

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

**CÉLULAS CD4+FOXP3+ PRODUZEM IL-10 NO BAÇO
DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

Mariana Macedo Costa de Andrade

Bióloga

ARAÇATUBA – SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

**CÉLULAS CD4+FOXP3+ PRODUZEM IL-10 NO BAÇO
DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

Mariana Macedo Costa de Andrade

Orientador: Prof. Adj. Valéria Marçal Félix de Lima

**Co-orientadora: Prof. Ass. Dra. Rosemeri de Oliveira
Vasconcelos**

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

ARAÇATUBA – SP

2012

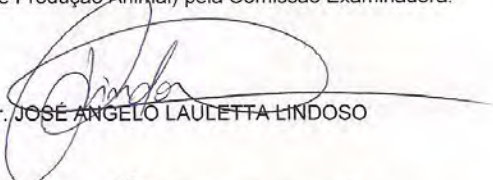
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

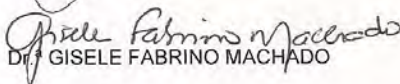
TÍTULO: Células CD4+FOXP3+ produzem IL-10 no baço de cães com leishmaniose
visceral.

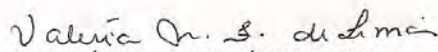
AUTORA: MARIANA MACEDO COSTA DE ANDRADE

ORIENTADORA: Dr.^a VALÉRIA MARÇAL FÉLIX DE LIMA

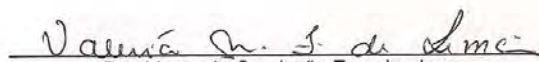
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal) pela Comissão Examinadora.


Dr. JOSÉ ANGELO LAULETTA LINDOSO


Dr.^a GISELE FABRINO MACHADO


Dr.^a VALÉRIA MARÇAL FÉLIX DE LIMA

DATA DA REALIZAÇÃO: 07 de março de 2012.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr.^a VALÉRIA MARÇAL FÉLIX DE LIMA
- Orientadora -

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

Andrade, Mariana Macedo Costa de

A553c

Células CD4+FOXP3+ produzem IL-10 no baço de cães com

Leishmaniose visceral/Mariana Macedo Costa de Andrade.

Araçatuba: [s.n], 2012

39f. il.; CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária, 2012

Orientador: Prof Adj. Valéria Marçal Felix de Lima

Co-orientador: Prof. Assist Dr. Rosemari de Oliveira Vasconcelos

1. Doenças do cão 2. Citocinas 3. Leishmania. 4. Subpopulação
de linfócitos. 5. Interleucina 10. 6. Fatores de crescimento
transformadores

CDD 636.70896

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIANA MACEDO COSTA DE ANDRADE – Nascida em São João da Boa Vista, SP, no dia 07 de novembro de 1985. Licenciada em Ciências Biológicas pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP, em 2009. Estagiou no Laboratório de Tecnologia no período de 2006 a 2007, no Departamento de Produção Vegetal no período de 2007 a 2008 e no Departamento de Patologia Veterinária no período de 2008 a 2009. Em 2008 realizou iniciação científica com frutas exóticas com projeto intitulado: Teste de viabilidade de pólen de pitaya. Em 2009 realizou iniciação científica com imunopatologia com projeto intitulado: Expressão de MHC de classe II em macrófagos de cães infectados com leishmaniose visceral canina. Iniciou pós-graduação (mestrado) no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal na UNESP, Araçatuba, em 2010. Do início do mestrado até a presente data, realizou estágio de docência na disciplina de Imunologia. Submeteu um total de dez resumos aos eventos científicos: XX Congresso Brasileiro de Fruticultura (2008), 55º Congresso Brasileiro de Genética (2009), XIV Encontro Nacional de Patologia Veterinária (2009), XXXV e XXXVI Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia (2010 e 2011), XXVI Encontro Nacional da Sociedade Brasileira de Protozoologia (2010), II Simpósio de Pós Graduação (2011).

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Valéria Marçal Félix de Lima por não somente orientar-me em todos os aspectos de minha tese, mas em minha vida e minha carreira.

À minha co-orientadora Rosemeri de Oliveira Vasconcelos por confiar-me o seu conhecimento e a sua amizade. Agradeço principalmente por encaminhar-me à FMVA sabendo que seria a grande chance de crescer e de aprender.

À coordenadora de pós-graduação Juliana Regina Peiró por seu brilhante trabalho nesta instituição, por suas preciosas contribuições a este trabalho, por seu afeto, dedicação e doação de sinceras expectativas por meu crescimento profissional.

À professora Gisele Fabrino Machado por permitir que fossem realizadas as imunistoquímicas em seu laboratório, por auxiliar na lapidação deste trabalho, por sua amizade e por seus conselhos.

À minha mãe e minha avó por toda dedicação para a minha formação, pela batalha para minha permanência confortável em Araçatuba, pelas noites não dormidas, por serem tudo em minha vida.

Especial às minhas amigas, colegas, irmãs Larissa Martins Melo, Juliana Perosso e Bruna Brito que sempre ajudaram-me em todos os aspectos deste trabalho, acolheram-me e deram-me muito carinho sem a espera de algo em troca.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Imunologia que fizeram parte de tantos momentos maravilhosos e inesquecíveis.

Aos amigos que adquiri em Araçatuba por tornarem-se minha família.

Aos funcionários do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba por contribuírem de forma fundamental para a realização deste trabalho.

À UNESP por tutelar brilhantemente a minha carreira.

À FAPESP por financiar as pesquisas que venho participando desde a minha Iniciação Científica.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.	10
REFERÊNCIAS.	17
CAPÍTULO 2 – Células CD4+FOXP3+ produzem IL-10 no baço de cães com Leishmaniose Visceral.	25
Introdução.	27
Material e Método.	30
Animais.	30
Coleta das Amostras.	30
Detecção de anticorpo <i>L. chagasi</i> pelo ELISA.	31
Avaliações das células T CD4+FOXP3+IL-10+ e T CD4+FOXP3+TGFβ+.	32
Quantificação da carga parasitária de <i>Leishmania</i> spp. por PCR em Tempo Real.	33
Análise em microscopia de luz.	33
Imunoistoquímica (IHC) para FOXP3 em tecido esplênico.	34
Análise Estatística.	34
Resultados.	34
Discussão.	42
REFERÊNCIAS.	44

TÍTULO - CÉLULAS CD4+FOXP3+ PRODUZEM IL-10 NO BAÇO DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO - A leishmaniose visceral (LV) é uma doença causada pelo parasita intracelular do gênero *Leishmania*, que acomete o homem e várias espécies animais. O cão é um dos principais reservatórios urbanos do parasita, e desempenha um papel central no ciclo de transmissão aos seres humanos pelos flebotomíneos. Estudos sobre a resposta imune em cães com Leishmaniose Visceral têm demonstrado que a imunidade protetora está associada à resposta imune do tipo celular, enquanto que a progressão da doença está associada à resposta humoral e à produção de IL-10 e TGF- β . Essas citocinas induzem a desativação de macrófagos e têm potencial para incapacitar a defesa do hospedeiro contra *Leishmania* spp., levando à visceralização da infecção. O objetivo do estudo foi avaliar a produção de IL-10 e de TGF- β por células T regulatórias (Treg) em amostras de sangue e de baço de cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp., e correlacionar à carga parasitária e aos achados histopatológicos. Cinco cães saudáveis e vinte e nove cães com manifestações clínicas de leishmaniose visceral e sorologia positiva para anticorpos anti-*Leishmania* foram incluídos no grupo de estudo. A PCR em tempo real foi utilizada para a quantificação da carga parasitária e para confirmação da infecção por *Leishmania* spp. Realizou-se, por citometria de fluxo, a quantificação das células T CD4 regulatórias produtoras de IL-10 e TGF- β . O teste t não pareado foi utilizado para comparar o percentual de células Treg produtoras de IL-10 e TGF- β entre os cães infectados e os saudáveis, e utilizou-se o teste de Mann-Whitney para comparar o percentual de IL-10 e TGF- β no sangue e no baço de cães com LV. A correlação de Spearman foi utilizada para comparar a porcentagem das citocinas IL-10 e TGF- β produzidas pelas células Treg à carga parasitária e aos achados histológicos. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Verificou-se um aumento da produção de IL-10 pelas células Treg no baço dos cães infectados naturalmente por *Leishmania* spp., ao mesmo tempo em que

se observou um decréscimo no número dessas células nesses cães em comparação aos cães saudáveis. Não foi verificada associação entre a carga parasitária e a porcentagem de células Treg esplênicas produtoras de IL-10 e TGF- β , assim como não houve associação entre essa população celular e as alterações estruturais e o padrão de intensidade da resposta inflamatória do tecido esplênico. Esses resultados sugerem que as células Treg são importantes como fontes de IL-10 no baço, participando da modulação da resposta imunológica e a redução na porcentagem dessas células nos cães infectados pode ser atribuída à persistente ativação imune.

Palavras-chave: doença do cão, citocinas, *Leishmania*, subpopulação de linfócitos, interleucina-10, fatores de crescimento transformadores

TITLE - CD4+FOXP3+ CELLS PRODUCE IL-10 IN SPLEEN FROM DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS

ABSTRACT – Visceral leishmaniasis (VL) is a disease caused by the intracellular parasite of the *Leishmania* genus that affects humans and several animal species. The dog is one of the main urban reservoirs of the parasite once it plays a central role in the transmission cycle to humans by sandflies. Studies about the immune response in dogs with visceral leishmaniasis have demonstrated that protective immunity is associated with the immune response of the cellular type, while disease progression is associated with the humoral response and IL-10 and TGF- β production. These cytokines induce the macrophages deactivation and have the potential to disable the host defense against *Leishmania* spp. leading to infection visceralization. The aim of this study was to evaluate the regulatory T cells (Treg) producing IL-10 and TGF- β in blood and spleen samples from dogs naturally infected by *Leishmania* spp. and correlate to the parasite load and histopathology. Five healthy dogs and twenty-nine dogs with clinical visceral leishmaniasis manifestations, and seropositivity for anti-*Leishmania* antibodies were included in the study group. The real-time PCR was used to quantify the parasite load and infection confirmation with *Leishmania* spp. The regulatory CD4 T cells producing IL-10 and TGF- β quantification was performed by flow cytometry. The unpaired t test was used to compare the percentage of Treg cells producing IL-10 and TGF- β between infected and healthy dogs. The Mann-Whitney test was used to compare the percentage of IL-10 and TGF- β in blood and spleen of the dogs with VL. The Spearman correlation was used to compare the percentage of IL-10 and TGF- β produced by Treg cells with the parasite load and the histological findings. Results were considered significant when the $p < 0.05$. There was an increased production of IL-10 by Treg cells in the spleen from dogs naturally

infected by *Leishmania* spp. while it was observed a decrease number of these cells in these dogs compared to healthy dogs. There was no correlation between parasite load and the percentage of splenic Treg cells producing IL-10 and TGF- β and there was no correlation between this cell population and structural changes in the pattern of inflammatory response of the splenic tissue. These results suggest that Treg cells are important sources of IL-10 in the spleen participating in the modulation of the immune response and the reduced percentage of these cells in infected dogs can be allocated to persistent immune activation.

