

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

**EXPRESSÃO GÊNICA DAS INTERLEUCINAS IL-4, IL-10,
IL-12 E DE INTERFERON GAMA NO BAÇO DE GATOS
INFECTADOS POR *Leishmania infantum chagasi***

Juliana Peloi Vides
Médica Veterinária

Araçatuba – SP
2014

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

**EXPRESSÃO GÊNICA DAS INTERLEUCINAS IL-4, IL-10,
IL-12 E DE INTERFERON GAMA NO BAÇO DE GATOS
INFECTADOS POR *Leishmania infantum chagasi***

Juliana Peloi Vides

Orientadora: Profa. Adjunto Mary Marcondes

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

ARAÇATUBA – SP
2014

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

Vides, Juliana Peloi

V652e

Expressão gênica das interleucinas il-4, il-10, il-12 e de interferon gama no baço de gatos infectados por *Leishmania infantum chagasi*/ Juliana Peloi Vides. -- Araçatuba: [s.n], 2014.

81 f. il.; + CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2014.

Orientadora: Profa. Adjunto Mary Marcondes

1. Citocinas. 2. Leishmaniose visceral felina. 3. Linfócitos Th1. 4. linfócitos Th2. 5. RT-PCR. I. T.

CDD 616.102

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Expressão gênica das interleucinas IL-4, IL-10, IL-12 e de interferon gama no baço
de gatos infectados por Leishmania infantum chagasi.

AUTORA: JULIANA PELOI VIDES


ORIENTADORA: Dra. MARY MARCONDES

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


Dr. WAGNER LUIS FERREIRA


Dra. MARIA CECÍLIA RUI LUVIZOTTO


Dra. MÁRCIA DALASTRA LAURENTI


Dr. RAIMUNDO SOUZA LOPES


Dra. MARY MARCONDES

DATA DA REALIZAÇÃO: 25 de junho de 2014.


Presidente da Comissão Examinadora
Dra. MARY MARCONDES
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JULIANA PELOI VIDES - nascida em 12 de maio de 1985 na cidade de São Paulo – SP. Médica Veterinária formada pela Universidade Estadual Paulista – Unesp, campus de Araçatuba – SP no ano de 2007. Mestre em Ciência Animal na área de concentração em Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela mesma Instituição no ano de 2010. Ingressou no programa de doutorado da Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, em agosto de 2010, sob orientação da Professora Adjunto Mary Marcondes.

DEDICATÓRIA

Ao meu noivo, João Henrique Artero de Carvalho Leite, que desde o início me incentivou na realização deste sonho. Muito obrigada pela confiança, pelo orgulho, pelas orações e pelo amor que sempre estiveram presentes

Te amo!

AGRADECIMENTOS

Após tanto trabalho e dedicação não poderia ser diferente a lista de agradecimentos. É muito bom dizer **obrigada** a tantas pessoas que, neste período em que se é acometido de tantos surtos de alegrias, cansaço, incerteza e incapacidade, se mostraram sempre presentes, com participação ímpar no desenvolvimento do projeto.

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus por estar sempre ao meu lado, me oferecendo boas oportunidades, pessoas especiais e muito amor.

A minha orientadora, professora Mary Marcondes, por toda dedicação, paciência e incentivo durante este projeto. Muito obrigada por todos os conselhos profissionais e pessoais, por todo o seu carinho e amizade. Você é meu grande exemplo profissional. Te admiro demais!

À meus pais, Waldomiro Vides e Maria Cristina Peloi, por todo apoio, dedicação, amor e incentivo durante toda essa jornada de aprendizado. Vocês são o meu exemplo de vida.

À meu irmão Thiago Peloi Vides, sempre incentivador, amigo e presente, mesmo de tão longe, em todas as etapas de minha vida.

Aos meus amigos Augusto “Gutinho”, Karina “Yukee” e Ludmila “Ludmix” que doaram todos os seus fins de semana e feriados, durante os últimos dois anos, para a realização deste projeto. Muito obrigada pela dedicação, carinho, amizade, confiança e incentivo!! Vocês foram essenciais para a realização deste sonho.

Aos amigos Caio, Eveline e Guto que dividiram seus lares comigo, sempre muito gentis e carinhosos.

Ao pós-graduando Guilherme Dias de Melo pelos ensinamentos e dedicação durante a técnica de PCR.

À professora Adj. Valéria Marçal Felix de Lima e ao Professor Adj. Marcelo Vasconcelos Meireles que permitiram o uso de seus laboratórios e equipamentos para a realização da presente pesquisa.

À professora Márcia Dalastra e à auxiliar de laboratório Thayse pela excelente recepção, por toda a orientação, paciência e dedicação na realização das etapas deste trabalho no Laboratório de Moléstias Infecciosas (LIM-50).

À professora Flávia Lombardi Lopes pela colaboração na técnica de PCR, sempre muito gentil e incentivadora.

À professora Sílvia Venturolli, pela colaboração na realização da análise estatística.

À todos os proprietários dos animais do estudo, que abriram as portas de suas residências e, principalmente, pela confiança depositada em nossa equipe.

A Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista – campus de Araçatuba, pelo “acolhimento” e por todo o aprendizado durante os últimos anos.

À CAPES pelo apoio financeiro concedido durante a pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do projeto.

E por último e mais importante, a todos os gatos que participaram do projeto.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|-----------|
| 1.INTRODUÇÃO..... | 01 |
| 2.REVISÃO DE LITERATURA..... | 03 |
| 3.OBJETIVOS..... | 16 |
| 4.MATERIAL E MÉTODOS..... | 17 |
| 4.1 Animais utilizados | 17 |
| 4.2 Delineamento Experimental..... | 17 |
| 4.3 Obtenção de soro..... | 18 |
| 4.4 Pesquisa de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp. por meio de exames citológicos de linfonodo poplíteo e de medula óssea..... | 19 |
| 4.5 Biopsia esplênica..... | 19 |
| 4.6 Pesquisa de anticorpos anti-vírus da imunodeficiência felina (FIV) e de antígenos do vírus da leucemia felina (FeLV)..... | 20 |
| 4.7 Pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> | 20 |
| 4.7.1 Ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto..... | 20 |
| 4.7.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)..... | 21 |
| 4.8 Amplificação de DNA de <i>Leishmania</i> spp. por meio da reação de cadeia da polimerase (PCR) em tempo real..... | 22 |
| 4.8.1 Amostra..... | 22 |
| 4.8.2 Cultura de <i>Leishmania chagasi</i> | 22 |
| 4.8.3 Extração de DNA..... | 22 |
| 4.8.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional para teste de viabilidade das amostras..... | 23 |
| 4.8.5 Padronização das concentrações dos oligonucleotídeos Iniciadores para a pesquisa de DNA de <i>Leishmania</i> spp..... | 24 |
| 4.8.6 Confecção da curva padrão..... | 25 |
| 4.8.7 PCR em tempo real para pesquisa de DNA de <i>Leishmania</i> spp. em amostras de medula óssea..... | 26 |

| | |
|--|-----------|
| 4.9 Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) para abaliação da expressão de citocinas no baço..... | 26 |
| 4.9.1 Extração de RNA das amostras..... | 26 |
| 4.9.2 Produção de cDNA..... | 27 |
| 4.9.3 Oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise..... | 27 |
| 4.9.4 Padronização das concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores de interleucinas..... | 29 |
| 4.9.5 Curva padrão das interleucinas..... | 30 |
| 4.9.6 Avaliação da expressão gênica das interleucinas..... | 30 |
| 4.10 Análise estatística..... | 30 |
| 5.RESULTADOS..... | 32 |
| 5.1 Animais..... | 32 |
| 5.2 Detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> spp. por meio dos métodos de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) Indireto e Reação de Imunofluorescência Indireta..... | 36 |
| 5.3 Detecção de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp. por meio do exame parasitológico direto de linfonodo poplíteo e de medula óssea..... | 36 |
| 5.4 PCR em tempo real das amostras de medula óssea..... | 38 |
| 5.5 Expressão gênica de mRNA do gene de referência e das interleucinas..... | 39 |
| 5.5.1 Expressão gênica de mRNA para o gene de referência beta-actina..... | 39 |
| 5.5.2 Expressão gênica de mRNA para a interleucina IL-12p40..... | 41 |
| 5.5.3 Expressão gênica de mRNA de interferon gama (IFN γ)..... | 43 |
| 5.5.4 Expressão gênica de mRNA para a interleucina IL-4..... | 45 |
| 5.5.5 Expressão gênica de mRNA para a interleucina IL-10..... | 47 |
| 6.DISSCUSSÃO..... | 52 |

| | Página |
|--|-----------|
| 7.CONCLUSÕES..... | 60 |
| REFERÊNCIAS..... | 61 |
| APÊNDICES..... | 74 |
| APÊNDICE A. PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DE DNA DE <i>Leishmania</i> spp. – TITULAÇÃO DE PRIMERS E CURVA PADRÃO..... | 74 |
| APÊNDICE B. RT-PCR EM TEMPO REAL PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS – TITULAÇÃO DOS PRIMERS..... | 76 |
| APÊNDICE C. RT-PCR EM TEMPO REAL PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS – CURVA PADRÃO..... | 79 |

LISTA DE TABELAS

Página

- Tabela 1.** Distribuição quanto ao sexo e faixa etária de 18 gatos domiciliados em Araçatuba – São Paulo, subdivididos em três grupos. Grupo 1: composto por seis felinos sintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*; grupo 2: constituído por seis felinos assintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*. e; grupo 3: constituído por 6 felinos hígidos, não infectados (grupo controle). Número absoluto e porcentagem (Araçatuba, 2014)..... 33
- Tabela 2.** Idade, sexo, e sinais clínicos de felinos provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral, de acordo o grupo experimental (G1: composto por seis felinos sintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*; grupo 2: constituído por seis felinos assintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*. e; grupo 3: constituído por 6 felinos hígidos, não infectados(grupo controle) (Araçatuba, 2014)..... 35
- Tabela 3.** Resultados de exame parasitológico direto de medula óssea, PCR em tempo real e testes sorológicos (ELISA e RIFI) para diagnóstico de leishmaniose em felinos de área endêmica para leishmaniose visceral, de acordo o grupo experimental (G1: Grupo 1: composto por seis felinos sintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*; grupo 2: constituído por seis felinos assintomáticos infectados por *L. infantum chagasi* (Araçatuba, 2014)..... 37
- Tabela 4.** Resultados dos valores de Ct médio da expressão gênica do gene de referência beta-actina e das citocinas: IL-12p40, IFN- γ , IL-4 e IL-10 por RT-PCR em tempo real de 18 gatos, subdivididos em três grupos. Grupo 1: composto por seis felinos sintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*; grupo 2: constituído por seis felinos assintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*. e; grupo 3: constituído por 6 felinos hígidos, não infectados (grupo controle). (Araçatuba, 2014)..... 50

Tabela 5. Diminuição da expressão das interleucinas (IL-12p40, IFN- γ , IL-4 e IL-10) de dois grupos de gatos infectados por *L. infantum chagasi* (G 1 – sintomáticos; G 2 – assintomáticos) em relação ao grupo controle, por RT-PCR em tempo real (valores de log na base 10 derivados da equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$) (Araçatuba, 2014)..... 51

LISTA DE QUADROS

| | Página |
|---|--------|
| Quadro 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso utilizados na reação em cadeia da polimerase convencional para validação das amostras (Araçatuba, 2014)..... | 23 |
| Quadro 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso utilizados na PCR para pesquisa de DNA de <i>Leishmania</i> spp. (Araçatuba, 2014)..... | 25 |
| Quadro 3. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores senso, anti-senso e das sondas de hidrólise utilizados nas qPCRs para a avaliação da expressão gênica das citocinas (Araçatuba, 2014)..... | 28 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| Figura 1. Desenvolvimento das linhagens das células Th1, Th2, Th17 e Treg a partir da célula TCD4 ⁺ . A diferenciação e a inibição de cada célula T são iniciadas pela presença de interleucinas específicas..... | 11 |
| Figura 2. Punção biopsia aspirativa de linfonodo poplíteo (A) e de medula óssea, na região de crista ilíaca, (B) de felino proveniente de área endêmica para leishmaniose visceral (Araçatuba, 2014)..... | 19 |
| Figura 3. Gel de agarose com produtos da reação da PCR para citocromo B. Na primeira coluna (seta) nota-se o peso molecular de 50 pares de base. As três primeiras colunas (F/C) são as amostras extraídas com fenol/clorofórmio e as três seguintes (K) são as extraídas com o kit comercial (Araçatuba, 2014)..... | 24 |
| Figura 4. Distribuição, em porcentagem, segundo as alterações de exame físico, de seis gatos naturalmente infectados por <i>L. infantum chagasi</i> (grupo 1) (Araçatuba, 2014)..... | 34 |
| Figura 5. Gráfico da curva de <i>melt</i> das amostras de medula óssea de seis felinos do grupo 1 (vermelho) e seis felinos do grupo 2 (azul) cujo DNA de <i>Leishmania</i> spp. foi amplificado por PCR em Tempo Real. Verde: Controle positivo (Cultura de <i>L. chagasi</i>); Preto: Controle negativo. Temperatura de melt de 83,5°C a 84°C (Araçatuba, 2014)..... | 38 |
| Figura 6. Gráfico representativo dos picos de <i>melt</i> das amostras de medula óssea de seis felinos do grupo 1 (vermelho) e de seis felinos do grupo 2 (azul) cujo DNA de <i>Leishmania</i> spp. foi amplificado por PCR em Tempo Real. Verde: Controle positivo (Cultura de <i>L. chagasi</i>); Preto: Controle negativo. Temperatura de melt de 83,5°C a 84°C (Araçatuba, 2014)..... | 39 |

