2	5,20E+02	26,97	30,17	35,11	34,60	29,01	0,00
P22	SRD	2	1	1	1	1	2	3,49E+06	26,13	27,41	31,64	31,47	25,96	33,29
P23	SRD	2	1	1	1	0	3	2,19E+02	25,81	27,21	31,43	31,30	26,79	31,31
P24	Poodle	2	1	1	1	0	3	4,04E+06	26,41	29,84	30,86	30,63	25,13	32,02
P25	SRD	2	0	1	0	1	2	1,50E+05	30,64	30,81	33,62	33,36	29,55	43,73
P26	SRD	2	1	1	1	0	3	2,00E+05	26,76	28,12	30,62	29,42	27,88	N/A
P27	SRD	1	0	1	0	0	1	1,11E+04	28,21	29,22	32,93	33,52	30,44	N/A
P28	SRD	1	1	1	1	1	2	2,50E+06	32,68	31,81	34,25	33,03	29,91	N/A
P29	SRD	1	0	0	1	0	3	7,08E+04	27,92	28,85	33,05	31,64	29,99	N/A

Amostra P=positivos. Sinais clínicos 0=ausência; 1=presença. Score corporal 1=caquexia; 2=magro; 3=normal. Expressão gênica N/A= não avaliado.