Keywords: dog disease, cytokines, *Leishmania*, lymphocyte subset, interleukyn-10, transforming growth factors

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

- A Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma antropozoonose de grande importância para a Saúde Pública, dada a sua incidência e à alta mortalidade de indivíduos quando não tratados. Tem ampla distribuição geográfica, ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas (QUEIROZ et al., 2004). Na América do Sul, as primeiras notícias da doença datam de 1913, quando Mingone descreveu o primeiro caso em necropsia de paciente oriundo de Boa Esperança, Corumbá (ALENCAR et al., 1991). Em 1934, ao desenvolverem um estudo sobre a distribuição da febre amarela nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, foram encontrados 41 casos de pacientes também positivos para o protozoário causador da LV (PENNA et al., 1934). Em 2009, a região Nordeste representou 47,5% dos casos, seguida pelas regiões Norte (19,2%), Sudeste (17,4%), Centro-Oeste (7,4%) e Sul (0,2%). Atualmente, a doença está distribuída em 21 Unidades Federadas, atingindo as cinco regiões brasileiras (CVE, 2011).

No estado de São Paulo, a doença era conhecida apenas pelos casos importados; porém, em 1999, foi confirmado o primeiro caso canino autóctone no município de Araçatuba (LUVIZOTTO et al., 1999). Desde então, até outubro de 2011, foram confirmados 1875 casos humanos autóctones, com 159 óbitos. Dados disponíveis em novembro de 2011 sobre a epidemiologia da LV no estado de São Paulo apontaram a transmissão da doença em 66 municípios, que apresentaram casos humanos e casos caninos autóctones. Cinco registraram casos humanos autóctones, embora sem detecção de autoctonia canina (Álvaro de Carvalho, Jaú, Marília, Parapuã e Quintana), e 29 municípios apresentaram somente transmissão canina (BEPA, 2011).

Essa doença tem sido apontada como reemergente, apresentando nítido processo de transição epidemiológica e reincidência crescente nas áreas onde ocorria tradicionalmente. Porém também vem apresentando uma grande

expansão geográfica para outros estados que não apresentavam a doença. Cidades como: Boa Vista e Santarém (Região Norte); Teresina, São Luiz, Natal e Aracaju (Região Nordeste); Montes Claros e Belo Horizonte, Araçuaí, Sabará, Perdões e Rio de Janeiro (Região Sudeste) e Cuiabá (Região Centro-Oeste) já vivenciaram ou vivenciam, recentemente, epidemias de LV humana e canina (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

As espécies envolvidas na infecção da Leishmaniose Visceral variam conforme a região geográfica onde a doença ocorre, e são três os principais protozoários: *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) chagasi*. A *L. chagasi* é responsável pela LV em seres humanos e em cães nas Américas (LAINSON; SHAW, 1987; MARZOCHI et al., 1994).

Existem divergências sobre o uso do nome específico *chagasi* para o agente etiológico da leishmaniose visceral. Com base nos perfis isoenzimáticos, alguns autores consideram a *Leishmania (Leishmania) chagasi* igual à *Leishmania (Leishmania) infantum* e, por isso, o nome *chagasi* seria sinônimo de *infantum* (BRASIL, 2006). A denominação *Leishmania chagasi*, Cunha e Chagas, 1937, permanece a mais utilizada, apesar dos debates sobre a origem do parasita e de sua taxonomia (LAINSON et al., 2005).

Os insetos da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae são os agentes transmissores da LV (DESJEUX, 2004). Nas Américas, em praticamente todas as áreas de sua ocorrência, a principal espécie de flebotomíneos envolvida com a transmissão é a *Lutzomyia longipalpis*, (LAINSON; SHAW, 1987), embora na Colômbia e na Venezuela também tenha sido descrita a participação da *Lutzomyia evansi* (TRAVI et al., 1990; FELICIANGELI et al., 1991) e, no Brasil, nas cidades de Corumbá e Ladário, no estado de Mato Grosso do Sul, verificou-se a transmissão de LV pelo *Lutzomyia cruzi* (GALATI et al., 1997; SANTOS et al., 2003). Outras vias alternativas de transmissão em cão têm sido discutidas, como a ingestão de carrapatos e pulgas infectados (COUTINHO et al., 2005; FERREIRA et al.,

2009), venérea (SILVA et al., 2009), transplacentária (DUBEY et al., 2005) e transfusão sanguínea (FREITAS et al., 2006).

A infecção do vetor ocorre pela ingestão, durante o repasto sanguíneo, de formas amastigotas da *Leishmania* spp. existentes no interior dos macrófagos, presentes na derme do hospedeiro infectado. No tubo digestivo do vetor, os parasitas transformam-se em promastigotas, que se multiplicam e, após o repasto contaminante, as fêmeas do flebotomíneo tornam-se infectantes. Por ocasião de um novo repasto sanguíneo, as formas promastigotas são inoculadas no hospedeiro e são fagocitadas pelos macrófagos, retornando à forma amastigota, quando se multiplicam até rompê-los para serem fagocitadas por novos macrófagos. Dessa forma, ocorre disseminação hematogênica em órgãos como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (LAINSON; SHAW, 1987; REY, 2008).

As leishmanioses possuem como reservatório vertebrado uma grande variedade de mamíferos, sendo mais comuns os marsupiais, os primatas e os canídeos (LAINSON; SHAW, 1987; MARZOCHI et al., 1994). O cão é o principal reservatório doméstico de *Leishmania* spp., pois apresenta intenso parasitismo cutâneo, estreito contato com o homem e principalmente por servir de fonte de alimento para o inseto vetor (BRASIL, 2006).

Segundo Baneth e Jaffe (1999), pode-se distinguir LV canina conforme o número de sinais clínicos apresentados. São ditos sintomáticos os cães com sinais clínicos típicos, tais como lesões cutâneas - alopecia generalizada ou localizada, descamação, eczema em focinho e orelhas, pelos opacos, ulcerações nas orelhas, focinho, cauda e articulações -, perda de peso e do apetite, linfadenopatia localizada ou generalizada, lesões oculares, ceratoconjuntivite bilateral, epistaxis, anemia, falência renal, diarreia crônica, onicogribose, coriza e edema das patas. Em casos avançados, são relatadas: apatia e sonolência intensas, neuralgia, poliartrite, polimiosite, rachaduras no coxim plantar, úlceras interdigitais, lesões ósseas ou periostite proliferativa. Os cães oligossintomáticos possuem sinais clínicos pouco característicos, e a sorologia, em geral, resulta em títulos baixos. Esses cães podem evoluir para a

cura ou desenvolver a doença, quase sempre após um longo período de incubação. Os cães assintomáticos não apresentam sinais clínicos, porém os exames sorológicos e parasitológicos são positivos.

Tafuri et al. (1996) e Santana et al. (2008) verificaram no baço de cães com LV centros germinativos com intensa presença de linfoblastos, macrófagos (contendo ou não parasitas), linfócitos e corpos apoptóticos, além de intensa proliferação da zona marginal, consistindo de linfócitos e macrófagos. A polpa vermelha demonstrou hipertrofia e hiperplasia, consistindo primariamente de células mononucleares com intenso parasitismo. Alexandre-Pires et al. (2006) verificaram no baço de cães com LV um infiltrado de células mononucleares na polpa vermelha e a substituição de linfócitos por macrófagos na polpa branca.

- Resposta Imunológica Canina à Leishmaniose Visceral

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

A invasão do hospedeiro por *Leishmania* spp. envolve componentes da imunidade inata e adaptativa, bem como de resposta imunológica humoral e celular (REIS et al., 2009). Na infecção por *Leishmania infantum*, mostrou-se que a imunidade inata tem um papel crucial no controle da disseminação do parasita, e que as primeiras células a surgirem no local de infecção são os neutrófilos, dando início à fagocitose dos promastigotas, seguidos pelos macrófagos (SANTOS-GOMES et al., 2002).

Sendo o parasita obrigatoriamente intracelular, o seu primeiro alvo são os fagócitos. Porém, o controle da infecção está associado à destruição intracelular dos amastigotas pelos macrófagos, pela ativação das células NK e pelos linfócitos T (MURRAY, 1988).

Além da imunidade inata, a infecção por *Leishmania* spp. pode desencadear a imunidade adaptativa associada à atividade dos linfócitos. As células T desempenham um papel central na imunidade à leishmaniose, influenciando na produção e na interação das citocinas com os macrófagos infectados e desenvolvendo assim a resistência ou a susceptibilidade à doença. Cães assintomáticos possuem um perfil de resposta do tipo Th1, em que a produção de citocinas como Interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-12 e IL-2 mantém seu aspecto clínico saudável (PINELLI et al., 1994; SANTOS-GOMES et al., 2002). Na LVC, essas citocinas influenciam no aumento da produção e proliferação de linfócitos e na atuação citotóxica das células T CD8 (PINELLI et al., 1994; PINELLI et al., 1995).

Cães sintomáticos possuem redução do número de células T (BRANDONISIO et al., 1998), redução de moléculas co-estimulatórias B-7 atuantes na ativação de proliferação de linfócitos (PINELLI et al., 1999), aumento no número de anticorpos desencadeando em formação de imunocomplexos (BOURDOISEAU et al., 1997) e aumento de citocinas como IL-10 e TGF- β , que regulam a atuação da resposta efetiva de Th1 (CORRÊA et al., 2007; LAGE et al., 2007). Nos animais sintomáticos, em que o parasitismo é elevado, verificou-se no linfonodo um acúmulo das citocina IL-10 e TGF- β que contribuíram para o estabelecimento da infecção (ALVES et al., 2009).

- As células T regulatórias (Treg)

As células T CD4⁺ regulatórias (CD4⁺CD25⁺) são um subtipo de linfócito CD4 relacionado com a modulação da magnitude da resposta imunológica, promovendo a supressão da atividade das células efetoras, importante para a manutenção da homeostasia imunológica e que, no entanto, favorece a sobrevivência de parasitas (SAKAGUCHI, 2000).

Durante a diferenciação no timo, as células T são selecionadas positivamente para tornarem-se CD4⁺CD8⁻ ou CD4⁻CD8⁺; ou negativamente, para que as células auto-reativas sejam ativamente eliminadas. Dentre as

populações geradas positivamente, estão as células T CD4⁺ naive, que podem se diferenciar, logo após a interação com antígenos apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), em uma variedade de subpopulações, que incluem as células Th1, Th2, Th17 e Tregs (SAKAGUCHI, 2000). As Tregs naturais podem ser divididas em dois tipos: aquelas que são geradas naturalmente no timo - chamadas de T regs naturais (nTregs) - e aquelas que se diferenciam na periferia após sofrer estímulo de algumas citocinas, chamadas de Tregs adaptativas ou Tregs induzidas (iTregs) (WING et al., 2008).