- Figura 7.** Gráfico da expressão gênica de mRNA do gene de referência beta-actina em amostras de baço de gatos do grupo 1 (gatos sintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*) por PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014)..... 40
- Figura 8.** Gráfico da expressão gênica de mRNA do gene de referência beta-actina em amostras de baço de gatos do grupo 2 (gatos assintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*) por PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014)..... 40
- Figura 9.** Gráfico da expressão gênica de mRNA do gene de referência beta-actina em amostras de baço de gatos do grupo 3 (grupo controle) por PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014)..... 41
- Figura 10.** Gráfico da expressão gênica de mRNA da interleucina IL-12p40 em amostras de baço de gatos do grupo 1 (gatos sintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*) por PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014)..... 42
- Figura 11.** Gráfico da expressão gênica de mRNA da interleucina IL-12p40 em amostras de baço de gatos do grupo 2 (gatos assintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*) por PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014)..... 42
- Figura 12.** Gráfico da expressão gênica de mRNA da interleucina IL-12p40 em amostras de baço de gatos do grupo 3 (grupo controle) por PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014)..... 43

- Figura 13.** Gráfico da expressão gênica de mRNA da citocina IFN- γ em amostras de baço de gatos do grupo 1 (gatos sintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*) por PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014)..... 44
- Figura 14.** Gráfico da expressão gênica de mRNA da citocina IFN- γ em amostras de baço de gatos do grupo 2 (gatos assintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*) por PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014)..... 44
- Figura 15.** Gráfico da expressão gênica de mRNA da citocina IFN- γ em amostras de baço de gatos do grupo 3 (grupo controle) por PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014)..... 45
- Figura 16.** Gráfico da expressão gênica de mRNA da interleucina IL-4 em amostras de baço de gatos do grupo 1 (gatos sintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*) por PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014)..... 46
- Figura 17.** Gráfico da expressão gênica de mRNA da interleucina IL-4 em amostras de baço de gatos do grupo 2 (gatos assintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*) por PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014)..... 46
- Figura 18.** Gráfico da expressão gênica de mRNA da interleucina IL-4 em amostras de baço de gatos do grupo 3 (grupo controle) por PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014)..... 47

| | |
|---|-----------|
| <p>Figura 19. Gráfico da expressão gênica de mRNA da interleucina IL-10 em amostras de baço de gatos do grupo 1 (gatos sintomáticos infectados por <i>L. infantum chagasi</i>) por PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014).....</p> | <p>48</p> |
| <p>Figura 20. Gráfico da expressão gênica de mRNA da interleucina IL-10 em amostras de baço de gatos do grupo 2 (gatos assintomáticos infectados por <i>L. infantum chagasi</i>) por PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014).....</p> | <p>48</p> |
| <p>Figura 21. Gráfico da expressão gênica de mRNA da interleucina IL-10 em amostras de baço de gatos do grupo 3 (grupo controle) por PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014).....</p> | <p>49</p> |

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – grau Celsius

µg – micrograma

µl – microlitro

µM – micromolar

Δ Ct – Ct do gene alvo – Ct do gene de referência

ΔΔ Ct – Δ Ct médio do grupo infectado – Δ Ct médio do grupo controle

bid – a cada 12 horas

cDNA – DNA complementar

CEEA – Comissão de Ética na Experimentação Animal

Ct – ciclo limiar (*cycle threshold*)

DNA – ácido desoxirribonucléico

DO – densidade óptica

ELISA – ensaio imunoenzimático

et al. – e colaboradores

EUA – Estados Unidos da América

FAM – 6-carboxifluoresceína

FeLV – vírus da leucemia felina

FIV – vírus da imunodeficiência felina

G1 – grupo 1

G2 – grupo 2

G3 – grupo 3

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

IM – intramuscular

IFN-α – interferon alfa

IFN-γ – interferon gama

IgG – Imunoglobulina G

IL-2 – interleucina 2

IL-4 – interleucina 4

IL-5 – interleucina 5
IL-6 – interleucina 6
IL-10 – interleucina 10
IL-12 – interleucina 12
IL-13 – interleucina 13
IL17A – interleucina 17 subtipo A
IL-17F – interleucina 17 subtipo F
IL-21 – interleucina 21
IL-23 – interleucina 23
IL-25 – interleucina 25
IL-27 – interleucina 27
iNOS – óxido nítrico sintase induzida
IV – intravenoso
kg – quilograma
log – logaritmo
LV – leishmaniose visceral
mg – miligrama
mL – mililitro
mM – milimolar
mRNA – RNA mensageiro
ng – nanograma
NK – células exterminadoras naturais
ng - nanograma
nM – nanomolar
p – probabilidade
PBS – solução salina tamponada
PBS T – solução salina tamponada contendo 0,05% de Tween 20
PCR – reação em cadeia da polimerase
qPCR – PCR quantitativa ou PCR em tempo real
 r^2 – coeficiente de correlação linear
RIFI – reação de imunofluorescência indireta

RT-PCR – reação da transcriptase reversa seguida de PCR

RNA – ácido ribonucléico

SC – subcutâneo

sid – a cada 24 horas

SST – solução salina tamponada

TGF- β – fator transformador de crescimento beta

TNF- α – fator de necrose tumoral

Th – linfócitos T auxiliares

Treg – linfócitos T regulatórias

VO – via oral

USP – Universidade de São Paulo

**EXPRESSÃO DAS INTERLEUCINAS IL-4, IL-10, IL-12 E DE INTERFERON
GAMA NO BAÇO DE GATOS INFECTADOS POR *Leishmania infantum*
*chagasi***

RESUMO - Na tentativa de compreender a resposta imune de gatos com leishmaniose visceral, o presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão gênica das interleucinas IL-4, IL-10, IL-12 e de IFN- γ por reação em cadeia da polimerase em tempo real em amostras de baço de felinos naturalmente acometidos pela doença. Para tanto foram avaliados três grupos de animais; o primeiro e o segundo grupos compostos por seis gatos infectados por *Leishmania* cada, sintomáticos e assintomáticos, respectivamente; e o terceiro por seis gatos clinicamente hígidos e não infectados. Nos gatos sintomáticos, as expressões de mRNA das citocinas IL-4, IL-10, IL-12 e IFN- γ estavam reduzidas em 2,52; 2,4; 2,3 e 0,57 vezes em relação ao grupo controle, respectivamente. Nos animais assintomáticos, as expressões de IL-4, IL-10, IL-12 e de IFN- γ foram, respectivamente, de 2,22; 2,15; 2,52 e 1,15 vezes menores quando comparadas ao grupo controle. Ainda, uma forte correlação foi observada entre as expressões de IL-4 e de IL-10 nos gatos sintomáticos, e entre IFN- γ e IL-10, IL-12 e IL-4 e entre IL-12 e IL-10 nos gatos assintomáticos. A redução na expressão das quatro citocinas analisadas evidencia pequena participação dos linfócitos Th1 e Th2 na resposta frente à infecção por *Leishmania* spp. em gatos, independente do estado clínico dos animais.

Palavras-Chave: citocinas, leishmaniose visceral felina, linfócitos Th1, linfócitos Th2, RT-PCR

**EXPRESSION OF INTERLEUKINS IL-4, IL-10, IL-12 AND INTERFERON
GAMMA IN SPLEEN OF CATS INFECTED BY *Leishmania infantum chagasi***

ABSTRACT – In an attempt to understand the immune response of cats with visceral leishmaniasis, the present study aimed to evaluate the gene expression of interleukins IL- 4, IL-10, IL-12 and IFN- γ by real-time polymerase chain reaction in samples of spleen from cats naturally affected by the disease. For this, three groups of cats were evaluated; the first and second groups composed of six *Leishmania*-infected cats each, symptomatic and asymptomatic, respectively; and the third composed of six clinically healthy and uninfected cats. In symptomatic cats the mRNA expressions of IL- 4, IL -10, IL -12 and IFN- γ were respectively suppressed 2.52, 2.4, 2.3 and 0.57 times compared to the control group. In asymptomatic animals the expression of IL- 4, IL -10, IL -12 and IFN- γ were, respectively, 2.22, 2.15, 2.52 and 1.15 times lower when compared to the control group. Also, a strong correlation was observed between the expressions of IL4 and IL-10 in symptomatic cats; between IFN- γ and IL-10, IL-12 and IL-4 and between IL-12 and IL-10 in asymptomatic cats. The reduction of expression the four cytokines analyzed evidences a small involvement of Th1 and Th2 lymphocytes in the response to infection by *Leishmania* spp. in cats, regardless of the clinical status of animals.

Key-words: cytokines, feline visceral leishmaniasis, Th1 lymphocytes, Th2 lymphocytes, RT-PCR

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma antropozoonose, de grande importância em saúde pública, causada por protozoários do gênero *Leishmania* spp. (BANETH, 2006). A patogenia da doença ainda não foi totalmente esclarecida, particularmente no que diz respeito às citocinas envolvidas com o desenvolvimento de resistência à infecção ou ao quadro clínico da enfermidade. Apesar de os cães serem os principais reservatórios doméstico da doença, estudos evidenciam a presença da infecção na espécie felina (BANETH, 2006; CARDIA et al., 2013; CARRILLO; MORENO, 2009; VIDES et al., 2011).

A apresentação clínica de gatos infectados por *Leishmania* spp. ainda é incerta, mas acredita-se que a maioria dos animais parasitados sejam assintomáticos e, a despeito dos sinais clínicos, as lesões de pele são as alterações de exame físico mais relatadas na literatura. Alguns pesquisadores utilizam testes sorológicos para o diagnóstico da doença em gatos, porém concluem que a baixa detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. nesta espécie infectada possa estar relacionada a um padrão distinto na resposta imunológica (BRESCHIANI et al., 2010; CHATZIS et al., 2014; POLI et al., 2002; VIDES et al., 2011).

A resposta imune frente à infecção por *Leishmania infantum chagasi* em modelos murinos é descrita por meio de uma dicotomia entre respostas de linfócitos auxiliares Th1 e Th2, cuja resposta protetora está relacionada com interleucinas produzidas pelas células Th1 e a progressão da doença com citocinas expressas da resposta Th2 (REINER; LOCKSLEY, 1995; FOWELL et al., 1998; ROGERS et al., 2002; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; GUMY et al., 2004). Entretanto, estudos em cães indicam que essa resposta pode ocorrer de forma mista e que a participação de outras linhagens celulares também deve ser importante na patogênese da doença (KUSHAWAHA et al., 2011; PINELLI et al., 1994; RODRÍGUEZ-CÓRTEZ et al., 2007).

O estudo do padrão imunológico desenvolvido na espécie felina acometida por leishmaniose visceral ainda não foi reportado e, assim, informações a respeito da resistência contra a infecção nesta espécie são apenas especulações. A avaliação da expressão de interleucinas produzidas pelas linhagens de células T auxiliares (Th) em gatos se torna fundamental para o esclarecimento do padrão de resposta imune contra o parasito em gatos (MAIA; CAMPINO, 2011). Com esta compreensão, é possível direcionar os melhores métodos de diagnóstico para a doença nesta espécie animal e, ainda, evidenciar as razões pelas quais estes animais não apresentam, na sua maioria, sinais clínicos da enfermidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A leishmaniose é uma das mais importantes doenças endêmicas do mundo causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. As espécies pertencentes ao grupo da forma visceral compreendem o Complexo *Leishmania donovani*, representado pela *Leishmania infantum chagasi* nas Américas. Estudos sob a transmissão da doença no Brasil apontam que flebotomíneos das espécies *Lutzomyia longipalpis* (MACHADO et al., 2007) e *Lutzomyia cruzi* (SANTOS et al., 1998) são os vetores do seu ciclo epidemiológico.

O cão é o principal reservatório urbano deste parasito em áreas endêmicas, com prevalência da infecção variando de 63 a 80% (BANETH, 2006). Atualmente, uma das medidas de controle é a eutanásia de cães sororeagentes, entretanto, observa-se que a incidência de leishmaniose visceral humana não apresentou uma redução em níveis aceitáveis após a implementação desta normativa (ROMERO; BOELAERT, 2010). Por tratar-se de uma zoonose de relevância mundial, estudos recentes evidenciam a presença da infecção em outras espécies, como por exemplo na espécie felina, e discutem o seu possível papel epidemiológico no ciclo da doença (CARDIA et al., 2013; DA SILVA et al., 2010; SOBRINHO et al., 2012; VIDES et al., 2011).