As nTreg são originadas durante o processo de seleção tímica após a interação com as DCs medulares. Nesse processo, adquirem um fenótipo caracteristicamente supressor. Ainda que as moléculas envolvidas na regulação por Tregs tímicas não tenham sido totalmente caracterizadas, sabe-se que a sua atuação é dependente de contato *in vitro*, mas *in vivo* também pode ser mediada por citocinas (JONULEIT et al., 2001).

Segundo Sakaguchi (2001), além de expressar altos níveis de CD25, as Tregs expressam também o CTLA-4 (antígeno-4 associado ao linfócito T citotóxico), TNF, GITR (fator de crescimento tumoral induzido por glicocorticoide) e FOXP3 (fator de transcrição forkhead boxp3). O FOXP3 é reconhecido como o maior controlador das funções das células regulatórias; dessa forma, as células FOXP3⁺ são importantes na prevenção da autoimunidade durante toda a vida (TANG et al., 2008).

- Citocinas IL-10 e TGFβ

A Interleucina-10 (IL-10) é reconhecida pela sua capacidade de inibir a ativação e a função efetora de células T, monócitos e macrófagos. Ela regula o crescimento e/ou diferenciação de células B, células NK, citotóxicas, mastócitos, granulócitos, células dendríticas, queratinócitos, células endoteliais e células T helper. A IL-10 desempenha um papel fundamental na diferenciação e função das células T regulatórias, que podem atuar no controle

da resposta imune e tolerância in vivo e na regulação de respostas imunes e inflamatórias (MOORE et al., 2001).

A família de proteínas do fator de crescimento transformador (TGF- β) é um conjunto de moléculas sinalizadoras secretadas com única e potente propriedade imune. O TGF- β é produzido por toda linhagem de leucócitos, incluindo linfócitos, macrófagos e células dendríticas. Atuando tanto de modo autócrino como parácrino, controlando a proliferação, diferenciação e estado de ativação dessas células do sistema imunológico. Esta citocina pode modular a expressão de moléculas de adesão, fornecer gradiente quimiotático para leucócitos e outras células inibindo a resposta inflamatória. O aumento da produção e ativação de TGF- β latente tem sido associadas às doenças autoimunes e neoplasias, além da suscetibilidade à infecção oportunista (LETTERIO et al., 1998).

Como as células Tregs podem suprimir as respostas imunes contra tumores e patógenos microbianos com o auxílio da expressão acentuada de citocinas regulatórias IL-10 e TGF- β (SAKAGUCHI, 2000), é possível que essas células participem da modulação da resposta efetiva à leishmaniose visceral.

Em modelo experimental com LV demonstrou uma grande produção de TGF- β pelas células Treg naturais no baço e nos linfonodos, e que foram cruciais para a persistência da infecção (RODRIGUES et al., 2009). Na Índia, estudos com pacientes antes e depois do tratamento para kalazar, revelaram no sangue maior porcentagem de citocinas IL-10 produzidas pelas células T regulatórias antes do tratamento, o que foi associado ao aumento da carga parasitária (VERMA et al., 2011). Porém, Nylén et al. (2007) não encontraram associação entre a regulação da resposta feita pela citocina IL-10 e a presença de células Treg no baço de humanos com LV.

Estudos recentes sobre atuação das células Treg no sangue de cães com melanoma e carcinoma demonstraram que essas células, através da citocina IL-10, modularam a resposta imune e, dessa forma, auxiliaram na persistência da doença (BILLER et al., 2007; O'NEILL et al., 2009). Keppel et

al. (2008), verificaram que após imunoterapia com vacina em cães com dermatite houve um aumento na porcentagem de células Treg e incremento na produção de citocinas IL-10 resultando na melhora significativa da doença.

Menezes-Souza et al. (2011) verificaram na pele de cães com LV sintomáticos um nível elevado de IL-10 e TGF- β , que podem estar associadas à supressão da resposta imunológica do tipo celular da após a infecção, pois verificou-se uma correlação positiva entre a expressão dessas citocinas e de FOXP3. Ao estudar o baço de cães com LV, Freire (2010) verificou que cães oligossintomáticos apresentaram baixos níveis dessas células comparados aos cães assintomáticos. Além de observar que a quantidade de células Treg tendia a ser maior nos animais com maior quantidade de manifestações clínicas comparado aos cães assintomáticos.

Em virtude da importância de compreender a atuação das células T regulatórias na LVC e a sua associação com as citocinas IL-10 e TGF- β o objetivo do presente estudo foi verificar a presença das células T regulatórias no baço de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* e avaliar a sua ação modulatória através das citocinas IL-10 e TGF- β verificando se estas células auxiliam na persistência da doença e se estão associadas ao aumento da carga parasitária.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, J. E.; DIETZE, R. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 706-717.
- ALEXANDRE-PIRES, G.; PAIS, D.; CORREIA, M.; PINA, J. A. Leishmaniosis-- a report about the microvascular and cellular architecture of the infected spleen in *Canis familiaris*. **Microscopy Research and Technique**, v.69, p. 227-35, 2006.
- ALVES, C. F.; DE AMORIM, I. F.; MOURA, E. P.; RIBEIRO, R. R.; ALVES, C. F.; MICHALICK, M. S.; KALAPOTHAKIS, E.; BRUNA-ROMERO, O.; TAFURI, W. L.; TEIXEIRA, M. M.; MELO, M. N. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha,

IL-10 and TGF-beta 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, 349-358, 2009.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**, v.20, p. 259-265, 2004.

BANETH, G.; JAFFE, C. L. Canine visceral Leishmaniasis in Israel: an overview of an emerging disease with reference to wild canids and human infection. In: **Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum**. Barcelona, Spain, p.40-44, 1999.

BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine Leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.28, p.329-37, 2006.

BEPA. Boletim Epidemiológico do Estado de São Paulo. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo. Atualizado em novembro de 2011, **BEPA**: v.8, p. 32-36, 2011.

BILLER, B. J.; ELMSLIE, R. C.; BURNETT, R. C.; AVERY, A. C.; DOW, S. W. Use of FOXP3 expression to identify regulatory t cells in healthy dogs and dogs with cancer. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.116, p. 69-78, 2007.

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

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; HOAREAU, E.; BOEHRINGER, C.; STOLLE, T.; CHABANNE, L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum* infected treated and untreated dogs. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.59, p. 21-30, 1997.

- BRANDONISIO, O.; ALTAMURA, M.; CARELLI, G.; CECI, L.; ANTONACI, S.; JIRILLO, E. Lymphocyte functions in *Leishmania infantum* infected dogs. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 9, p. 37–40, 1988.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 136p.
- CVE - CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Leishmaniose Visceral Americana. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br>>. Acesso em 20 dez. 2011.
- CORRÊA, A. P.; DOSSI, A. C.; VASCONCELOS, R. O.; MUNARI, D. P.; LIMA, V. M. F. Evaluation of transformation growth factor beta1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 143, p. 267–274, 2007
- COUTINHO, M. T. Z.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 149-155, 2005.
- CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, n. 72, p. 132-141, 2002.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 27, p. 305-318, 2004.
- DUBEY, J. P.; ROSYPAL, A. C.; PIERCE, V.; SCHEINBERG, S. N.; LINDSAY, D. S. Placentitis associated with Leishmaniasis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, p. 1266–1269, 2005.
- FELICIANGELI, M. D. Vectors of Leishmaniasis in Venezuela. **Parasitologia**, v.33, p. 229 -239, 1991.

- FERREIRA, M. G. P. A.; FATTORI, K. R.; SOUZA, F.; LIMA, V. M. F. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 150-154, 2009.
- FREIRE, S. M. **Células T reguladoras (T reg) e sua relação com as alterações esplênicas e com as manifestações clínicas de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 69f. Tese (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, 2010.
- FREITAS, E.; MELO, M. N.; COSTA-VAL, A. P.; MICHALICK, M. S. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 159-167, 2006.
- GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; REGO, F. A.; RODRIGUES, M. Estudo de flebotomíneos (Díptera, Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Saúde Pública**, v.31, p. 378-390, 1997.
- JONULEIT, H.; SCHMITT, E.; M. STASSEN, M.; TUETTENBERG, A.; KNOP, J.; ENK, A. H. Identification and functional characterization of human CD4+ CD25+ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. **The Journal of Experimental Medicine**, v.193, 1285-1294, 2001.
- KEPPEL, K. E.; CAMPBELL, K. L.; ZUCKERMANN, F. A.; GREELEY, E. A.; SCHAEFFER, D. J.; HUSMANN, R. J. Quantitation of canine regulatory T cells population, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.123, p. 337-344, 2008.
- LAGE, R.; OLIVEIRA, G.; BUSEK, S.; 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 Immunopathology**, v.153, 135–145, 2007.

- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (eds). The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic Press, 1987, p.1-20.
- 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**, v. 100, p. 811-827, 2005.
- LETTERIO, J. J.; ROBERTS, A. B. Regulation of Immune response by TGF- β . **Annual Review Immunology**, v.16, p. 137-161, 1998.
- LUVIZOTTO, M. C. R.; BIAZZONO, L.; EUGÊNIO, F. R.; ANDRADE, A. L. Leishmaniose visceral canina autóctone no município de Araçatuba-SP. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS**, 1999. **Anais...** Águas de Lindóia, 1999, v.2, p. 24- 25,.
- MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F.; CARVALHO, R. W. Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro. **Parasitology Today**, v.10, p.37- 34, 1994.
- 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. Interferon-gamma, the activated macrophage and host defense against microbial challenge. **Annals of Intern Medicine**, v.108, p. 595–608, 1988.
- MOORE, K. W.; DE WALL MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L.; O’GARRA, A. Interleukin-10 and Interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, v.19, p.683-765, 2001.
- NYLÉN, S.; MAURYA, R.; EIDSMO, L.; MANANDHAR, K. D.; SUNDAR, S.; SACKS, D. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (FOXP3) regulatory T cells in human visceral Leishmaniasis. **The Journal of Experimental Medicine**, v.204, p.805–817, 2007.