Os gatos são naturalmente infectados por *L. infantum chagasi*, sendo que nos últimos 20 anos pesquisas identificaram a infecção nesta espécie em diversos países, tais como: Israel (NASEREDDIN et al., 2008), Irã (HATAM et al., 2009; SARKARI et al., 2009), Grécia (DIAKOU et al., 2009), Suíça (RÜFENACHT et al., 2005), Itália (POLI et al., 2002), Espanha (AYLLON et al., 2008; SHERRY et al., 2011; SOLANO-GALLEGO et al., 2007), Portugal (CARDOSO et al., 2010; MAIA et al., 2010) e Brasil (CARDIA et al., 2013; COELHO et al., 2011; SOBRINHO et al., 2012; VIDES et al., 2011). As pesquisas desenvolvidas são, em quase sua totalidade, de cunho epidemiológico e empregam métodos sorológicos no estabelecimento do

diagnóstico. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) são as principais técnicas utilizadas em inquéritos epidemiológicos devido especialmente a facilidade em executá-las e ao seu baixo custo (MAIA et al., 2008; SOBRINHO et al., 2012; SOLANO-GALLEGO et al., 2007). Porém, divergências na padronização das metodologias e, por consequência, na prevalência da infecção em uma mesma região, alertam quanto às dificuldades na aplicabilidade destes métodos como diagnóstico. Autores referem que a baixa qualidade no diagnóstico de leishmaniose visceral em gatos por meio de técnicas sorológicas se deve a diferenças quanto à resposta imunológica desenvolvida nestes animais (COSTA et al., 2010; SOLANO-GALLEGO et al., 2007; VITA et al., 2005).

Apesar dos relatos na literatura confirmarem a infecção por *Leishmania* spp. em gatos, escassas publicações discorrem sobre os sinais clínicos desenvolvidos por estes animais. Por este motivo, ainda não se conhece com segurança as principais alterações clínicas que devem estar associadas à doença. Autores ainda salientam a presença de coinfeções no momento do diagnóstico de leishmaniose, infecções estas que podem estar relacionadas aos sinais clínicos presentes no paciente (DA SILVA et al., 2010; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007; SIMÕES-MATTOS et al., 2004). Quando da avaliação clínica de gatos infectados observam-se quadros de linfadenomegalia (CHATZIS et al., 2014; PENNISI et al., 2004; POLI et al., 2002; SOBRINHO et al., 2012; VIDES et al., 2011), hepatoesplenomegalia (SOBRINHO et al., 2012), desidratação (PENNISI et al., 2004; SOBRINHO et al., 2012; VIDES et al., 2011), hipertermia (POLI et al., 2002), êmese (CHATZIS et al., 2014), diarreia (CHATZIS et al., 2014; VIDES et al., 2011), anorexia (CHATZIS et al., 2014; PENNISI et al., 2004), periodontite (VIDES et al., 2011), ceratite (CHATZIS et al., 2014; LEIVA et al., 2005) e, mais notadamente, as lesões cutâneas (CHATZIS et al., 2014; HATAM et al., 2009; OZON et al., 1998; PENNISI et al., 2004; POLI et al., 2002; SHERRY et al., 2011; SOBRINHO et al., 2012; VIDES et al., 2011). Vale destacar a existência de relatos de animais infectados em boas condições gerais, que permaneceram assintomáticos durante todo o

estudo (AYLLON et al., 2008; CHATZIS et al., 2014; COELHO et al., 2011; DIAKOU et al., 2009; MAIA et al., 2008; NASEREDDIN et al., 2008; SHERRY et al., 2011; SOBRINHO et al., 2012).

O diagnóstico de leishmaniose visceral deve ser sempre confirmado por meio de exames complementares, uma vez que os sinais clínicos não são patognomônicos e podem sugerir outras enfermidades (MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007). Dentre os exames disponíveis estão as técnicas sorológicas (ELISA e RIFI), os métodos parasitológicos direto e as técnicas moleculares (CHATZIS et al., 2014; COELHO et al., 2011; MAIA et al., 2008; SOBRINHO et al., 2012; VIDES et al., 2011).

O emprego da RIFI como diagnóstico da leishmaniose visceral felina vem sendo reportado nos últimos anos. Em diversos estudos observam-se diferenças quanto à escolha do anticorpo conjugado; no entanto, a grande divergência ocorre no que tange ao ponto de corte da reação, ou seja, em qual titulação pode-se considerar a amostra reagente. Neste contexto, observam-se trabalhos que consideram os felinos infectados quando apresentam soro reagente na concentração de 1:2 (MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007), de 1:16 (MAIA et al., 2008) e, outros, que apontam como o título a ser determinado para positividade valores iguais ou superiores à 1:40 (AYLLON et al., 2008; MAIA et al., 2008; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007; VITA et al., 2005). Ainda, em uma pesquisa realizada em Portugal foi observada baixa correlação entre este exame sorológico e o método molecular, identificando a infecção em 19,72% dos gatos avaliados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) com apenas 1,31% de sororeagentes (MAIA et al., 2010).

A reação de ELISA também apresenta discordâncias entre os autores quanto à sua metodologia, com concentrações do anticorpo conjugado com proteína A apresentando variações de 1:100 a 1:8.000 e concentrações de soro com variação de 1:40 a 1:400 (COSTA, 2008; FIGUEIREDO et al., 2009; NASEREDDIN et al., 2008; ROSSI, 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2007). Com esta técnica, dois estudos realizados no município de Araçatuba – São Paulo identificaram prevalências semelhantes de infecção em gatos, com

valores de 11,5% e 12,91% (COSTA et al., 2010; SOBRINHO et al., 2012). Contudo, não houve correlação entre os animais sororeagentes e os parasitologicamente positivos, sendo que as formas amastigotas do parasito foram identificadas em apenas 8,7% (COSTA et al., 2010) e 25,6% (SOBRINHO et al., 2012) dos gatos sororeagentes.

O exame parasitológico direto fundamenta-se na demonstração de formas amastigotas do parasito em esfregaços de tecidos. A sensibilidade da citologia depende da densidade parasitária do órgão, da qualidade do esfregaço e das habilidades do observador (CHATZIS et al., 2014). No entanto, este método apresenta uma especificidade de 100% e possui vantagens como a simplicidade e a rapidez na sua execução.

As técnicas moleculares, como a PCR, ampliam seletivamente sequências de DNA do parasito. A detecção do DNA é possível em uma variedade de tecidos, entretanto autores referem que o tropismo celular ou a imunidade específica de um órgão podem interferir na real prevalência da infecção (CHATZIS et al., 2014; FRANCINO et al., 2006). Ainda, a sensibilidade desta técnica permite identificar os animais infectados em qualquer estado clínico, sintomático ou assintomático, na dependência do tecido em que a reação é realizada (MOHAMMADIHA et al., 2013). Estudos anteriores indicaram que, em áreas endêmicas para leishmaniose visceral, de 10% a 62% dos cães soronegativos assintomáticos apresentaram amplificação de DNA para *Leishmania* spp. por meio da PCR (ANDRADE et al., 2006; MARTÍNS-SÁNCHEZ et al., 2001; SOLANO-GALLEGO et al., 2001).

Na literatura compulsada a discussão do melhor método para o diagnóstico de leishmaniose felina é crescente. Em vista das dificuldades com a utilização dos exames sorológicos, os métodos parasitológicos e moleculares apresentam vantagens. Esta afirmação deve-se principalmente à alta especificidade destas técnicas, no entanto, a menor sensibilidade do método parasitológico o torna um desafio para os pesquisadores. Em um estudo realizado em gatos com dermatopatias no município de Araçatuba, foram identificadas formas amastigotas do parasito por meio de exame parasitológico

direto de órgãos linfóides em 18,2% dos animais e, em 16,4% dos gatos por meio da reação de imunohistoquímica em lesões cutâneas. Vale destacar que 18,5% dos gatos infectados tiveram o estabelecimento do diagnóstico da infecção apenas por imunohistoquímica (VIDES et al., 2011). Outro estudo também demonstra a baixa sensibilidade do exame parasitológico direto quanto comparado com a PCR. Na pesquisa da infecção por *L. infantum chagasi* em 100 gatos por meio de exame parasitológico direto e por PCR em diferentes tecidos, observou-se amplificação de DNA de *L. infantum* em 41 animais, porém em nenhum animal foi identificado o parasito pelo exame direto (CHATZIS et al., 2014). Assim, esses resultados evidenciam a importância da associação de métodos para o diagnóstico de leishmaniose felina.

Enquanto na espécie canina os métodos sorológicos são utilizados rotineiramente como testes de diagnóstico para a leishmaniose visceral, devido à elevada sensibilidade e especificidade dos mesmos, rapidez do diagnóstico, baixo custo e à facilidade de execução das técnicas, o mesmo não ocorre com felinos. Devido à falta de estudos em gatos, nada se sabe sobre sua resposta imunológica frente a esta infecção e especula-se que haja maior resistência quanto à doença nesta espécie animal. Um consenso entre os autores revela a importância do entendimento imunológico nesta espécie a fim de se justificar o motivo pelo quais os gatos, na sua maioria, não desenvolvem sinais clínicos ou títulos de anticorpos detectáveis (MAIA; CAMPINO, 2011).

O conhecimento da resposta imune envolvida na leishmaniose é essencial para o entendimento da patogênese e do curso clínico da doença. O resultado da infecção por *L. infantum chagasi* depende de uma complexa relação entre o indivíduo e o agente etiológico. Após a introdução do parasito na pele, ocorre a fagocitose do mesmo por macrófagos. Nestas células as formas amastigotas replicam-se, culminando na lise celular com subsequente disseminação linfática e hematogênica do parasito, que atinge principalmente os linfonodos, a medula óssea, o fígado e o baço (BARBOSA et al., 2011). Em relação a esse último, autores afirmaram que o baço é o órgão alvo da infecção por *Leishmania* spp. e, que ainda, é o responsável pela maior resposta imune

na doença; contudo, salientaram que o conhecimento da resposta celular neste compartimento é limitado (LAGE et al., 2007). Entretanto, de acordo com Barbosa et al. (2011), cada tecido do hospedeiro desenvolve uma resposta imune que parece ser regulada pelo próprio parasito. Os autores identificaram uma resposta mista de Th1 e Th2 em leucócitos de cães sintomáticos, com um padrão Th2 predominante, enquanto nos linfonodos a resposta Th1 foi a mais evidente.

O início de uma resposta imune eficaz requer uma interação entre as células apresentadoras de antígenos (macrófagos e células dendríticas) e a imunidade adaptativa (células T e células B). As citocinas produzidas por macrófagos e células dendríticas são pré requisitos para a formação dos mecanismos de resistência ou suscetibilidade no desenvolvimento da doença (KUSHWAHA et al., 2011; YANNAM et al., 2012).

A infecção por *L. infantum chagasi* em cães apresenta um quadro clínico dinâmico, variando entre formas subclínicas e sintomáticas. Estudos identificaram uma dicotomização na resposta imunológica em camundongos, cuja resposta protetora está relacionada com a ausência de sinais clínicos. Nestes animais, acredita-se que haja o desenvolvimento de uma resposta Th1, com produção de citocinas e ativação de macrófagos. Por outro lado, a suscetibilidade à infecção ocorre por intermédio da supressão da resposta celular do tipo Th1, com consequente aumento do título de anticorpos mediados pelos linfócitos Th2 (FOWELL et al., 1998; GUMY et al., 2004; REINER; LOCKSLEY, 1995; ROGERS et al., 2002; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002.). Na espécie canina esta proteção (Th1) e suscetibilidade (Th2) para a doença na forma visceral não demonstra uma clara dicotomização, com identificação de respostas celulares mistas e/ou predomínio de um tipo celular (CARRILLO; MORENO, 2009; KUSHAWAHA et al., 2011; MARTÍNEZ-MORENO et al., 1995; PANARO et al., 2009; PINELLI et al., 1994; QUINNELL et al., 2011; RODRÍGUEZ-CÓRTEZ et al., 2007; STRAUSS-AYALI et al., 2007).

Entretanto, de acordo com Nylén e Sacks (2007), a doença ativa não está relacionada com o domínio de Th1 ou Th2, ou ainda com a falha nestas respostas. Os autores acreditam que pacientes sintomáticos apresentam condições imunossupressoras relacionadas à patogênese da doença. Esta conclusão foi baseada na presença de um elevado nível de citocinas em pacientes humanos doentes com leishmaniose visceral, o que sugere a presença de uma resposta imunológica adequada. Ainda, Manna et al. (2006), relataram que a virulência do parasito e o estado imunológico são fatores que determinam o resultado da infecção.

Os linfócitos são leucócitos produzidos na medula óssea que se diferenciam em células T regulatórias (Treg), células T citotóxicas e células T auxiliares (Th). As células regulatórias inibem as respostas imunológicas e são estimuladas pelo fator transformador de crescimento beta (TGF- β) e pela interleucina 2 (IL-2), acrescidos da diminuição de IL-23. A diferenciação destas células culmina com a inibição de processos inflamatórios mediados por IL-10 e TGF- β . As células T citotóxicas (CD8+) atuam diretamente sobre os antígenos por meio da produção de perforinas e por apoptose. A literatura conceitua a presença de três subpopulações de linfócitos T auxiliares, conhecidas como Th1, Th2 e Th17 (Figura 1) (BETTELLI et al., 2007; DARDALHON et al., 2008; GORIELY et al., 2009; PAUL, 2010).

Para que ocorra a diferenciação das células TCD4+ em Th1 são necessárias as comunicações entre as células da imunidade inata e as células Th0. Por meio da produção de interferon gama (IFN- γ) e de IL-12, secretadas por células dendríticas e macrófagos, ocorre a ativação de proteínas tais como o fator T-bet, STAT1 e STAT4, que promovem a transcrição de Th1 (AMSEN et al., 2009; DARDALHON et al., 2008; PAUL, 2010). Quando ativadas, as células Th1 produzem citocinas pró-inflamatórias, tais como o IFN- γ , o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e as interleucinas IL-2, IL-6 e IL-12 (BETTELLI et al., 2007; DARDALHON et al., 2008; NYLÉN; SACKS, 2007).

A diferenciação das células em Th2 é mediada pela ativação de proteínas denominadas STAT6 pela interleucina IL-4. Uma vez ativada, a

STAT6 induz a expressão de GATA3, o qual controla a diferenciação da Th2 e inibe a expressão de STAT4, opondo-se, assim, à diferenciação da célula em Th1 (AMSEN et al., 2009). Os linfócitos Th2 secretam interleucinas antiinflamatórias como a IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-25, bem como o TGF- β . Desta forma, sua função está relacionada diretamente com a proliferação de linfócitos B e subsequente produção de anticorpos (BETTELLI et al., 2007; DARDALHON et al., 2008).

Outra linhagem de linfócitos vem despertando a atenção dos pesquisadores. Esta, denominada de Th17 não requer os fatores de transcrição para serem diferenciadas e são moduladas apenas por citocinas. A diferenciação ocorre pela combinação das interleucinas IL-6 e TGF- β e são estabilizadas na presença de IL-23. Uma via alternativa para a sua ativação decorre da relação de IL-21 com o TGF- β , embora pareça ser menos eficaz do que a primeira combinação de interleucinas. Esta diferenciação é antagonizada na presença de IL-25, IL-27 e IFN- γ . Esses linfócitos Th17 produzem citocinas pró-inflamatórias tais como IL-17A, IL-17F e IL-21, com funções definidas na eliminação de patógenos e na indução de processos tissulares imunomediados (BETTELLI et al., 2007; PAUL, 2010).

A investigação da atividade de cada interleucina demonstra a complexidade envolvida no processo, visto que uma mesma citocina desenvolve funções em diversas vias da resposta imunológica. Essas citocinas podem ativar células T e macrófagos, diferenciar células T e recrutar células efetoras adequadas para o local da inflamação (STRAUSS-AYALI et al., 2007). Na literatura consultada, além de exercerem diversos papéis na patogenia da leishmaniose visceral, estudos apontam contradições na expressão de uma mesma citocina em cães, sintomáticos ou assintomáticos, e em humanos com a doença ativa (CHAMIZO et al., 2005; PANARO et al., 2009).

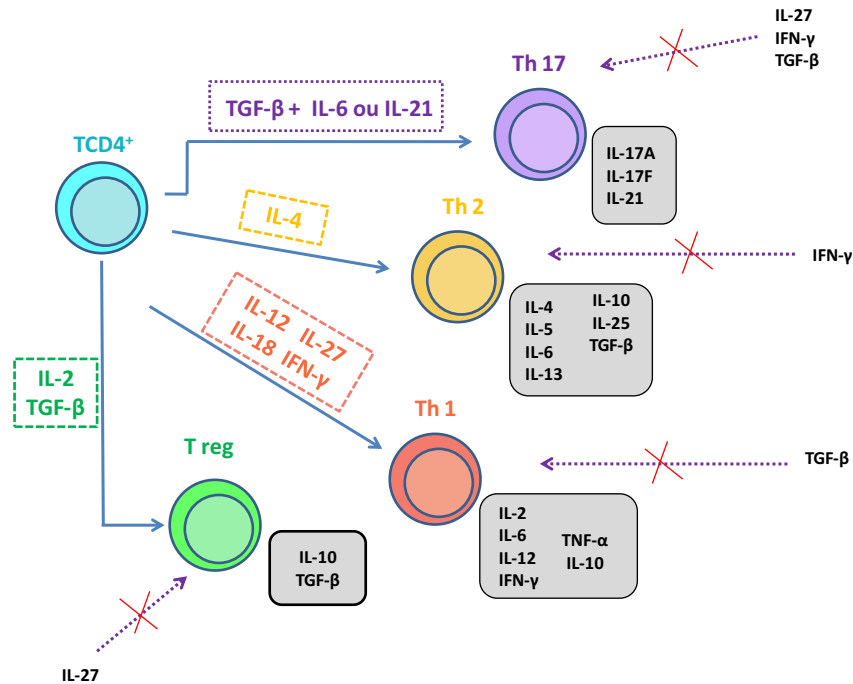


Figura 1 - Desenvolvimento das linhagens das células Th1, Th2, Th17 e Treg a partir da célula TCD4⁺. A diferenciação e a inibição de cada célula T são iniciadas pela presença de citocinas específicas.

A principal diferenciação do IFN são os seus subtipos: IFN- α e IFN- γ , produzidos por meio do contato de produtos antigênicos com o sistema imune. O IFN tipo I (IFN- α) promove a expressão de IL-10, a produção de IL-27 e inibe a diferenciação das células Th17. O IFN tipo II (IFN- γ), juntamente com TNF- α , aumentam a expressão da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) nos macrófagos, enzima esta que gera espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, tais como o superóxido e o óxido nítrico, eficazes para o eliminação da *Leishmania* em ambiente intracelular. Esta citocina é produzida por células Th1, embora células NK também possam produzi-la (GORIELY et al., 2009; PINELLI et al., 1994). Quanto à sua ação, autores afirmam que o parasito interfere na capacidade das células em expressar IFN- γ imediatamente após a infecção, porém durante o período de incubação e com o surgimento da infecção a capacidade das células é restaurada (LAGE et al., 2007).

Pesquisas recentes indicam que o IFN- γ está intimamente relacionado com a patogênese da leishmaniose visceral, exercendo efeito protetor contra a infecção ou efeito promotor da doença. Chamizo et al. (2005) e Alves et al. (2009), observaram uma elevada expressão de IFN- γ em cães infectados assintomáticos, enquanto Panaro et al. (2009) associaram a progressão da doença com a presença de IFN- γ . Não obstante, Corrêia et al. (2007), relacionaram a presença desta citocina com a cronicidade da doença e o pior prognóstico do hospedeiro e, ainda, evidenciaram uma maior quantificação desta citocina no fígado quando comparado ao baço de cães infectados. Hailu et al. (2005), identificaram altos níveis de IFN- γ no plasma de pacientes humanos com leishmaniose visceral ativa.

A interleucina IL-12 é a primeira citocina liberada em um tecido infectado e é essencial para a iniciação e polarização da resposta imune e também para a inibição da apoptose das células Th1 (PARK et al., 2005). Esta interleucina é produzida por células dendríticas e por macrófagos, desempenhando um papel importante na fase inicial da inflamação, porém por um curto período de tempo (BANETH, 2006; ROBERTS, 2006).

Manna et al. (2006) detectaram a ausência da expressão de IL-12 após seis meses do diagnóstico da doença em cães assintomáticos e uma expressão significativa da interleucina, neste mesmo período, em animais sintomáticos. Lage et al. (2007) avaliaram a expressão da interleucina no baço de 37 cães. Nos animais saudáveis foram observadas as expressões de IL-12, todavia nos cães infectados apenas em cinco dos 30 animais sintomáticos detectou-se essa expressão. Os autores concluem que estatisticamente não houve diferença quanto à expressão de IL-12 entre os animais infectados e não infectados, assim como nos achados de Barbosa et al. (2011) que verificaram a expressão similar desta interleucina em cães sintomáticos, assintomáticos e não infectados.

A interleucina IL-4 é a principal interleucina reguladora da diferenciação de linfócitos Th2, responsável também pela especificidade na troca de classe de IgG e diferenciação de macrófagos em macrófagos tipo II (GUO et al.,

2005). As referências revelam que a expressão desta interleucina é por vezes não detectada ou é evidenciada em baixos níveis em cães infectados, entretanto, alguns pesquisadores identificaram sua expressão em cães sintomáticos em níveis semelhantes às de cães não infectados. Michelin et al. (2011), analisaram a carga parasitária e as expressões de IL-4 e IL-10 em baço e fígado de cães sintomáticos e assintomáticos. O estudo não identificou diferenças entre a quantificação de IL-4, IL-10 e a carga parasitária entre os grupos, porém identificou um aumento na quantificação das duas interleucinas quando comparadas com o grupo controle. Ainda, Lage et al. (2007) não identificaram a expressão da interleucina em nenhum dos cães do grupo controle e evidenciaram a presença da expressão em seis dos 30 animais infectados sintomáticos analisados. Por outro lado, Barbosa et al. 2011 identificaram níveis similares na expressão de IL-4, IL-10 e IFN- γ na medula óssea de cães sintomáticos, assintomáticos e saudáveis.

A interleucina IL-10 é produzida por fagócitos, células dendríticas, células T, células B, células exterminadoras naturais (NK) e por células epiteliais (ALVES et al., 2009; NYLÉN; SACKS, 2007). Segundo Roberts (2006), a produção de IL-10 por células T origina-se principalmente das células Th2 e Treg. Por intermédio de suas ações, esta interleucina é capaz de desativar os macrófagos, inibindo suas funções leishmanicidas; suprimir a apresentação de antígenos e a maturação das células dendríticas; suprimir a produção de IFN- γ pelas células T e NK; regular negativamente a interleucina IL-12 e promover a sobrevivência das células B, as quais também são fonte de IL-10. As células B, por sua vez, levam à produção de anticorpos e a formação de imunocomplexos, que acarretam em dano tecidual. Esses complexos imunes podem estimular macrófagos a produzir IL-6, TNF- α e IL-10, entre outros, realizando o “feedback” positivo da interleucina (ALVES et al., 2009; LAGE et al., 2007; NYLÉN et al., 2007). Acredita-se ainda que as células Th1 produzam IL-10, necessária para suprimir a imunidade e evitar uma inflamação letal (ANDERSON et al., 2009).

Enquanto alguns estudos revelam uma associação direta entre níveis elevados de IL-10 e susceptibilidade à infecção no hospedeiro (TRINCHIERI, 2007), Carrillo e Moreno (2009) sugerem a ausência de participação desta interleucina na imunorregulação da leishmaniose visceral. Lage et al. (2007), correlacionaram o aumento da expressão de mRNA para IL-10 com a progressão da doença, enquanto Resende et al. (2013), observaram uma correlação entre o desenvolvimento de uma forma grave da doença com uma redução nos níveis de IL - 10 na presença de IL-17 na infecção por *L. major*. Ainda, Alves et al. (2009), observaram uma elevada expressão de IL-10 em cães sintomáticos e expressões similares entre os cães assintomáticos e os não infectados por *L. infantum*.

A IL-10 também está relacionada com a regulação dos danos causados pelos efeitos exacerbados do TNF- α , quando de um predomínio da resposta Th1 (CHAMIZO et al., 2005). Embora níveis elevados de IL-10 possam ajudar a limitar as alterações imunomediadas, as atividades imunossupressoras da interleucina podem promover a replicação do parasito e culminar com a progressão da doença. Um estudo evidenciou esta participação ao identificar a resistência à infecção por *L. donovani* em camundongos com deficiência de receptores para IL-10 (MURRAY, 2003; MURPHY, 2001). Diferenças entre a quantificação desta interleucina em vários tecidos também foram relatadas. Corrêia et al. (2007) revelaram uma relação de produção cinco vezes maior de IL-10 no fígado em relação ao baço de cães sintomáticos e assintomáticos.

Outras interleucinas também estão presentes na resposta imunológica contra infecções. A IL-2 regula a produção de anticorpos pela célula B e a diferenciação das células Treg, com subsequente restrição das atividades das células efetoras (BARBOSA et al., 2011). A IL-18 induz ao desenvolvimento de uma resposta Th1, aumenta a expressão de IFN- γ por células T e células NK e, ainda, eleva a citotoxicidade dessas células (CHAMIZO et al., 2005)

A avaliação de citocinas tornou-se um componente importante no estudo das doenças inflamatórias, infecciosas e neoplásicas. A identificação da transcrição de citocinas é uma abordagem que revela o envolvimento de uma

citocina em um processo imunológico. O método mais sensível e específico para determinar este nível de transcrição é pela reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR). Numerosos métodos foram descritos para a quantificação de mRNA e a natureza exponencial da PCR baseada na eficiência da reação viabilizam as variações de erros padrões significativos. Esta variação ainda é eliminada por meio da adição de controle interno padrão e fator de correção (DEAN et al., 1998).