- O'NEILL, K.; GUTH, A.; BILLER, B.; ELMSLIE, R.; DOW, S. Changes in regulatory T cells in dogs with cancer and associations with tumor type. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, 875-81, 2009.
- PENNA, H.A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil-Médico**, v.48, p.949-50, 1934.
- PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v.62, p.229-335, 1994.
- PINELLI, E.; GONZALO, R.M.; BOOG, C.J.; RUTTEN, V.P.; GEBHARD, D.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, E.J. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **European Journal of Immunology**, v.25, p.1594–1600, 1995.
- PINELLI, E.; RUTTEN, V. P. M. G.; BRUSTERS, M.; MOORE, P. F.; RUITENBERG, E. J. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. **Infection and Immunity**, v.67, p. 237–243, 1999.
- QUEIROZ, M. J.; ALVES J. G.; CORREIA, J. B. Leishmaniose Visceral: características clinico-epidemiológicas em crianças e área endêmica. **Journal Pediatric**, v. 80, p.141-146, 2004.
- 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 Immunopathology**, v.15, p. 87-95, 2009.
- REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C.; CARRILLO, E.; MARTINS-FILHO, O. A.; MORENO, J. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine Leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v.26, p.341-349, 2010.
- REY, L. **Parasitologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

- RODRIGUES, O. R.; MARQUES, C.; SOARES-CLEMENTE, M.; FERRONHA, M. H.; SANTOS-GOMES, G. M. Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection. **Immunobiology**, v.214, p. 101-111, 2009.
- SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. **Cell**, v.101, p. 455–458, 2000.
- SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; SHIMIZU, J.; YAMAZAKI, S.; SAKIHAMA, T.; ITOH, M. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. **Immunology Review**, v.182, p.18–32, 2001.
- SANTANA, C. C.; VASSALLO, J.; DE FREITAS, L. A. R.; OLIVEIRA, G. G. S.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C. W.; DOS-SANTOS, L. C. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral Leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. **Parasite Immunology**, v.30, n.10, p.515–52, 2008.
- SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; HOFFMANN, M. P.; FURLAN, M. B. G.; FERREIRA, W. F.; PEREIRA, C.; FERREIRA, L. The presence of *Lutzomyia longipalpis* in focus of American Leishmaniasis where only proven vector in *L. cruzi*. Corumbá, Mato Grosso do Sul State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 633-634, 2003.
- SANTOS-GOMES, G.M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMAO, P.; SILVEIRA, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.88, p. 21–30, 2002.
- SILVA, F. L.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Venereal transmission of canine visceral Leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.160, p. 55-59, 2009.
- TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L.; BARBOSA, J. A.; MICHALICK, M. S.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J. C.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected

with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.38, p.81-89, 1996.

TANG, Q.; BLUESTONE, J. A. The FOXP3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. **Nature Immunology**, v.9, p.239-244, 2008.

TRAVI, B.L.; VÉLEZ, I. D.; BRUTUS, L.; SEGURA, I.; JARAMILLO, C.; MONTOYA J. *Lutzomyia evansi*, an alternative vector of *Leishmania chagasi* in Colombia focus of Visceral Leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, p.676-677, 1990.

VERMA, S.; KUMAR, R.; KATARA, G. K.; SINGH, C. L.; NEGI, N. S.; RAMESH, V.; SALOTRA, P. FOXP3 Quantification of Parasite Load in Clinical Samples of Leishmaniasis Patients: IL-10 Level Correlates with Parasite Load in Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v.5, e1171, 2011.

WING, K.; ONISHI, Y.; PRIETO-MARTIN, P.; YAMAGUCHI, T.; MIYARA, M.; FEHERVARI, Z.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. CTLA-4 control over FOXP3+ regulatory cell function. **Science**, v.322, p.271–275, 2008.

CAPÍTULO 2 - CÉLULAS CD4+FOXP3+ PRODUZEM IL-10 NO BAÇO DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

Mariana Macedo C. de Andrade^a, Larissa M. Melo^a, Rosemeri O. Vasconcelos^b,
Danisio Prado Munari^c, Valéria Marçal F. Lima^d

^aPós-graduação em Ciência Animal Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista - Araçatuba- SP, Brasil

^bDepartamento de Patologia Veterinária – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - Universidade Estadual Paulista - Jaboticabal - SP, Brasil.

^cDepartamento de Ciências Exatas- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista - Jaboticabal - SP, Brasil.

^dDepartamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária-Universidade Estadual Paulista - Araçatuba, SP, Brasil.

RESUMO - A leishmaniose visceral (LV) é uma doença causada pelo parasita intracelular do gênero *Leishmania*, que acomete o homem e várias espécies animais. O cão é um dos principais reservatórios urbanos do parasita, e desempenha um papel central no ciclo de transmissão aos seres humanos pelos flebotomíneos. Estudos sobre a resposta imune em cães com Leishmaniose Visceral têm demonstrado que a imunidade protetora está associada à resposta imune do tipo celular, enquanto que a progressão da doença está associada à resposta humoral e à produção de IL-10 e TGF- β . Essas citocinas induzem a desativação de macrófagos e têm potencial para incapacitar a defesa do hospedeiro contra *Leishmania* spp., levando à visceralização da infecção. O objetivo do estudo foi avaliar a produção de IL-10 e de TGF- β por células T regulatórias (Treg) em amostras de sangue e de baço

de cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp., e correlacionar à carga parasitária e aos achados histopatológicos. Cinco cães saudáveis e vinte e nove cães com manifestações clínicas de leishmaniose visceral e sorologia positiva para anticorpos anti-*Leishmania* foram incluídos no grupo de estudo. A PCR em tempo real foi utilizada para a quantificação da carga parasitária e para confirmação da infecção por *Leishmania* spp. Realizou-se, por citometria de fluxo, a quantificação das células T CD4 regulatórias produtoras de IL-10 e TGF- β . O teste t não pareado foi utilizado para comparar o percentual de células Treg produtoras de IL-10 e TGF- β entre os cães infectados e os saudáveis, e utilizou-se o teste de Mann-Whitney para comparar o percentual de IL-10 e TGF- β no sangue e no baço de cães com LV. A correlação de Spearman foi utilizada para comparar a porcentagem das citocinas IL-10 e TGF- β produzidas pelas células Treg à carga parasitária e aos achados histológicos. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Verificou-se um aumento da produção de IL-10 pelas células Treg no baço dos cães infectados naturalmente por *Leishmania* spp., ao mesmo tempo em que se observou um decréscimo no número dessas células nesses cães em comparação aos cães saudáveis. Não foi verificada associação entre a carga parasitária e a porcentagem de células Treg esplênicas produtoras de IL-10 e TGF- β , assim como não houve associação entre essa população celular e as alterações estruturais e o padrão de intensidade da resposta inflamatória do tecido esplênico. Esses resultados sugerem que as células Treg são importantes como fontes de IL-10 no baço, participando da modulação da resposta imunológica e a redução na porcentagem dessas células nos cães infectados pode ser atribuída à persistente ativação imune.

Palavras-chave: doença do cão, citocinas, *Leishmania*, subpopulação de linfócitos, interleucina-10, fatores de crescimento transformadores

Introdução

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença crônica grave potencialmente fatal para o homem, causada por diferentes espécies de *Leishmania* spp. (DESJEUX, 2004). Tem ampla distribuição geográfica, ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas, onde já foi descrita em 12 países (BRASIL, 2008). O Brasil enfrenta atualmente a expansão e urbanização da LV. O ciclo de transmissão, que anteriormente ocorria no ambiente silvestre e rural, hoje também se desenvolve em centros urbanos, o que cria condições favoráveis para a emergência e reemergência de doenças (DESJEUX, 2004). Associado a isso ainda há as mudanças ambientais e climáticas, a adaptação do vetor aos ambientes modificados pelo homem e ao crescimento de doença que compromete o sistema imunológico, como HIV, colabora para a reemergência da doença (GONTIJO et al., 2004).

O cão apresenta intenso parasitismo cutâneo e possui estreito contato com o homem (QUARESMA et al., 2009). Em áreas endêmicas, até 85% de cães infectados podem ser assintomáticos, representando, dessa forma, grande risco por ser o principal reservatório doméstico de *Leishmania* spp. (MICHALSKY et al., 2007).

As células T são fundamentais para a regulação da resposta imune na LVC, pois o resultado da doença é determinado pela forma como é orientada a resposta através de citocinas produzidas por elas no início da infecção (PINELLI et al., 1994). A resistência à LV canina tem sido associada com a ativação da resposta celular, que produz, IFN- γ , IL-2 e TNF- α (PINELLI et al., 1995). Na pele de cães infectados com LV verificou-se, resposta imunológica mista, apresentando INF- γ e prevalência da citocina IL-10 (BOGGIATTO et al., 2009). Alves et al. (2009) avaliaram a expressão de citocinas no linfonodo de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* e observaram que os cães com alto parasitismo expressaram porcentagem maior de IL-10 e TGF- β comparado aos cães com baixo parasitismo. Lage et al. (2007) verificou no baço uma correlação positiva entre o nível de expressão de IL-10 e o avanço da LVC.

As citocinas IL-10 e TGF- β podem ser produzidas por muitos tipos de células, incluindo linfócitos B, macrófagos e linfócitos T CD4+, atuando principalmente na desativação dos efeitos às células-alvo, ou seja, antagonizando as funções das células dendríticas e dos macrófagos, de forma a não responderem a sinais de ativação (MCCARTNEY-FRANCIS; WAHL, 1994; GESSER et al., 1997).

Na LV, estas citocina regulatória têm sido repetidamente apontadas como um fator de imunossupressão em humanos e em modelos experimentais (GHALIB et al., 1993, WILSON et al., 1998; RODRIGUES et al., 1998). Pacientes humanos com estágio avançado da doença apresentaram níveis elevados de IL-10 e TGF- β no soro e alta expressão dessas citocina em lesões no tecido (GANNTT et al., 2003; SAHA et al., 2007). Camundongos Balb/c e C57BL/6 depletados de IL-10 se apresentaram resistentes à infecção por *L. donovani* (MURPHY et al., 2001; MURRAY et al., 2003). Foi verificado no baço de cães com LV altos níveis de citocinas inflamatórias regulatórias como o TGF- β e IL-10 que foram associadas à progressão da doença (CORRÊA et al., 2007; RODRIGUES et al., 2009).

Vêm sendo descritas várias subpopulações de células T produzindo IL-10 e TGF- β , que possuem em comum a inibição da resposta de outras células T (MILLS, 2004; FEHERVARI; SAKAGUCHI, 2004). Dentre elas, a melhor caracterizada é a célula T regulatória, um subconjunto de células T CD4+ que é definida pela sua expressão da cadeia constitutiva IL-2R- α (CD25) (SAKAGUCHI et al., 1995) e mais especificamente pela expressão do fator transcricional FOXP3 (RAMSDELL, 2003). Outras moléculas de expressão constitutiva de células Treg são os receptores de TNF- α induzidos por glicocorticoides relacionados ao gene (GITR) (SHIMIZU et al., 2002), antígeno 4 de linfócitos T citotóxicos (CTLA-4) (READ et al., 2000) e uma cadeia da integrina $\alpha\epsilon\beta7$ (CD103) (MCHUGH et al., 2002).

As células T regulatórias naturais possuem como principal função reprimir a resposta imune excessiva ou mal orientada, bem como as respostas dirigidas contra tumores e patógenos microbianos (FURTADO et al., 2002).

Em humanos e camundongos essas células somam de 5 a 10% dos linfócitos totais do sangue (SAKAGUCHI et al., 1995), nos cães, elas constituem 3% (PINHEIRO et al., 2011).

Estas células Treg naturais produzem grandes quantidades de IL-10 e TGF- β que em alguns sistemas experimentais in vivo, são responsáveis por atividade supressora da atividade imune (CHEN et al., 1994). Modelos experimentais de LV demonstraram que as Treg atuaram de forma regulatória através da expressão de TGF- β ; porém estas células não foram a principal fonte de IL-10 (RODRIGUES et al., 2009).

Em humanos com LV ainda é controverso o papel imunomodulatório das citocinas IL-10 e TGF- β associado às células T regulatórias. Foi verificado no sangue de pacientes com Kalazar uma porcentagem maior de células Treg produzindo IL-10 antes de serem tratados, associando-se a elas a persistência da doença (VERMA et al., 2011). Entretanto, verificou-se a ação modulatória da IL-10 em LV associada a outros linfócitos que não regulatórios (NYLÉN et al., 2007).

Estudos desenvolvidos com células T regulatórias em cães com câncer demonstraram que estas células contribuíram para o agravamento dessas doenças através da secreção da citocina IL-10 no sangue (BILLER et al., 2007; O'NEILL et al., 2009). Observou-se, em cães com alergia, uma melhora da doença após imunoterapia devido ao aumento de células Treg (KEPPEL et al., 2008). Cães com LV sintomáticos apresentaram uma porcentagem menor de células Treg no baço em comparação aos cães assintomáticos (FREIRE, 2010). Porém, o papel regulatório das células T CD4+FOXP3+ em cães com LV não foi bem evidenciado; portanto, o objetivo deste estudo foi quantificar as células T regulatórias no sangue e no baço e verificar sua função reguladora através das citocinas IL-10 e TGF- β , associando estes dados à carga parasitária e aos achados histopatológicos.

Material e Métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal e Experimentação da FMVA/UNESP pelo protocolo nº 002232.

Animais:

Foram selecionados na área endêmica de Araçatuba, SP, vinte e nove cães adultos machos e fêmeas (n=29), naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi*, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (Grupo infectado). Para inclusão neste estudo, os cães apresentaram pelo menos 3 sinais clínicos da doença e foram soropositivos para *L. (L.) chagasi* por meio da técnica de ELISA (LIMA et al., 2003). Os animais tiveram o diagnóstico confirmado através da PCR em tempo real.

Foram também incluídos nos estudo cinco cães fêmeas (n=5) comprovadamente saudáveis (Grupo controle), apresentando hemograma normal e diagnóstico negativo para leishmaniose pela técnica de ELISA e PCR em tempo real.

Coleta das amostras:

Animais infectados: Os cães foram eutanasiados pelo seguinte processo: inicialmente tranquilizados com 0,05mg/Kg de maleato de acepromazina, seguido de administração rápida (20s) de 15mg/Kg de tiopental sódico e de 10mL de cloreto potássio 19,1% pela mesma via. Amostras do baço obtidas foram mantidas em RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Sigma) a 4°C e processadas imediatamente para quantificação de células T regulatórias produtoras de IL-10 e TGF-β por citometria de fluxo. De cada cão foi colhido 2 ml de sangue de sangue total sem anti-coagulante em temperatura ambiente por 4h e posteriormente centrifugado para extração do soro. As amostras de soro foram armazenadas a 20°C para avaliação sorológica. 4mL de sangue adicionais coletados com EDTA de sódio foram processados imediatamente para quantificação de células T regulatórias produtoras de IL-10 e TGF-β por citometria de fluxo.

Animais saudáveis: as amostras de baço foram retiradas por excisão cirúrgica. Os cães foram pré-medicados com a combinação de morfina (0,4 mg kg⁻¹ IM) e acepromazina (0,05 mg kg⁻¹ IM). Quinze minutos depois a anestesia foi induzida por propofol (4,0 mg kg⁻¹ IV) e midazolam (0,1 mg kg⁻¹ IV). Imediatamente, os cães foram posicionados em decúbito dorsal e a anestesia foi mantida com isoflurano (1,5%V). A frequência cardíaca e respiratória, a pressão arterial sistólica e medições de CO₂ foram monitoradas durante todo o procedimento anestésico. As amostras foram mantidas em RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Sigma) a 4°C e processadas imediatamente para quantificação de células T regulatórias produtoras de IL-10 e TGF-β por citometria de fluxo. De cada cão foi colhido 2 ml de sangue da veia cefálica sem anti-coagulante em temperatura ambiente por 4h e posteriormente centrifugado para extração do soro. As amostras de soro foram armazenadas a 20°C para avaliação sorológica. 4mL de sangue adicionais coletados com EDTA de sódio foram processados imediatamente para quantificação de células T regulatórias produtoras de IL-10 e TGF-β por citometria de fluxo.

Detecção de anticorpo *L. chagasi* pelo ELISA

A triagem dos animais positivos e negativos foi realizada pelo ensaio sorológico ELISA, usando como antígeno um lisado total de promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*. Para a preparação do antígeno, os parasitas foram mantidos em cultura a 26°C em meio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis U.S.A.). A preparação do antígeno e o procedimento do ensaio ELISA foram realizados como descrito por Lima et al. (2003).

A densidade óptica (DO) foi obtida utilizando o leitor Spectra Count TM (Packard Bio Science Company, U.S.A.). O ponto de corte foi determinado com o soro de cães saudáveis, de área não endêmica, utilizando como referência a média mais 3 vezes o desvio-padrão obtido no grupo (Voller et al., 1980).

Avaliações das células T CD4⁺FOXP3⁺IL-10⁺ e T CD4⁺FOXP3⁺TGFβ⁺

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram separadas com Ficoll–Paque (Amersham Biosciences®) de acordo com as recomendações do fabricante. Para a lise das hemácias, foram adicionados às células isoladas, 5mL de tampão de lise (NH₄Cl 0,16M e Tris 0,17M). Após a incubação a 4°C por 10 min., a suspensão foi centrifugada a 2000 RPM por 5 min., e adicionado 30mL de PBS as células e, após ressuspensão em “vortex”, as células foram centrifugadas a 2000 RPM por 5 min. Esse procedimento foi repetido três vezes. Posteriormente o volume de células foi ajustado para 1000uL contendo 10⁶ células.

Um fragmento de 2cm² do baço foi macerado com auxílio de pinças anatômicas e adicionados 10mL de meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich, Gilligham, UK) acrescido de 100 U/mL de penicilina/streptoamicina e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). Após a retirada dos “debris” celulares a suspensão foi realizada lise das hemácias utilizando o procedimento já descrito.

Após o bloqueio dos receptores Fc com PBS 0,5%BSA (tampão fosfato salino 0,15 M, pH 7,2 suplementado com 5% de SBF e 0,5% de Albumina Sérica) por 30 min. a 4°C, as células foram fixadas em tampão comercial (Invitrogen,CA) por 10 minutos a 4°C e, posteriormente, foram permeabilizadas com 500μL de tampão de permeabilização comercial (Invitrogen,CA) por 3 min. a temperatura ambiente. Para detecção das citocinas na população de células Treg, as células foram triplamente marcadas com os anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos: Anti-CD4 canino conjugado à isotiocianato de fluoresceína-FITC (AbD Serotec, UK); anti-FOXP3 de rato/camundongo conjugado à ficoetrinina-PE (eBioscience, San Diego, CA) (BILLER et al., 2007); anti-IL-10 humano conjugado à AlexaFluor 647 (eBioscience, San Diego, CA) (LU et al., 1995), anti-TGF-β1 humano conjugado à AlexaFluor 647 (Biolegend, USA)(CORRÊA et al., 2007) e os isotipos controles conjugados a FITC, PE e AlexaFluor 647 de acordo com as recomendações do fabricante. Após incubação por 30 minutos a 4°C e lavagem com PBS (ph-7,0), as células marcadas foram ressuspendidas em tampão de fixação (Formol 10%).

Posteriormente, as amostras foram adquiridas no citômetro EasyCyte mini® (Guava, Hayward, CA), e as análises realizadas no Software Express Plus® Guava. Para análise das diferentes populações imunomarcadas 10.000 eventos foram adquiridos.

Quantificação da carga parasitária de *Leishmania spp.* por PCR em Tempo Real.

O DNA foi extraído de 0,25 mg do tecido esplênico de cada animal incluído no grupo experimental, utilizando o kit de extração de DNA (DNeasy®, USA) seguindo as recomendações do fabricante. A detecção de DNA de *Leishmania spp.* foi realizada pelo método de PCR em Tempo Real utilizando SYBR Green (SYBR® GreenER, CA) e os primers 13A (3'GTG GGG GAG GGG CGT TCT5') e 13B (3'ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT5') (Rodgers et al., 1990) em uma concentração de 10mM.

Para o desenvolvimento da curva padrão da reação foi feita uma diluição seriada do DNA de *L. chagasi*, isolando 10^5 a 10^{-2} parasitas. A especificidade e a eficiência da reação foi avaliada segundo Too (2003).

O ciclo de temperaturas programado no termociclador (Eppendorf Mastercycler® Realplex, USA) foi: um aquecimento inicial de 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 63°C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos. Foi feita uma extensão final de 72°C por 5 minutos e posteriormente, uma curva de "melting" a 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos, 20 minutos até chegar à temperatura de 95°C por 15 segundos.

Análise em microscopia de luz

Os fragmentos de baço foram fixados em solução de formol a 10%, tamponada com fosfatos (pH 7,2), incluídos em parafina, cortados em micrótomo na espessura de 5µm e corados com Hematoxilina e Eosina, para a análise das alterações morfológicas. Neste órgão foi avaliada a organização (score 1) e a desorganização da poupa branca (score 2) e o padrão e intensidade da resposta inflamatória, feita por escores: discreta (1); moderada

(2) ou acentuada (3), bem como foram avaliados os tipos celulares predominantes no infiltrado inflamatório esplênico e hepático (plasmócitos, macrófagos, linfócitos)

Imunoistoquímica (IHC) para FOXP3 em tecido esplênico

Para a técnica de IHC foi utilizado o Complexo Streptoavidina Biotina Peroxidase (Complex Strept ABC, DAKO, USA), de acordo com o protocolo de Lima et al. (2012) e o anticorpo primário Anti-mouse/rat FOXP3 (eBioscience, San Diego, CA) (diluição de 1:100 em PBS ph-7,0).

Análise Estatística

A comparação entre os grupos estudados foi feita utilizando os testes não paramétricos *t* e Mann-Whitney. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. A análise estatística e os gráficos foram realizados com auxílio do software SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, EUA) e o programa GraphPad Prism 3 (GraphPad Software, Inc. CA. USA) respectivamente. A correlação de Spearman foi utilizada para comparar a porcentagem das citocinas IL-10 e TGF- β produzidas pelas células Treg à carga parasitária e aos achados histológicos.