3. OBJETIVOS

Face ao exposto, o presente estudo teve por objetivos avaliar a expressão gênica das interleucinas IL-12, IL-4, IL-10 e IFN- γ por meio da técnica de RT-PCR em tempo real no baço de gatos hígdos e de gatos naturalmente infectados, sintomáticos e assintomáticos, por *Leishmania infantum chagasi*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais utilizados

Para a realização do presente estudo foram utilizados dois grupos de felinos (*Felis catus domesticus*) naturalmente infectados por *Leishmania* spp. e, um terceiro grupo de gatos denominado de grupo controle. Todos os animais eram provenientes do município de Araçatuba – São Paulo, área considerada endêmica para leishmaniose visceral. O diagnóstico inicial da doença baseou-se no achado de formas amastigotas do parasita por exame parasitológico direto em amostras de medula óssea e de linfonodos e/ou por meio de amplificação do DNA de *Leishmania* na medula óssea. Os critérios utilizados para a divisão dos grupos foram a presença da amplificação de DNA do parasito na medula óssea e de sinais clínicos. Sendo assim, o primeiro grupo e o segundo grupo foram compostos por seis gatos cada, infectados por *Leishmania infantum chagasi*, sintomáticos e assintomáticos respectivamente e, o terceiro grupo, por seis gatos não infectados e hígidos.

4.2 Delineamento experimental

Foi utilizado um total de 95 gatos para o delineamento do grupo experimental, composto por dezoito animais e acompanhados durante o período entre os meses de setembro de 2011 a abril de 2013. Para a realização do experimento foi oferecido aos proprietários a castração dos animais, objetivando o acesso para a realização da biopsia esplênica para a posterior avaliação da expressão gênica das interleucinas. Inicialmente os proprietários eram notificados sobre todos os procedimentos a serem realizados e, após o consentimento dos mesmos e assinatura de um termo de compromisso, marcava-se uma data para realização de exame físico geral e,

caso o animal se encontrasse em condições de ser submetido a um procedimento cirúrgico, a data da cirurgia era agendada.

Os animais foram sedados com acepromazina (dose: 0,05 mg/kg/IM) e morfina (dose: 0,3 mg/kg/IM) e monitorados por dez minutos. Após este tempo, realizava-se a tricotomia e a cateterização da veia. Posteriormente colhia-se sangue total da veia jugular para posterior obtenção de soro, e efetuava-se a punção biopsia aspirativa de linfonodo poplíteo e de medula óssea, na região da crista ilíaca, para a confecção de lâminas e para o armazenamento em ependorfes com RNA later^{®1}. Após esta etapa, a indução anestésica era promovida com o uso de ketamina (dose: 5 mg/kg/IV) e midazolam (dose: 0,3 mg/kg/IV), seguida da castração dos gatos. Nas fêmeas adotou-se o acesso retro-umbilical e nos machos era realizada por meio da incisão da bolsa escrotal. Imediatamente após a castração, efetuava-se a biopsia esplênica, utilizando o mesmo acesso da ovariosalpingohisterectomia nas fêmeas e, nos machos, por meio de um novo acesso pré-retro umbilical. Realizava-se então a sutura em três planos (muscular, subcutâneo e pele) e os animais eram acompanhados por sete dias, onde recebiam antibioticoterapia (enrofloxacina na dose de 5 mg/kg/sid/VO) e analgesia (cloridrato de tramadol na dose de 3 mg/kg/bid/SC). Os gatos foram avaliados quanto à presença de anticorpos antívirus da imunodeficiência felina (FIV) e/ou do antígeno do vírus da leucemia felina (FeLV) no soro, e aqueles que apresentaram resultados positivos para as retrovirose foram excluídos do estudo.

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

4.3 Obtenção de soro

As amostras de sangue obtidas por punção da veia jugular foram mantidas à temperatura ambiente até a retração visível do coágulo para, a seguir, serem centrifugadas a 600G durante 10 minutos, obtendo-se assim o

¹ RNA later[®] Stabilization Solution – Life Technologies AM 7020

soro. Este foi transferido em alíquotas para ependorfes e armazenado a - 20°C até o momento de seu processamento.

4.4 Pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* spp. por meio de exames citológicos de linfonodo poplíteo e de medula óssea

As punções biopsia aspirativas de linfonodos foram realizadas com agulhas 25X7 e as de medula óssea com agulha 40X12 (Figura 2), acopladas a seringas de 10 mL e 20 mL, respectivamente. Para a realização da triagem dos grupos, após a confecção dos esfregaços, as lâminas foram coradas com corante hematológico² e observadas ao microscópio de luz, em objetiva de 100X, para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* spp.

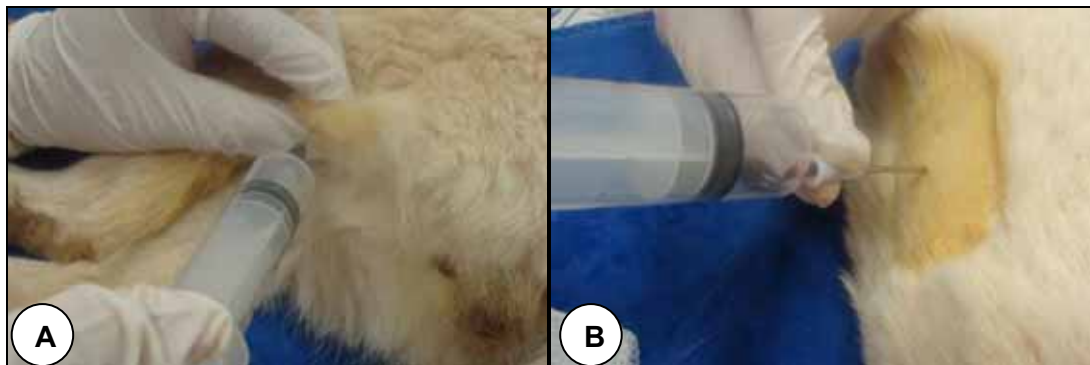


Figura 2 – Punção biopsia aspirativa de linfonodo poplíteo (A) e de medula óssea, na região da crista íliaca, (B) de felino proveniente de área endêmica para leishmaniose visceral (Araçatuba, 2014).

4.5 Biopsia esplênica

Por intermédio de uma incisão pré retro-umbilical foi realizada a exposição do baço para a avaliação macroscópica. Da margem superior do órgão foi efetuada a excisão de um fragmento de aproximadamente 0,5 cm com o auxílio de pinça hemostática e lâmina de bisturi. O local biopsiado era recoberto com o omento e o baço era orientado na cavidade abdominal. O

² Panótico Rápido – Laborclin

fragmento era estocado a -80°C em ependorfes livres de RNase e DNase, contendo 1,0 mL de RNA later[®], para posterior análise da expressão de mRNA das citocinas.

4.6 Pesquisa de anticorpos anti-vírus da imunodeficiência felina (FIV) e de antígenos do vírus da leucemia felina (FeLV)

As amostras de soro dos gatos foram avaliadas quanto à presença de anticorpos anti-vírus da imunodeficiência felina (FIV) e de antígenos do vírus da leucemia felina (FeLV) por meio do kit comercial SNAP Combo FeLV/FIV Test³, de acordo com as recomendações do fabricante.

4.7 Pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*

4.7.1 Ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto

Para a pesquisa de IgG no soro dos gatos por meio da técnica de ELISA indireto, empregou-se a seguinte metodologia: as microplacas foram cobertas com antígeno total de *Leishmania chagasi* (MHOM/BR/72/cepa46), em uma concentração de 10µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M, pH9.5, e incubadas por 18 horas a 4°C. As placas foram bloqueadas com 150µL de solução salina tamponada (PBS), acrescida de leite desnatado a 10%⁴ e in ² IDEXX[®] Laboratories, Westbrook, ME, USA as
 ar ³ Leite desnatado Molico[®] - Nestlé JS
 (animalia cadavere de area nas clinicas para terminados viscera). ELISAS foram testadas em duplicata, diluídas 1:200 em solução salina tamponada contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e, incubadas por uma hora à 37°C. Colocaram-se 100µL por poço de proteína A marcada com peroxidase⁵ diluída 1:40.000 em PBS-T. Após a incubação por 45 minutos à 37°C foram adicionados 100µL de uma solução de tetrametilbenzidina⁶, com posterior incubação por 30 minutos ao abrigo da luz, em temperatura ambiente. A reação

³ IDEXX[®] Laboratories, Westbrook, ME, USA

⁴ Leite desnatado Molico[®] - Nestlé

⁵ Sigma – Aldrich Brasil LTDA cód. P8651

⁶ BD – TMB Substrate Reagent cód. 555214

foi interrompida adicionando-se a cada poço 50µL de ácido sulfúrico 2N (H₂SO₄) e, a densidade óptica (D.O.) foi avaliada a 450nm utilizando o leitor de ELISA⁷. Entre cada etapa as placas foram lavadas com solução PBS-T por três vezes. Os resultados foram expressos pela média da densidade óptica obtida dos soros em duplicata.

A determinação do ponto de corte foi estabelecida utilizando-se a média das densidades ópticas de 17 animais parasitologicamente negativos e de área não endêmica para leishmaniose visceral, acrescida de dois desvios padrões. Desta forma, foi considerado o ponto de corte de 0,225.

4.7.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Lâminas de vidro para realização de RIFI foram sensibilizadas adicionando-se a cada círculo 20 mL da suspensão de parasitos (MHOM/BR/72/cepa46), em solução salina tamponada (SST). Após a secagem em estufa, as lâminas foram embaladas em papel extra-fino e papel alumínio e, armazenadas em freezer à - 20°C. No momento do uso as lâminas foram descongeladas em estufa durante dez minutos. Foram, então, adicionados 20µL das amostras séricas dos gatos a serem testados, bem como, em cada lâmina, uma amostra de controle positivo e negativo, todas diluídas nas concentrações de 1:20 e 1:40 em SST. As lâminas foram, em seguida, incubadas em câmara úmida à 37°C por 30 minutos e lavadas por imersão em três banhos de SST de cinco minutos cada. Após a secagem, foram acrescidos 20µL do anticorpo anti-IgG de gato fluoresceinado⁸ diluído a 1:100 em azul de Evans 4mg%. As lâminas foram novamente incubadas e lavadas como descrito anteriormente. Posteriormente foram montadas com glicerina tamponada com carbonato-bicarbonato (pH 8,0) e recobertas por lamínula, sendo a leitura efetuada em microscópio de imunofluorescência em objetiva 40X. Foram consideradas reagentes as amostras que apresentaram as promastigotas fluorescentes, inclusive no flagelo e, não reagentes as amostras que não apresentaram fluorescência, tendo uma cor avermelhada. As amostras

⁷ Labsystems Multiskan EX

⁸ Sigma-Aldrich® cód F4262

positivas na concentração 1:40 foram novamente processadas, diluídas em 1:40, 1:80, 1:160 e 1:320, para a titulação de cada amostra sérica. Em cada lâmina foram utilizadas novamente amostras de controles positivos, negativos para a validação do teste.

4.8 Amplificação de DNA de *Leishmania* spp. por meio da reação de cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

4.8.1 Amostra

Para a detecção de DNA do parasita foi colhido, de cada animal, 0,5 mL de medula óssea, a qual foi armazenada em ependorfes com citrato de sódio a – 20°C até seu processamento.

4.8.2 Cultura de *Leishmania chagasi*

Para a padronização da reação, a fim de se avaliar a eficiência da mesma, foi confeccionada uma curva padrão. Para tanto, foi utilizada uma cultura de *Leishmania infantum chagasi* em meio de Schneider sob a descrição: MHON/BR72/cepa 46 – USP. Assim, procedeu-se a preparação da cultura para a extração de DNA e a contagem de células em câmara de Neubauer com formol a 1%. A concentração obtida foi de 2×10^8 promastigotas/ mL. Este material foi utilizado para a padronização e para o controle da reação.

4.8.3 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras foi realizada por meio do kit comercial DNeasy Blood & Tissue kit⁹, seguindo as recomendações do fabricante. Para tal foram utilizados 200 µL de medula óssea. A extração de DNA da cultura de *Leishmania infantum chagasi* foi efetuada utilizando-se o protocolo de extração

⁹ Qiagen®, Valencia, CA, EUA cód 69506

com fenol/clorofórmio. O DNA total foi quantificado em espectrofotômetro¹⁰ e, incluído no estudo, quando a relação de absorvância no comprimento de onda 260/280 estivesse entre 1,8 e 2,0, a fim de garantir a qualidade da amostra.

4.8.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional para teste de viabilidade das amostras

A reação em cadeia da polimerase para o citocromo B foi realizada para testar a viabilidade do método de extração das amostras de medula óssea. Para este teste utilizou-se três amostras extraídas com o protocolo do kit comercial DNeasy Blood & Tissue kit e três amostras extraídas pelo método fenol/clorofórmio. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores do citocromo B encontram-se apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso utilizados na reação em cadeia da polimerase convencional para validação das amostras (Araçatuba, 2014).

| Gene alvo | Oligos | Sequência (5' → 3') |
|--------------------|------------|-------------------------------------|
| <i>Citocromo B</i> | Senso | AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA |
| <i>Citocromo B</i> | Anti-senso | AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA |

Assim, as amostras foram incubadas a 95°C por 1 minuto e, então, por 25 ciclos de amplificação (95°C por 15 segundos, seguido de 49°C por 30 segundos e, por último, 72°C por 30 segundos). Na sequência, as amostras foram submetidas a uma temperatura de 72°C por 8 minutos para posterior alcançarem 4°C, culminando com o término da reação. Com o produto da reação fez-se a eletroforese, utilizando no gel de agarose o corante azul de bromofenol como tampão de corrida, com um peso molecular de 50 pares de base (Figura 3). Após o resultado, optou-se pela extração com o kit comercial, uma vez que há maior facilidade na execução do procedimento, menor

¹⁰ NanoDrop ND-1000, Nano-Drop Technologies®, Wilmington, DE, EUA

toxicidade dos produtos e, principalmente, por demonstrar qualidade no produto extraído.

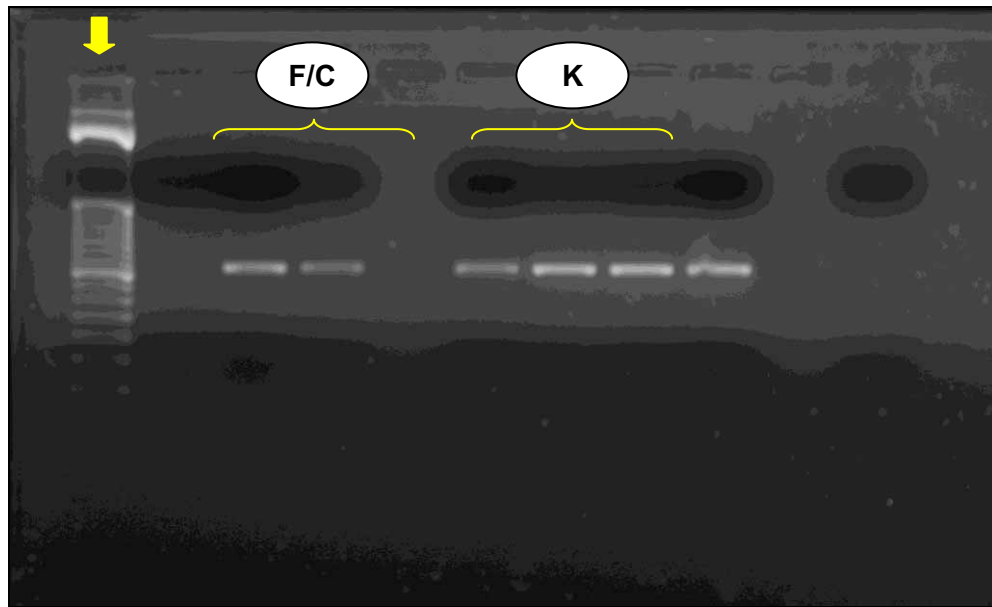


Figura 3 – Gel de agarose com produtos da reação da PCR para citocromo B. Na primeira coluna (seta) nota-se o peso molecular de 50 pares de base. As três primeiras colunas (F/C) são as amostras extraídas com fenol/clorofórmio e as três seguintes (K) são as extraídas com o kit comercial (Araçatuba, 2014).

4.8.5 Padronização das concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores para a pesquisa de DNA de *Leishmania* spp.

Para a padronização das concentrações dos primers de *Leishmania* spp. JW11/JW12 (Quadro 2) a serem utilizadas nas reações, foram avaliadas as possíveis combinações das concentrações de 300 nM, 600 nM e 900 nM dos oligonucleotídeos senso e anti-senso.

Quadro 2 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso utilizados na PCR para pesquisa de DNA de *Leishmania* spp. (Araçatuba, 2014).

| Gene alvo | Oligos | Sequência (5' → 3') | Referência |
|-------------------|------------|-------------------------|---------------------------|
| <i>Leishmania</i> | Senso | CCTATTTTACACCAACCCCCAGT | Ranasinghe et al. 2008 |
| <i>Leishmania</i> | Anti-senso | GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA | Ranasinghe et al. 2008 |

Inicialmente, os primers foram diluídos em uma concentração de 100 µM denominada de “solução mãe”, sendo posteriormente diluídos em uma solução de trabalho de 10 µM cada. Foram, então, realizados os cálculos para a definição dos volumes de cada primer para a sua padronização. A reação foi efetuada em duplicata, utilizando-se mastermix comercial com o fluoróforo SYBR Green¹¹. As amostras foram incubadas em termociclador a 94°C por 2 minutos e, então, por 40 ciclos de amplificação (94°C por 15 segundos, seguido de 60°C por 1 minuto), momento em que os dados de fluorescência foram coletados. Na sequência, as amostras foram submetidas a uma curva de dissociação (*melt curve*), de 60°C até 95°C, com incremento de 0,5°C a cada 5 segundos. O controle positivo da reação foi baseado nas diluições da cultura de *L. infantum chagasi* e o controle negativo no NTC, ambos em duplicata.

As concentrações escolhidas foram as de 600 nM para cada oligonucleotídeo (Apêndice 1A). A determinação das concentrações fundamentou-se na temperatura de *melt* de 83,5°C, com pico de *melt* único, e nos valores de Ct mais precoces.

4.8.6 Confeção da curva padrão

Com a definição das concentrações de cada primer foi efetuada a curva padrão. Para tal, foi utilizado o DNA extraído da cultura de *Leishmania infantum chagasi*. Resumidamente, as promastigotas foram tratadas com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1)¹² e o DNA precipitado em etanol

¹¹ SYBR® Green JumpStart Taq ReadMix S4438, Sigma-Aldrich®, Saint Louis, EUA

¹² P3803, Sigma-Aldrich®, Saint Louis, EUA.

absoluto gelado, ressuspendido em 50 µL de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). O DNA total foi quantificado em espectrofotômetro e foi incluído nas análises subsequentes somente se o valor da relação de absorbância 260/280 estivesse entre 1,8 e 2,0. Cinco diluições seriadas (de 2×10^7 ; 2×10^6 ; 2×10^5 ; 2×10^4 ; a 2×10^3 promastigotas/mL) foram realizadas para composição da curva padrão (Apêndices 2A e 3A). Para esta reação foram utilizadas as mesmas condições de ciclos e temperaturas descritas anteriormente.

4.8.7 PCR em tempo real para pesquisa de DNA de *Leishmania* spp. em amostras de medula óssea

Um total de 95 amostras de medula óssea foi processado para a obtenção do diagnóstico da presença de DNA do parasito no tecido. A reação foi realizada em termociclador¹³ utilizando mastermix comercial com o fluoróforo SYBR Green, 600 nM de cada oligonucleotídeo iniciador e 40 ng de DNA, totalizando 25 µL em cada poço da placa de reação. As amostras foram avaliadas em duplicata e incubadas nas mesmas condições de temperatura descritas. Como controle negativo foi utilizado mastermix acrescido de água livre de nucleases, sem a presença da amostra; e como controle positivo utilizou-se a concentração de 2×10^6 de promastigotas da cultura de *L. infantum chagasi*; ambos também em duplicata.

4.9 Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) para avaliação da expressão de citocinas no baço

4.9.1 Extração de RNA das amostras

As amostras de tecido esplênico armazenadas em solução preservadora de RNA a -80°C foram equilibradas a temperatura ambiente e a extração de RNA foi realizada utilizando-se o kit *RiboPure*^{TM14}, seguindo as especificações descritas pelo fabricante. O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro e

¹³ CFX96TM Real-Time System, Bio-Rad®, Hercules, CA, EUA

¹⁴ *RiboPure* AM1924, Life Technologies®, CA, USA

somente as amostras com valor da relação de absorbância 260/280 entre 1,8 e 2,0 foram incluídas nas análises subsequentes. O RNA foi armazenado a -80°C até o momento da transcrição reversa.

4.9.2 Produção de cDNA

As amostras de RNA foram submetidas à transcrição reversa para a produção de cDNA utilizando-se o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription*¹⁵. Resumidamente, 200 ng de RNA de cada amostra, diluídos em água livre de nucleases, foram incubados em solução contendo a enzima transcriptase reversa, oligonucleotídeo iniciador do tipo oligo (dT) e inibidor de RNase, em um termomixer, obedecendo os seguintes ciclos: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e, ao final, alcançando 4°C. Com a mesma metodologia descrita anteriormente, realizou a produção de cDNA de uma amostra denominada de *pool*. Para a construção desta, foram utilizados aleatoriamente dois animais de cada grupo, sendo, portanto, constituída de seis amostras totais. A quantidade total de RNA dessa alíquota foi estabelecida em 500 ng. Com este material foi possível estabelecer a padronização de cada reação quanto à concentração dos primers, e a realização da curva padrão. O material obtido de todas as extrações foi armazenado a -20°C até o momento das reações de amplificação (qPCR).

4.9.3 Oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise

Oligonucleotídeos iniciadores e sondas para análise de interleucinas e do gene de referência β -actina na espécie felina foram selecionados da literatura científica (Quadro 3). As sondas de hidrólise foram conjugadas ao fluoróforo (reporter dye) FAM na extremidade 5', e ao supressor (quencher dye) BHQ-1 na extremidade 3'.

¹⁵ *High-Capacity cDNA Rev. Transcription* 4368813, Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA

Quadro 3 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores senso, anti-senso e das sondas de hidrólise utilizados nas qPCRs para a avaliação da expressão gênica das citocinas (Araçatuba, 2014).

| Gene alvo | Oligos | Sequência (5' → 3') | Referência |
|---------------------------|---------------|------------------------------------|--------------------------|
| <i>Beta-actina</i> | Senso | GACTACCTCATGAAGATCCTCACG | Scott et. al, 2011 |
| <i>Beta-actina</i> | Anti-senso | CCTTGATGTCACGCACAATTTC | Scott et. al, 2011 |
| <i>Beta-actina</i> | Sonda | ACAGTTTCACCACCACCGCCGAGC | Scott et. al, 2011 |
| <i>IL-12p40</i> | Senso | TGGCTTCAGTTGCAGGTTCTT | Leutenegger et. al, 1999 |
| <i>IL-12p40</i> | Anti-senso | TGGACGCTATTCACAAGCTCA | Leutenegger et. al, 1999 |
| <i>IL-12p40</i> | Sonda | CGGTTTGATGATGTCCCTGATGAAGAAG CT | Leutenegger et. al, 1999 |
| <i>IFN-γ</i> | Senso | CACCAAGATCTAACCTGAGGAAGC | Leutenegger et. al, 1999 |
| <i>IFN-γ</i> | Anti-senso | TATTGCAGGCAGGATGACCAT | Leutenegger et. al, 1999 |
| <i>IFN-γ</i> | Sonda | CGATGCTCTACGGCCTCGAAACAGA | Leutenegger et. al, 1999 |
| <i>IL-4</i> | Senso | GCATGGAGCTGACCGTCAT | Leutenegger et. al, 1999 |
| <i>IL-4</i> | Anti-senso | CGGTTGTGGCTCTGCAGA | Leutenegger et. al, 1999 |
| <i>IL-4</i> | Sonda | TGGCAGCCCCTAAGAACACAAGTGACAA | Leutenegger et. al, 1999 |
| <i>IL-10</i> | Senso | ACTTTAAGGGTTACCTGGGTTG | Ignacio et. al, 2005 |
| <i>IL-10</i> | Anti-senso | CGTGCTGTTTGATGTCTGG | Ignacio et. al, 2005 |
| <i>IL-10</i> | Sonda | TTGGAGGAGGTGATGCCCCA | Ignacio et. al, 2005 |

4.9.4 Padronização das concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores de interleucinas

Para o gene de referência beta-actina e para cada interleucina realizou-se a padronização dos oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso, utilizando as concentrações de 240 nM, 480 nM, 720 nM e 960 nM para cada primer (Apêndices 1B, 2B, 3B, 4B e 5B). A sonda foi determinada em uma concentração de 240 nM de acordo com ensaios prévios. A reação foi conduzida de maneira semelhante à reação para detecção de DNA de *Leishmania* spp., no entanto, para as interleucinas utilizou-se o mastermix comercial *TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix*¹⁶.

Sendo assim, os primers foram diluídos em uma concentração de 100 µM denominada de “solução mãe”, sendo posteriormente diluídos em uma solução de trabalho de 20 µM cada. Assim, os cálculos para a definição dos volumes de cada primer foram realizados. As amostras foram incubadas, em duplicata, em termociclador a 50°C por 2 minutos, seguido de 95°C por 10 minutos e, então, por 39 ciclos de amplificação (95°C por 15 segundos, seguido de 60°C por 1 minuto), momento em que os dados de fluorescência foram coletados. Para o teste da padronização das concentrações foram utilizadas as amostras denominadas de “pool”, incubadas com os reagentes (primers, mastermix, sonda e água livre de nucleases) e, como controle negativo da reação utilizou-se os mesmos reagentes, porém sem a presença das amostras (NTC).

Em todas as reações foi possível observar uma homogeneidade nas diferentes concentrações de cada primer. Desta forma, foi determinada uma concentração padrão de 480 nM para cada primer de cada interleucina, visando a facilidade nos volumes de pipetagem e o não desperdício de material utilizando maiores concentrações.