Resultados

Na triagem do grupo infectado, utilizou-se como ponto de corte para positividade, a densidade óptica (DO) acima de 0,270, conforme Lima et al. (2003) (Figura 1). Os sinais clínicos mais frequentes entre os cães positivos foram: caquexia (69%), lesão cutânea (62%) e onicogribose (62%). O DNA extraído do baço de todos os dos cães soropositivos mostraram positividade na reação do PCR em tempo real.

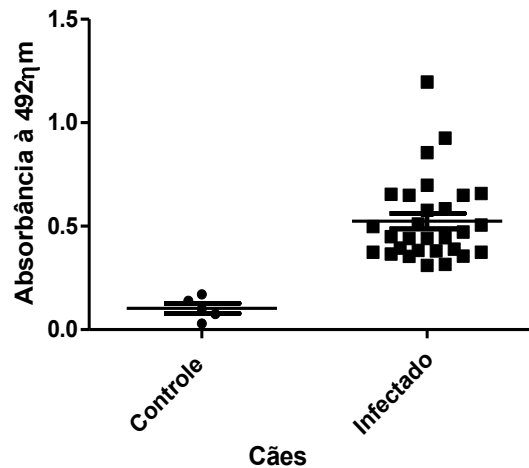


FIGURA 1- Reatividade sérica (IgG) contra o antígeno total de *Leishmania chagasi* de soro de cães saudáveis (controle negativo, N = 5) e soros de cães infectados (positivo N =29)

Para a análise das Treg produtoras de IL-10 e TGF- β intracelulares, no software Guava Express, foi realizada inicialmente a seleção da população de mononucleares por tamanho e granulosidade, destas células selecionadas foi delimitando uma “gate” somente para as células CD4⁺ (Figura 2a, 2c). A partir das células mononucleares CD4⁺, foi selecionada a população de células IL10⁺FOXP3⁺ (Figura 2b, 2d) e o mesmo procedimento foi realizado para as análises da população celular TGF β ⁺FOXP3⁺.

A PCR em tempo real foi capaz de detectar de 0,01 a 10000 cópias do DNA de *Leishmania* spp. (Tabela 1). A reação mostrou eficiência de 1 ($\epsilon=1,01$), e o grau de correlação linear foi de 0,96 ($R^2=0,96$). A carga parasitária do tecido esplênico foi altamente variável

Tabela 1- PCR em tempo real para quantificação da carga parasitária de *Leishmania* do baço de cães com LV

Animal	Ct*	CP/25mg de baço*
1	24,06	7
2	19,05	232
3	17,92	58625
4	17,94	539
5	22,77	30
6	23,92	13
7	24,45	6
8	19,18	224
9	30,14	0,10
10	19,39	191
11	20,25	115
12	26,57	1
13	24,75	5
14	23,6	10
15	27,4	1
16	20,38	127
17	27,91	0,5
18	15	4168
19	22,62	20
20	16,1	1905
21	16,03	1996
22	8,7	33300
23	21,49	46
24	27,74	0,3
25	18,58	16975
26	17,07	31387
27	20,88	52
28	23,38	8
29	23,76	6

*CP – Carga Parasitária, CT – Ciclo de “Threshold”.

Observou-se maior produção de IL-10 (Figura 2B) por células regulatórias no baço de cães infectados com *Leishmania spp.* quando comparado aos controles ($p= 0,03$). No sangue não foi observada diferença significativa da porcentagem de células $CD4^+FOXP3^+IL10^+$ entre cães controles e infectados (dados não mostrados). Também não houve diferença significativa ($p=0,95$) na produção de TGF- β pelas células T CD4 regulatórias do sangue e do baço dos cães saudáveis e com LV e também não houve associação entre presença de células produtoras de IL-10 ($p=0,19$) e TGF- β ($p=0,37$) e a carga parasitária. Como pode ser observado na Figura 2C, foi observado no baço ($p=0,0003$) e no sangue ($p=0,0002$) de cães saudáveis um maior número de células $FOXP3^+$ se comparado aos infectados.

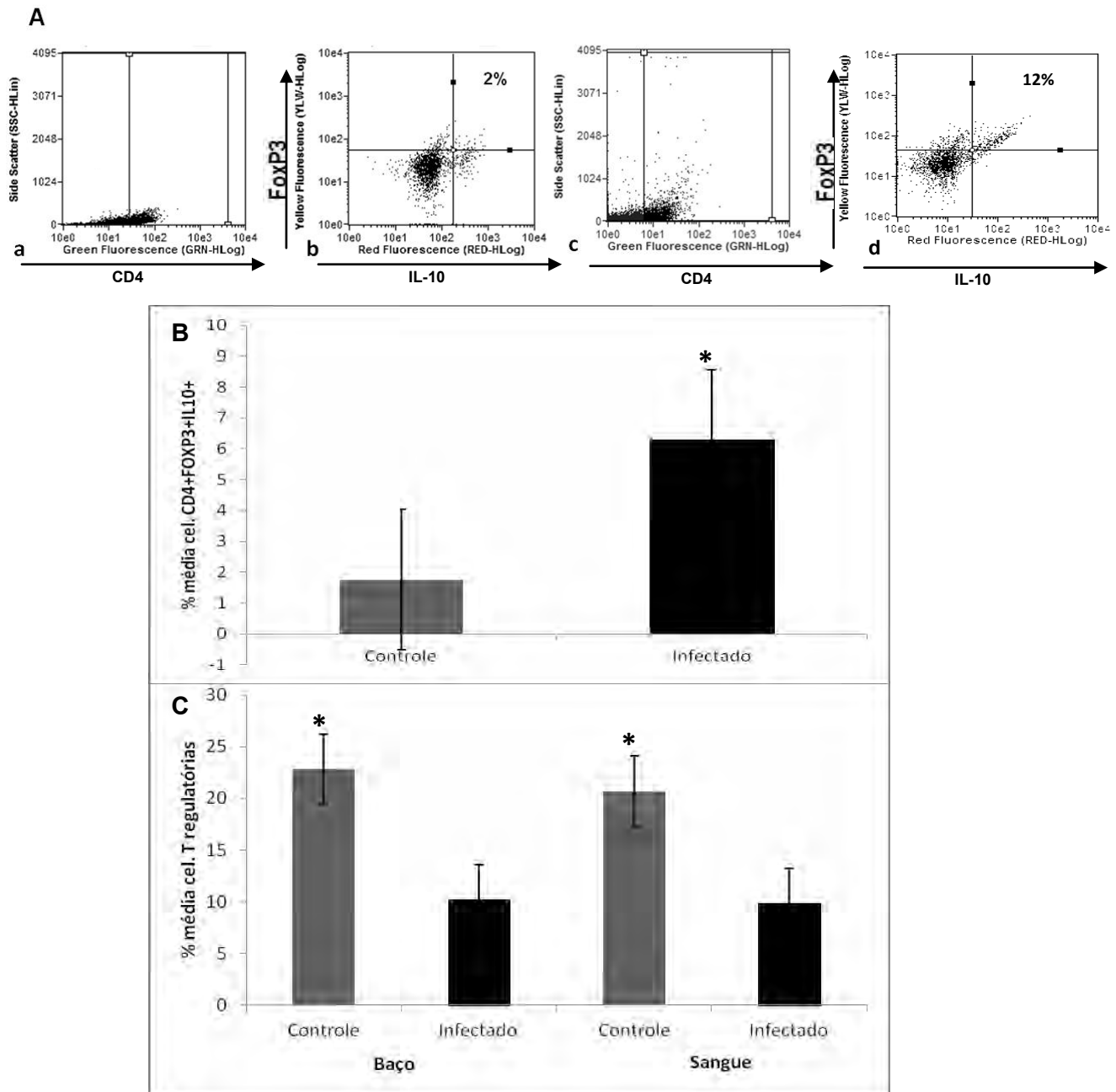


FIGURA 2- A - Análise de citometria de fluxo. (a) e (c) “Plot” de linfócitos CD4 de cão saudável e infectado respectivamente (Anticorpo monoclonal Anti-CD4 FITC). (b) e (d) “Plot” de células 2% e 12% CD4⁺FOXP3⁺IL10⁺ de cão saudável e infectado respectivamente (Anticorpos monoclonais Anti-FOXP3 PE e anti-IL-10 AlexaFluor647). B – Quantificação de linfócitos em baço de cães infectados por *Leishmania spp.* e saudáveis (controle). Os resultados são expressos em percentagem média \pm SD. C– Células FOXP3⁺ em PBMC e baço de cães infectados por *Leishmania spp.* e controles saudáveis. Os resultados são expressos como a percentagem média \pm SD. * $p < 0,05$; diferença significativa entre os valores médios para os cães infectados com LV e controles saudáveis

A imunomarcção com FOXP3 adjacente ao folículo linfoide confirmou a presença das células Treg no baço dos cães infectados (Figura 3). Não foi verificada associação entre a carga parasitária e a presença de células Treg e a as citocinas IL-10 e TGF- β .



FIGURA 3- Fotomicrográfico de avaliação imunoistoquímica da expressão de FOXP3⁺ em baço de cães naturalmente infectados por *Leishmania spp.* (Obj.40). Marcado com Streptoavidina Biotina Peroxidase. A barra representa 50µm.

Nos cães infectados o baço e o sangue não mostraram diferença significativa nas células produtoras de IL-10 e TGF-beta entre as células CD4+ FOXP3 positiva e as células CD4+, no baço e no sangue (dado não mostrado). O baço de cães com LV apresentou maiores porcentagens de IL-10 (p=0,02) e de TGF- β (p=0,019) comparado ao sangue (Figura 4).