¹⁶ TaqMan Universal PCR Master Mix 4304437, Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA

4.9.5 Curva padrão das interleucinas

A curva padrão de cada interleucina e do gene de referência foi realizada no intuito de validar a reação quanto à sua eficiência. Com a definição das concentrações dos primers, foi realizada a confecção da curva utilizando as amostras de cDNA do “pool”. Diluições seriadas (500 ng, 250 ng, 125 ng, 62,5 ng, 31,25 ng, 15,62 ng e 7,81 ng) foram realizadas para a composição desta reação (Apêndices 1C, 2C, 3C, 4C e 5C). Para tal, foram utilizadas as mesmas condições de ciclo e temperatura descritas anteriormente.

4.9.6 Avaliação da expressão gênica das interleucinas

A reação de qPCR foi realizada em termociclador utilizando mastermix comercial *TaqMan® Universal PCR Master Mix*, 480 nM de cada oligonucleotídeo iniciador, 240 nM da sonda e 5 µL de cDNA, num volume total de 25 µL. As amostras, em duplicatas, foram incubadas como descrito anteriormente. Como controle negativo foi utilizado mastermix acrescido de água livre de nucleases, sem a presença da amostra; e como controle positivo utilizou-se a concentração 250 ng da amostra denominada *pool*; ambos também em duplicata.

A quantificação da expressão gênica das citocinas foi avaliada pelo método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$, segundo Livak e Schmittgen (2001), usando o sinal do gene de referência beta-actina para normalização dos dados. Os resultados foram descritos como a expressão gênica relativa, ou seja, esse método expressa o número de vezes (fold change) que determinado gene está mais ou menos expresso nos grupos infectados em relação ao grupo controle.

4.10 Análise estatística

Os valores obtidos da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foram transformados na escala logarítmica de base 10. Para a análise comparativa da expressão gênica das interleucinas de acordo com os grupos infectados (sintomáticos e assintomáticos) utilizou-se o teste t de Student. A correlação entre a expressão gênica das interleucinas foi avaliada pelo teste de Pearson. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas empregando o programa SAS¹⁷.

¹⁷ Statistical Analysis System, SAS Institute

5. RESULTADOS

5.1 Animais

Na população ora estudada foram selecionados 12 animais infectados por *L. infantum chagasi*. Destes, sete (58,3%) foram identificados por meio de exame parasitológico direto e nos 12 (100%) foi possível amplificar o DNA do parasita na medula óssea. Em nenhum animal do grupo controle foram identificadas formas amastigotas por exame parasitológico direto ou amplificado DNA de *Leishmania* spp. na medula óssea. As principais características da população avaliada quanto a idade e sexo estão apresentadas na Tabela 1.

Do ponto de vista do quadro clínico, todos os animais do grupo 1 apresentavam sinais clínicos gerais. Os achados de exame físico mais frequentemente observados foram as lesões dermatológicas em 4/6 (66,7%) gatos, perda de peso em 3/6 (50%), úlcera em cavidade oral em 2/6 (33,3%), secreção ocular em 1/6 (16,7%), linfadenopatia em 1/6 (16,7%) e esplenomegalia em 1/6 (16,7%) (Figura 4). As lesões dermatológicas visualizadas destacavam-se pela presença de rarefação pilosa em pavilhão auricular bilateral, seguida de alopecia circular em região cefálica e cervical, alopecia miliar em região dorsal e presença de descamação furfurácea generalizada (Tabela 2).

Tabela 1 - Distribuição quanto ao sexo e faixa etária de 18 gatos domiciliados em Araçatuba – São Paulo, subdivididos em três grupos. Grupo 1: composto por seis felinos sintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*; grupo 2: constituído por seis felinos assintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*; e grupo 3: constituído por 6 felinos hígidos, não infectados (grupo controle). Número absoluto e porcentagem (Araçatuba, 2014)

| Variável | Grupo | Categoria | Número | Porcentagem |
|--------------|-------|------------------|--------|-------------|
| SEXO | G 1 | Fêmea | 4 | 66,7% |
| | | Macho | 2 | 33,3% |
| | G 2 | Fêmea | 5 | 83,3% |
| | | Macho | 1 | 16,7% |
| | G 3 | Fêmea | 6 | 100% |
| | | Macho | 0 | -- |
| FAIXA ETÁRIA | G 1 | 6 meses – 5 anos | 3 | 50% |
| | | 5 anos – 10 anos | 3 | 50% |
| | G2 | 6 meses – 5 anos | 6 | 100% |
| | | 5 anos – 10 anos | 0 | -- |
| | G 3 | 6 meses – 5 anos | 6 | 100% |
| | | 5 anos – 10 anos | 0 | -- |

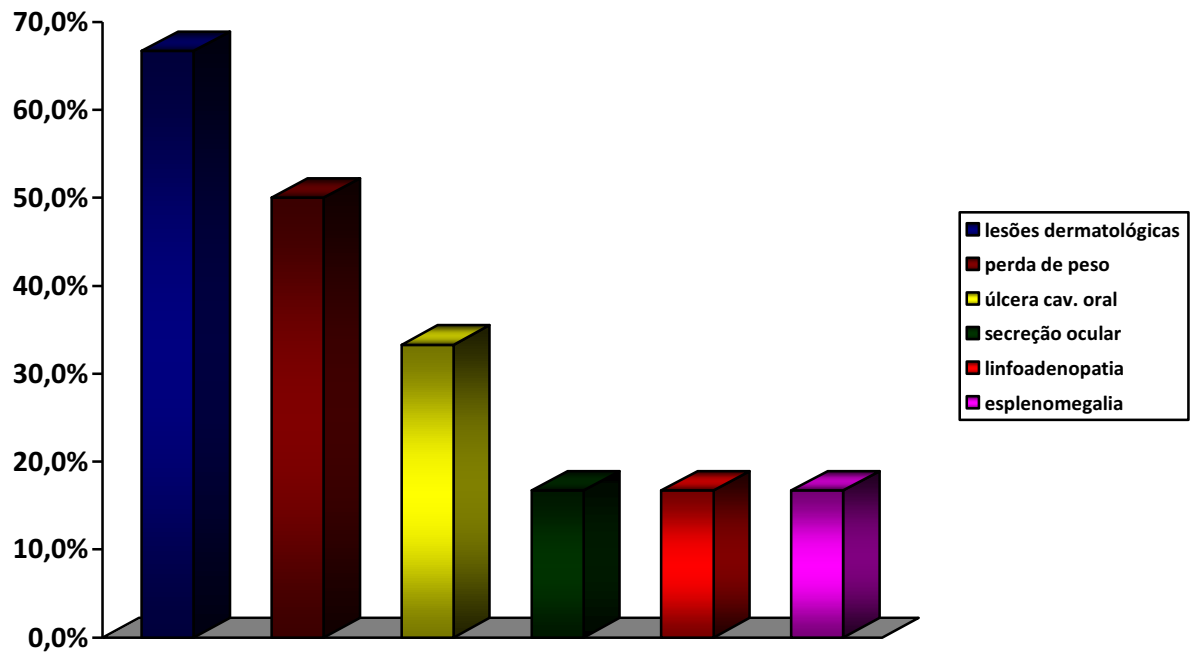


Figura 4 - Distribuição, em porcentagem, segundo as alterações de exame físico, de seis gatos naturalmente infectados por *L. infantum chagasi* (grupo 1) (Araçatuba, 2014).

Tabela 2 - Idade, sexo e sinais clínicos de felinos provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral, de acordo o grupo experimental (G1: composto por seis felinos sintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*; grupo 2: constituído por seis felinos assintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*; e grupo 3: constituído por 6 felinos hígidos, não infectados (grupo controle) (Araçatuba, 2014).

| GRUPO | ANIMAL | SEXO | IDADE (meses) | SINAIS CLÍNICOS |
|-------|--------|-------|------------------|--|
| G 1 | 1 | Fêmea | 12 | Alopecia periocular, secreção ocular purulenta, espirro, esplenomegalia |
| | 2 | Macho | 48 | Alopecia circular eritematosa disseminada em região dorsal |
| | 3 | Fêmea | 8 | Rarefação pilosa em pavilhão auricular bilateral, perda de peso, descamação furfurácea |
| | 4 | Fêmea | 120 | Perda de peso, úlcera em cavidade oral |
| | 5 | Macho | 60 | Linfoadenopatia |
| | 6 | Fêmea | 96 | Alopecia numular em região cervical e cefálica, perda de peso, úlcera em cavidade oral |
| G 2 | 7 | Fêmea | 6 | -- |
| | 8 | Macho | 6 | -- |
| | 9 | Fêmea | 18 | -- |
| | 10 | Fêmea | 24 | -- |
| | 11 | Fêmea | 36 | -- |
| | 12 | Fêmea | 24 | -- |
| G 3 | 13 | Fêmea | 12 | -- |
| | 14 | Fêmea | 12 | -- |
| | 15 | Fêmea | 36 | -- |
| | 16 | Fêmea | 12 | -- |
| | 17 | Fêmea | 24 | -- |
| | 18 | Fêmea | 12 | -- |

5.2 Detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. por meio dos métodos de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) indireto e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Das 18 amostras de soro dos gatos submetidas à técnica de ELISA, três (16,7%) foram sororeagentes (ponto de corte: 0,225). Destes três animais, em apenas um (33,3%) foram evidenciadas formas amastigotas do parasito por meio de exame parasitológico direto; nos outros dois gatos (66,7%) foi detectável a presença de DNA de *Leishmania* spp. por meio de PCR em tempo real. Os resultados da reação de imunofluorescência indireta demonstraram positividade em dois dos 18 gatos avaliados, representando 11,1% da população estudada. Vale destacar que dos dois gatos sororeagentes na RIFI, um (50%) foi sororeagente também no ELISA indireto e, nos dois, formas amastigotas do parasito foram encontradas em linfonodo e medula óssea. No grupo 2 (animais infectados assintomáticos), nenhum animal foi sorologicamente reativo pela RIFI e apenas dois (33,3%) foram sororeagentes no ELISA indireto, enquanto no grupo 1 (animais infectados sintomáticos), dois gatos foram sororeagentes na RIFI e um por meio da técnica de ELISA indireto.

5.3 Detecção de formas amastigotas de *Leishmania* spp. por meio do exame parasitológico direto de linfonodo poplíteo e de medula óssea

Foram avaliados dois esfregaços obtidos por punção biopsia aspirativa de cada órgão linfóide dos 95 gatos. O grupo 1, composto por animais sintomáticos, teve em sua totalidade a identificação do parasito no exame direto; já no grupo 2, constituído por gatos assintomáticos, a presença do parasito por exame citológico foi evidenciada em apenas um (16,7%) dos animais. Os resultados do exame parasitológico direto, dos exames sorológicos e da pesquisa do DNA do parasita em aspirado de medula óssea de cada animal encontram-se apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados de exame parasitológico direto de medula óssea, PCR em tempo real e testes sorológicos (ELISA e RIFI) para diagnóstico de leishmaniose em felinos de área endêmica para leishmaniose visceral, de acordo o grupo experimental (G1: composto por seis felinos sintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*; grupo 2: constituído por seis felinos assintomáticos infectados por *L. infantum chagasi* (Araçatuba, 2014)

| GRUPO | ANIMAL | PARASITOLÓGICO | | | |
|-------|--------|------------------------|-------------|----------|----------|
| | | DIRETO DE MEDULA ÓSSEA | PCR | ELISA | RIFI |
| G 1 | 1 | Positivo | Amplificado | Negativo | Positivo |
| | 2 | Positivo | Amplificado | Positivo | Positivo |
| | 3 | Positivo | Amplificado | Negativo | Negativo |
| | 4 | Positivo | Amplificado | Negativo | Negativo |
| | 5 | Positivo | Amplificado | Negativo | Negativo |
| | 6 | Positivo | Amplificado | Negativo | Negativo |
| G 2 | 7 | Negativo | Amplificado | Negativo | Negativo |
| | 8 | Positivo | Amplificado | Negativo | Negativo |
| | 9 | Negativo | Amplificado | Positivo | Negativo |
| | 10 | Negativo | Amplificado | Negativo | Negativo |
| | 11 | Negativo | Amplificado | Negativo | Negativo |
| | 12 | Negativo | Amplificado | Positivo | Negativo |

5.4 PCR em tempo real das amostras de medula óssea

A amplificação do DNA de *Leishmania* spp. em amostras de medula óssea foi observada nos animais selecionados para composição dos grupos 1 e 2 por meio da técnica de PCR em Tempo Real. Os valores de Ct dos animais considerados detectáveis do grupo 1 variaram entre 28,88 e 35,99 e do grupo 2 entre 32,15 e 35,81, com temperatura de melt variando entre 83,5°C e 84°C (Figuras 5 e 6). Em nenhum dos gatos do grupo controle foi observada amplificação.