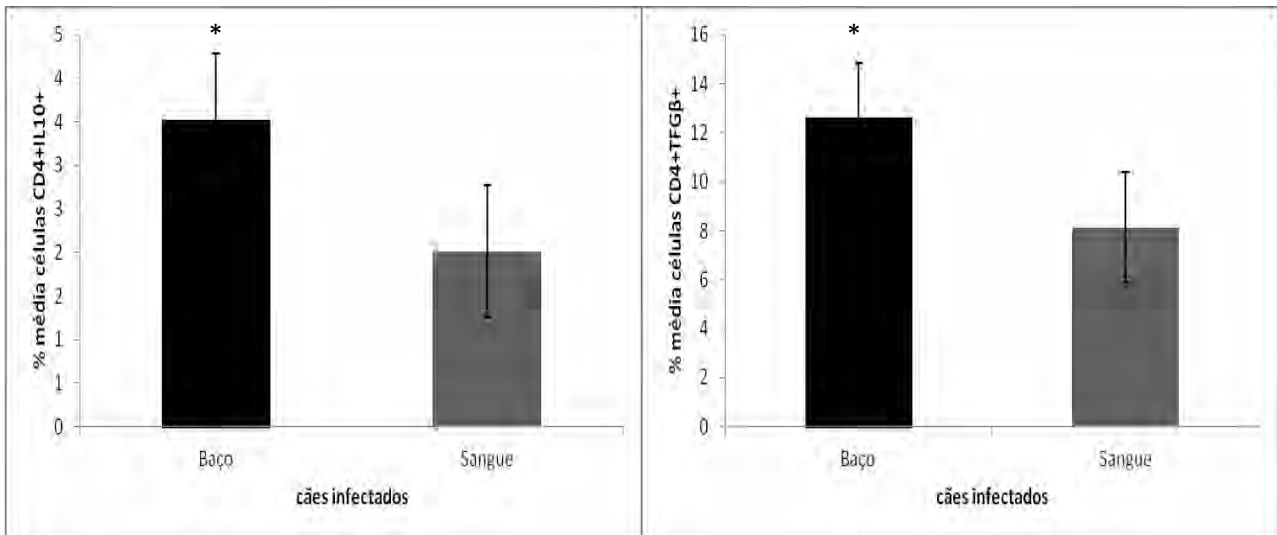


FIGURA 4- Quantificação de linfócitos CD4⁺IL10⁺ e CD4⁺TGFβ⁺ em PBMC e baço de cães infectados por *Leishmania spp.* Os resultados são expressos como a percentagem média ± SD. *p <0,05: diferença significativa entre os valores médios para os cães com LV.

Na análise histopatológica do baço dos cães infectados foi verificada que 50% dos cães apresentaram desorganização do tecido esplênico. Nos casos mais severos havia rarefação linfóide (Figura 5A), associada à presença de células linfóides em apoptose, frequentemente observada na região central do centro germinativo esplênico o estante do grupo apresentou um padrão dentro na normalidade.

Na polpa vermelha observou-se uma distorção da arquitetura, caracterizada por reação granulomatosa, de difusa a multifocal. Apenas 10% dos cães infectados apresentaram resposta inflamatória discreta. Em 45% foi observada resposta inflamatória moderada (Figura 5B) e em 45% foi verificada a resposta acentuada (Figura 5C). A reação inflamatória envolveu todas as regiões do baço, ou seja, a cápsula, a polpa branca e a polpa vermelha.

Estes achados histopatológicos não apresentaram relação com a presença de células Treg esplênicas produtoras de IL-10 e TGF-β.

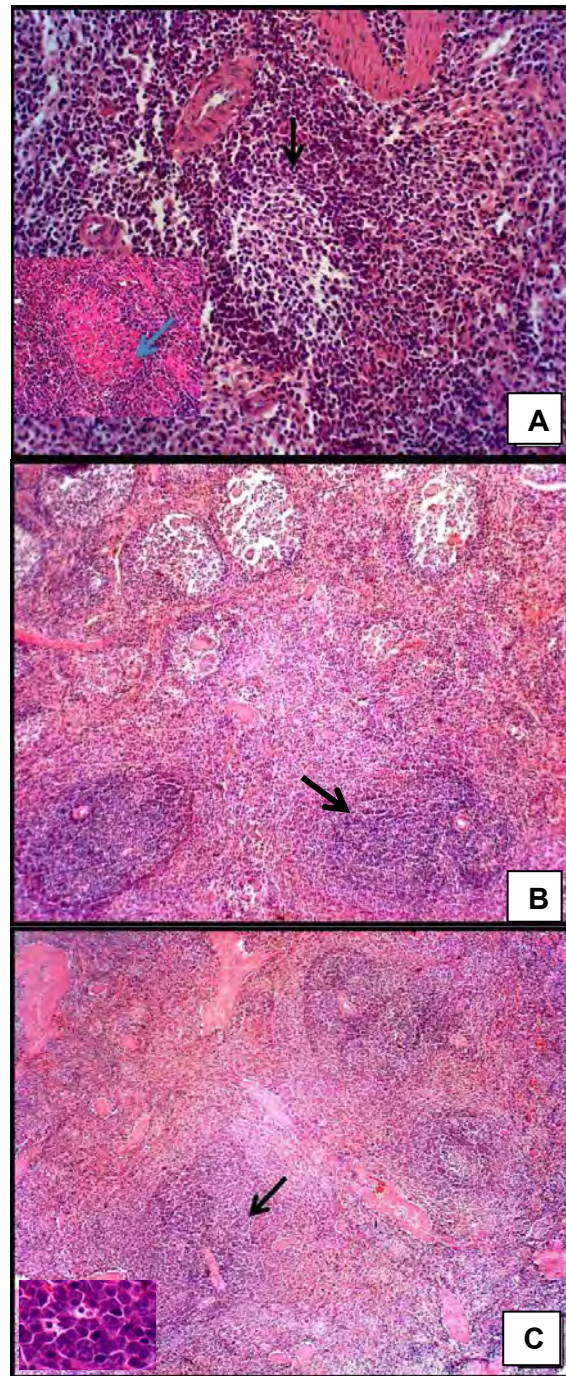


FIGURA 5 – Fotomicrografias do baço de cão sintomático para Leishmaniose Visceral. (A) Atrofia do folículo linfóide (seta) e presença de apoptose e de substância hialina no centro do folículo (seta azul, Obj. 40x). (B) Reatividade linfóide moderada da polpa branca (seta, Obj. 10X). (C) Alta reatividade da polpa branca no detalhe corpos apoptóticos (seta, 40x). Hematoxilina e Eosina.

Discussão

Neste estudo observou-se a presença de células T CD4+ regulatórias expressando a citocina IL-10 no baço de cães com LV. Estes resultados são semelhantes aos observados por Menezes-Souza et al. (2011), que detectaram a presença de células T CD4+ FOXP3+ na pele de cães com LV. Esses resultados vão ao encontro do observado por Katara et al. (2011) em humanos com kalazar após a sua fase crônica, demonstrando um aumento da expressão de citocinas IL-10 por células T regulatórias na pele, o que sugere que parte da IL-10 observada na fase prolongada da doença é proveniente dessas células.

Os cães infectados apresentaram uma redução na porcentagem de células Treg no baço e no sangue em relação aos cães saudáveis. Esses resultados são semelhantes aos de Menezes-Souza et al. (2011), que verificaram baixa expressão de células Treg na pele de cães sintomáticos com LV comparados aos cães assintomáticos. Resultados semelhantes também foram notados por Rodrigues et al. (2009), que observaram uma queda na expressão de FOXP3 no baço de camundongos Balb/c infectados com *L. infantum*, coincidindo com o aumento da carga parasitária.

O mecanismo responsável pelo decréscimo de células regulatórias ainda não foi elucidado. Pode estar associado a apoptose de linfócitos TCD4, fato já observado por Das et al. (1999) no baço de camundongos Balb/c infectados experimentalmente com *L. donovani*. Lima et al. (2012) também observaram apoptose dos linfócitos T no sangue e no baço de cães com LV. É possível que parte dessa população corresponda as células T regulatórias, futuros estudos serão necessários para esclarecer se as células reguladoras sofrem apoptose. Outro mecanismo que pode ser associado a essa diminuição das Treg é a diminuição da proliferação de linfócitos. Pinelli et al. (1999) demonstraram diminuição de moléculas co-estimulatórias B-7 essenciais para ativação celular em cães experimentalmente infectados com *L. infatum*.

A redução encontrada das células T regulatórias no baço dos cães com LV pode gerar um descontrole imunitário que poderia levar ao desenvolvimento de doenças autoimune e ainda o desenvolvimento de tumores, tais patologias já foram observadas em associação a leishmaniose canina (GINEL et al., 2008; CORTESE et al., 2006; FOGLIA MANZILLO et al., 2005), uma vez que alterações no número ou atividade de células Treg provocam doenças autoimunes em diversos modelos experimentais (MITTRUCKER; KAUFMANN, 2004).

Verificou-se, na análise histológica 50% dos cães a presença de granulomas, o que parece refletir uma inflamação crônica persistente, resultado da infecção descontrolada. Embora os granulomas pareçam constituir um passo para o controle da doença, o seu interior, associado à presença da citocina IL-10 (WILSON, 1996) pode proporcionar um ambiente favorável para o crescimento e sobrevivência da *Leishmania* (MURRAY, 1990). As alterações estruturais e a perda da arquitetura original do baço dos cães estudados são semelhantes aos encontrados por Santana et al. (2008).

O aumento na porcentagem de produção de citocinas regulatórias IL-10 e TGF- β no baço dos cães com LV em comparação ao sangue foi semelhante ao verificado no baço de humanos com leishmaniose visceral (NYLÉN et al., 2007), que também encontrou o aumento de produção de IL-10 no sangue, porém, não confrontou os resultados entre o sangue e baço. A alta concentração de IL-10 no baço também foi verificado em pacientes com LV após do tratamento (KENNEY et al., 1998). Corrêa et al. (2007) também observou altas porcentagens dessas citocinas no tecido esplênico dos cães infectados com *L. chagasi*.

Na LV, o parasita é inoculado na pele do hospedeiro e, posteriormente, infectam células mononucleares fagocitárias do sangue. Finalmente, hospedam-se em órgãos-alvo, essencialmente, o baço, onde ele replica (BRASIL, 2002). A diferença na quantificação de citocinas IL-10 e TGF- β produzidas pelas células T do sangue e do baço dos cães com LV pode ser devido ao uso do sangue pelo parasita apenas como passagem para alcançar

os órgãos-alvo, onde se replica. Assim, o que ocorre no sangue periférico não é representativo do que acontece nos órgãos alvos da doença (REIS et al., 2009).

Estes resultados demonstram que as células Treg são importantes como fonte de IL-10 no baço participando da modulação da resposta imunológica. O decréscimo de T regulatórias observado nos cães com LV pode ser devido à persistente ativação imune desencadeada pelo processo de infecção. No futuro, estes achados auxiliarão a terapia preventiva, principalmente no que concerne ao desenvolvimento de vacinas.

Referências

ALVES, C. F.; DE AMORIM, I. F.; MOURA, E. P.; RIBEIRO, R. R.; MICHALICK, M. S.; KALAPOTHAKIS, E.; BRUNA-ROMERO, O.; TAFURI, W. L.; TEIXEIRA, M. M.; MELO, M. N. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.128, p.349-58, 2009.

BILLER, B. J.; ELMSLIE, R. C.; BURNETT, R. C.; AVERY, A. C.; DOW, S. W. Use of FOXP3 expression to identify regulatory t cells in healthy dogs and dogs with cancer. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.116, p.69-78, 2007.

BOGGIATTO, P. M.; RAMER-TAIT, A. E.; METZ, K.; KRAMER, E. E.; GIBSON-CORLEY, K.; MULLIN, K.; HOSTETTER, J. M.; GALLUP, J. M.; JONES, D. E.; PETERSEN, C. A. Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. **Clinical Vaccine Immunology**, v.17, p.267–273, 2010.

BRASIL. Fundação Nacional da Saúde. **Guia da Vigilância Epidemiológica**. Rio de Janeiro: Fundação Nacional da Saúde. 5. ed. Brasília, 2002, 842p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Atlas de leishmaniose**

tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial. Brasília: Ministério da Saúde, 136p. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde, 2008. **Manual de Leishmaniose Visceral**
Disponível em:
<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27082>.
Acesso: 30 set. 2011.

CHEN, Y.; KUCHROO, V. K.; INOBE, J. I.; HAFNER, D. A.; WEINER, H. L. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: Suppression of autoimmune encephalomyelitis. **Science**, v.265, p.1237-1240, 1994.

CORRÊA, A. P.; DOSSI, A. C.; VASCONCELOS, R. O.; MUNARI, D. P.; LIMA, V. M. F. Evaluation of transformation growth factor beta1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v.143, p.267–274, 2007.

CORTESE, L.; PELAGALLI, A.; PIANTEDOSI, D.; MASTELLONE, V.; MANCO, A.; LOMBARDI, P.; CIARAMELLA, P.; AVALLONE, L. Platelet aggregation and haemostatic response in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. **Journal of Veterinary Medicine**, v.53, p.546-548, 2006.

DAS, G.; VOHRA, H.; RAO, K.; SAHA, B.; MISHRA, G. C. *Leishmania donovani* infection of a susceptible host results in CD4+ T-cell apoptosis and decreased Th1 cytokine production. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.49, p.307–310, 1999.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 27, p. 305-318, 2004.

FEHERVARI, Z.; SAKAGUCHI, S. CD4+ Tregs and immune control. **Journal of Clinical Investigation**, v.114, p.1209–1217, 2004.

FOGLIA MANZILLO, V.; PAGANO, A.; PACIELLO, O.; DI MUCCIO, T.; GRADONI, L.; OLIVA, G. Papular-like glossitis in a dog with leishmaniosis. **The Veterinary Record**, v.156, p. 213–215, 2005.

FREIRE, S. M. **Células T reguladoras (T reg) e sua relação com as alterações esplênicas e com as manifestações clínicas de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 69f. Tese (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, 2010.

FURTADO, G. C.; LAFAILLE, M. A. C.; KUTCHUKHIDZE, N.; LAFAILLE, J. J. Interleukin 2 signaling is required for CD4+ regulatory T cell function. **Journal of Experimental Medicine**, v.196, p.851–857, 2002.

GANTT, K.R.; SCHULTZ-CHERRY, S.; RODRIGUEZ N. Activation of TGF- β (beta) by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. **Journal Immunology**, v.170, p.2613-2620, 2003.

GESSER, B.; LEFFERS, H.; JINQUAN, T.; VESTERGAARD, C.; KIRSTEIN, N.; SINDET-PEDERSEN, S.; JENSEN, S.L.; THESTRUP-PEDERSEN, K.; LARSEN, C.G. Identification of functional domains on human interleukin 10. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p.14620-14625, 1997.

GHALIB, H. W.; PIUVEZAM, M. R.; SKEIKY, Y. A.; SIDDIG, M.; HASHIM, F. A.; EL-HASSAN, A. M.; RUSSO, D. M.; REED, S.G. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **Journal of Clinical Investigation**, v.92, p.324–329, 1993.

GINEL, P. J.; CAMACHO, S.; LUCENA, R. Anti-histone antibodies in dogs with leishmaniasis and glomerulonephritis. **Research in Veterinary Science**, v.85, p.510-514, 2008.

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

KATARA, G. K.; ANSARI, N. A.; VERMA, S.; RAMESH, V.; SALOTRA P. FOXP3 and IL-10 expression correlates with parasite burden in lesional tissues of post kalazar dermal leishmaniasis (PKDL) patients. **PLoS Neglected Tropical Disease**, n.5, e1171, 2011.

KENNEY, R. T.; SACKS, D. L.; GAM, A. A.; MURRAY, H. W.; SUNDAR, S. Splenic cytokine responses in Indian kala-azar before and after treatment. **Journal of Infectious Disease**, v.177, p.815-818, 1998.

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

LAGE, R.; OLIVEIRA, G.; BUSEK, S.; 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 Immunopathology**, v.153, p.135–145, 2007.

LIMA, V. M. F.; GONÇALVES, M. E.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; FEITOSA, M. M. Anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, p.485-489, 2003

LIMA, V. M. F.; FATTORI, K. R.; SOUZA, F.; EUGÊNIO, F. R.; SANTOS, P. S. P.; ROZZA, D. B.; MACHADO, G. F. Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral blood of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v.184, p.147-153, 2012.

LU, P.; ZUCKER, K.; FULLER, L.; TZAKIS, A.; ESQUENAZI, V.; MILLER, J. Cloning and expression of canine interleukin-10. **Journal of Interferon Cytokine Research**, v.12, p.1103-1109, 1995.

MCCARTNEY-FRANCIS, N. L.; WAHL, S. M. Transforming growth factor beta: a matter of life and death. **Journal of Leukocyte Biology**, v.55, p.401-409, 1994.

MCHUGH, R. S.; WHITTERS, M. J.; PICCIRILLO, C. A.; YOUNG, D. A.; SHEVACH, E. M.; COLLINS, M.; BYRNE, M. C. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. **Immunity**, v.16, p.311–323, 2002.

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.

MICHALSKY, E. M.; ROCHA, M. F.; DA ROCHA LIMA, A. C.; FRANÇA-SILVA, J. C.; PIRES, M. Q.; OLIVEIRA, F. S.; PACHECO, R. S.; DOS SANTOS, S. L.; BARATA, R. A.; ROMANHA, A. J.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. SInfectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomia longipalpis* phlebotomine sandflies. **Veterinary Parasitology**, v.147, p.67–76, 2007.

MILLS, K. H. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? **Nature Reviews Immunology**, v.4, p. 841–855, 2004

MITTRUCKER, H. W.; KAUFMANN, S. H. E. Regulatory T cells and infection: suppression revisited. **European Journal of Immunology**, v.34, p.306-312, 2004.

MURPHY, M. L.; WILLE, U.; VILLEGAS, E. N.; HUNTER, C. A.; FARRELL, J. P. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. **European Journal of Immunology**, v.31, p.2848–2856. 2001.

MURRAY, H. W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Disease**, v.162, p.1354-1359, 1990.

MURRAY, H. W.; MOREIRA, A. L.; LU, C. M.; DEVECCHIO, J. L. M.; MATSUHASHI, M.; MA, X.; HEINZEL, F. P. Determinants of response to interleukin-10 receptor blockade immunotherapy in experimental visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Disease**, v.188, p.458–464, 2003.

NYLÉN, S.; MAURYA, R.; EIDSMO, L.; MANANDHAR, K. D.; SUNDAR, S.; SACKS, D. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (FOXP3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, v.204, p.805–817, 2007.

O'NEILL, K.; GUTH, A.; BILLER, B., ELMSLIE, R.; DOW, S. Changes in regulatory T cells in dogs with cancer and associations with tumor type. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, p.875-881, 2009

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

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

PINELLI, E.; RUTTEN, V. P. M. G.; BRUSTERS, M.; MOORE, P. F.; RUITENBERG, E. J. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. **Infection and Immunity**, v.67, p. 237–243, 1999.

PINHEIRO, D.; SINGH, Y.; GRANT, C.R.; APPLETON, R.C.; SACCHINI, F.; WALKER, K. R.; CHADBOURNE, A. H.; PALMER, C. A.; ARMITAGE-CHAN, E.; THOMPSON, I.; WILLIAMSON, L.; CUNNINGHAM, F.; GARDEN, O.A.; Phenotypic and functional characterization of a CD4(+) CD25(high) FOXP3(high) regulatory T-cell population in the dog. **Immunology**, v.132, p.111-122, 2011.

QUARESMA, P. F.; MURTA, S. M. F.; FERREIRA, E. C.; DA ROCHA-LIMA, A. C. V. M.; XAVIER, A. A. P.; GONTIJO, C. M. F. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Tropica**, v.111, p. 289–294, 2009.

RAMSDELL, F. FOXP3 and natural regulatory T cells: Key to a cell lineage? **Immunity**, v.19, p.165–168, 2003.

READ, S.; MALMSTROM, V.; POWRIE, F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+ CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, v.192, p.295–302, 2000.

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 Immunopathology**, v.128, p.87-95, 2009.

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

RODRIGUES, V.; SANTANA, J. R.; DA SILVA, J. CAMPOS-NETO, A. Transforming growth factor beta and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Infectious and Immunity**, v.3, p.1233-1236, 1998.

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

SAHA, S.; MONDAL, S.; RAVINDRAN, R.; BHOWMICK, S.; MODAK, D., MALLICK, S.; RAHMAN, M.; KAR, S.; GOSWAMI, R.; GUHA, S. K.; PRAMANIK, N.; SAHA, B.; ALI, N. IL-10- and TGF-beta-mediated susceptibility in kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis: the significance of amphotericin B in the control of *Leishmania donovani* infection in India. **Journal Immunology**, v.179, p.5592–5603, 2007.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated t cells expressing IL-2 Receptor-alfa-chains (CD25). **Journal of Immunology**, v.155, p.1151-1164, 1995.

SANTANA, C. C.; VASSALLO, J.; DE FREITAS, L. A.; OLIVEIRA, G. G.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; DOS-SANTOS, W. L. Inflammation and

structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. **Parasite Immunology**, v.30, p.515-524, 2008.

SHIMIZU, J.; YAMAZAKI, S.; TAKAHASHI, T.; ISHIDA, Y.; SAKAGUCHI, S.; Stimulation of CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. **Nature Immunology**, v.3, p.135–142, 2002.

TOO, H.P. Real time PCR quantification of GFR-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. **Molecular Brain Research**, v.114, p.146–154, 2003

VERMA, S.; KUMAR, R.; KATARA, G. K.; SINGH, C. L.; NEGI, N. S.; RAMESH, V.; SALOTRA, P. Foxp3 Quantification of Parasite Load in Clinical Samples of Leishmaniasis Patients: IL-10 Level Correlates with Parasite Load in Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v.5, N.4, e1171, 2011.

VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. Enzyme-linked immunoasorbent assay, p.359-371. In: ROSE N.; FRIEDMAN, H. **Manual of clinical immunology**. South Carolina: Ed. American Society for Microbiology, 1980, 932p.

WILSON, M.E.; SANDOR, M.; BLUM, A. M.; YOUNG, B. M.; METWALI, A.; ELLIOTT, D.; LYNCH, R. G.; WEINSTOCK, J. V. Local suppression of INF- γ in hepatic granulomas correlates with tissue-specific replication of *Leishmania chagasi*. **Journal of Immunology**, v.156, p.2231-2239, 1996.

WILSON, M.E.; YOUNG, B. M.; DAVIDSON, B. L.; MENTE, K. A.; MCGOWAN, S. E. The importance of TGF-b in murine visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v.161, p.6148-6155, 1998.