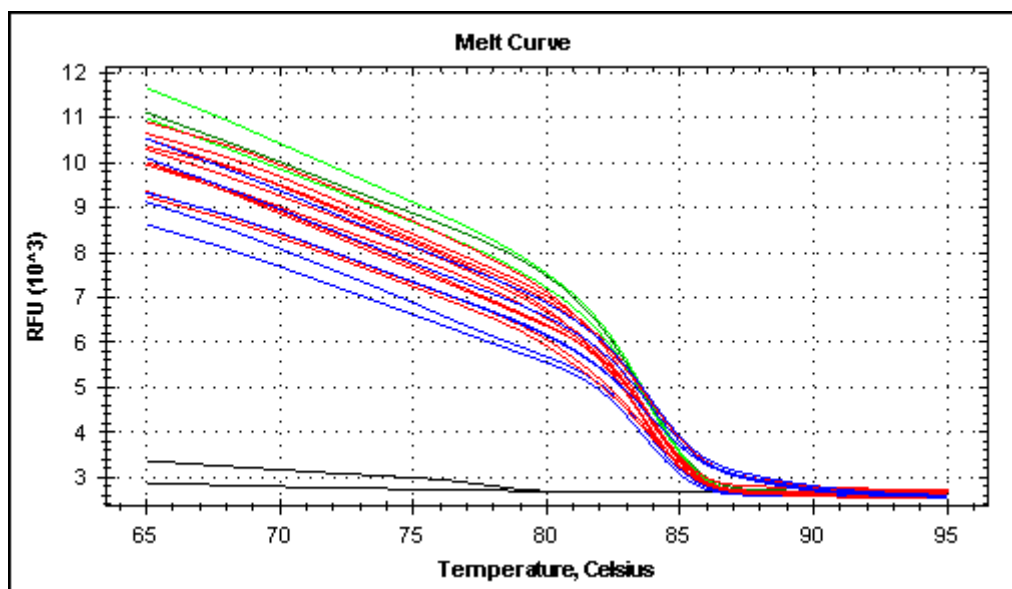


Figura 5 – Gráfico da curva de *melt* das amostras de medula óssea de seis felinos do grupo 1 (vermelho) e seis felinos do grupo 2 (azul), cujo DNA de *Leishmania* spp. foi amplificado por PCR em Tempo Real. Verde: Controle positivo (Cultura de *L. chagasi*); Preto: Controle negativo. (Araçatuba, 2014).

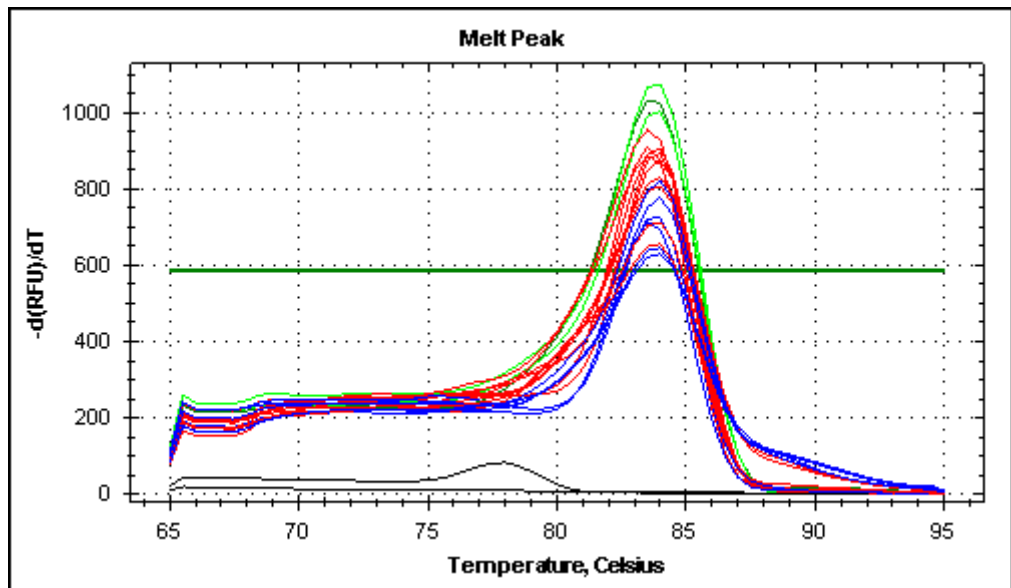


Figura 6 - Gráfico representativo dos picos de *melt* das amostras de medula óssea de seis felinos do grupo 1 (vermelho) e de seis felinos do grupo 2 (azul), cujo DNA de *Leishmania* spp. foi amplificado por PCR em Tempo Real. Verde: Controle positivo (Cultura de *L. chagasi*); Preto: Controle negativo. Temperatura de melt de 83,5°C a 84°C (Araçatuba, 2014).

5.5 Expressão gênica de mRNA do gene de referência e das interleucinas

5.5.1 Expressão gênica de mRNA para o gene de referência beta-actina

A expressão gênica do gene de referência beta-actina apresentou um Ct médio variando de 14,41 a 31,08 (Figuras 7, 8 e 9). No grupo 1 esta variação de Ct médio foi de 14,41 a 20,38; no grupo 2 observou-se intervalos entre 13,79 a 20,62 e, no grupo 3 essa variação foi maior, observada de 17,35 a 31,08 (Tabela 4).

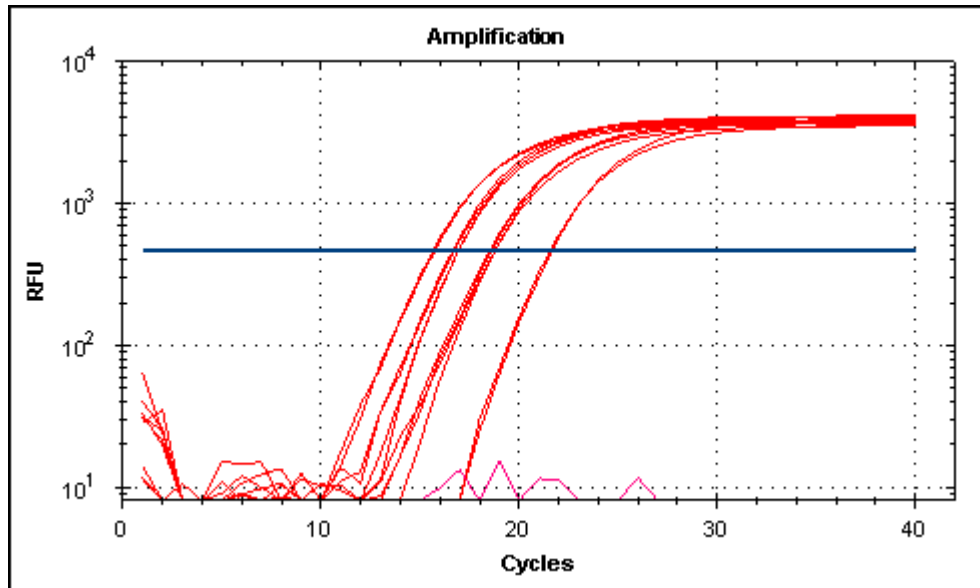


Figura 7 - Gráfico da expressão gênica de mRNA do gene de referência beta-actina em amostras de baço de gatos do grupo 1 (gatos sintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*) por RT-PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014).

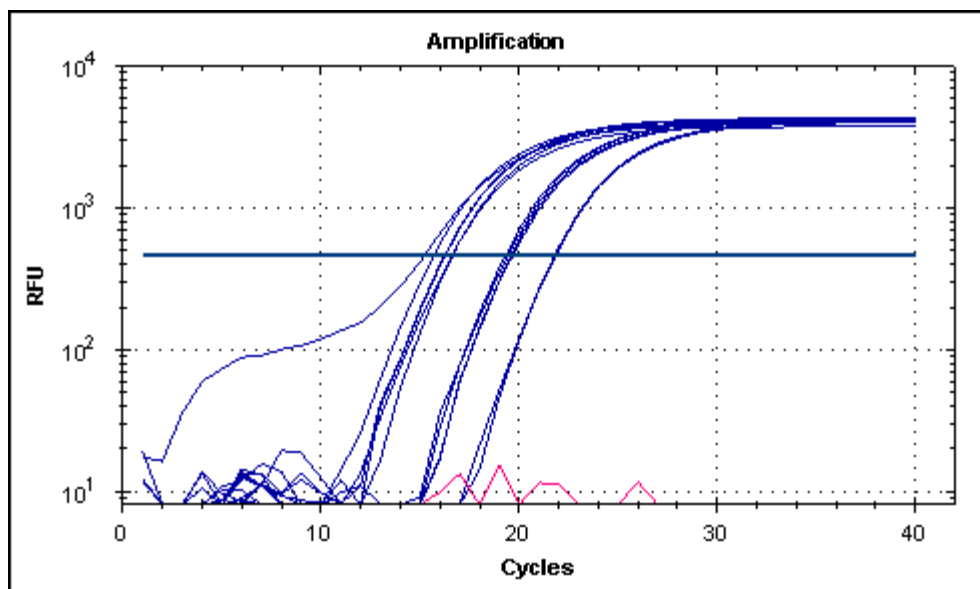


Figura 8 - Gráfico da expressão gênica de mRNA do gene de referência beta-actina em amostras de baço de gatos do grupo 2 (gatos assintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*) por RT-PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014).

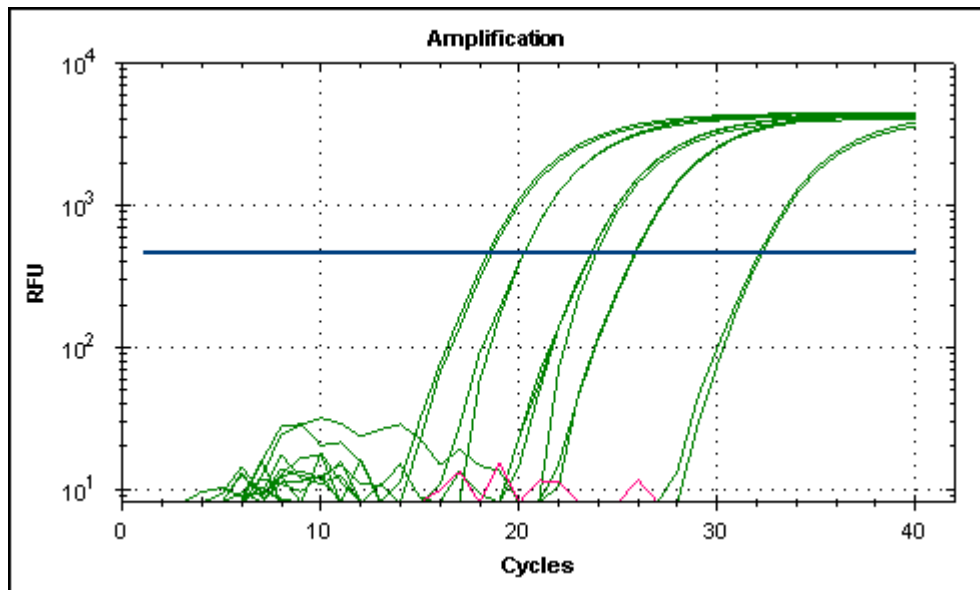


Figura 9 - Gráfico da expressão gênica de mRNA do gene de referência beta-actina em amostras de baço de gatos do grupo 3 (grupo controle) por RT-PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014).

5.5.2 Expressão gênica de mRNA para a interleucina IL-12p40

A expressão gênica da interleucina IL-12p40 apresentou um Ct médio variando de 23,21 a 30,44 (Figuras 10, 11 e 12). No grupo 1 esta variação de Ct médio foi de 22,95 a 29,07; no grupo 2 observou-se intervalos entre 23,21 a 30,44 e, no grupo 3 essa variação foi de 23,35 a 25,12 (Tabela 4).

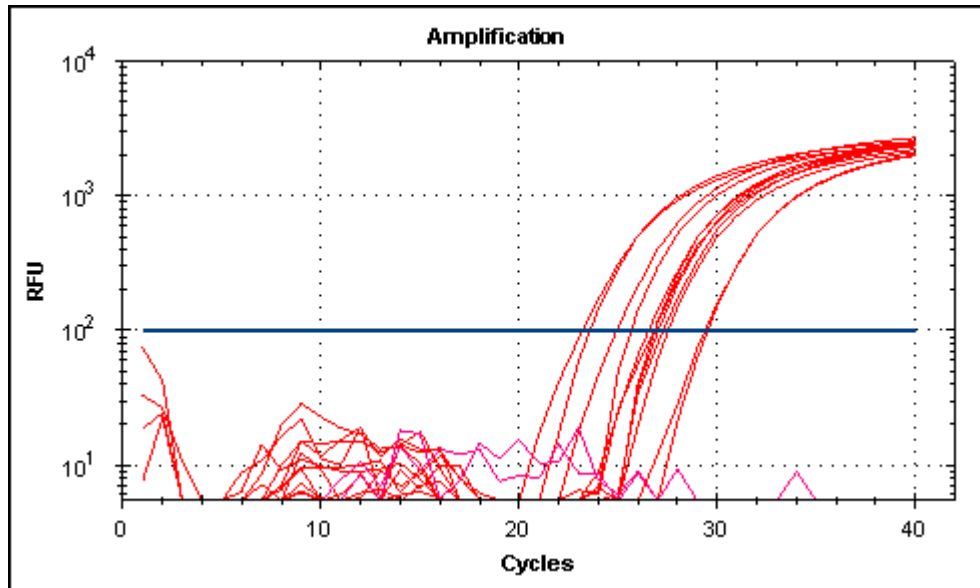


Figura 10 – Gráfico da expressão gênica de mRNA da interleucina IL-12p40 em amostras de baço de gatos do grupo 1 (gatos sintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*) por RT-PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014).

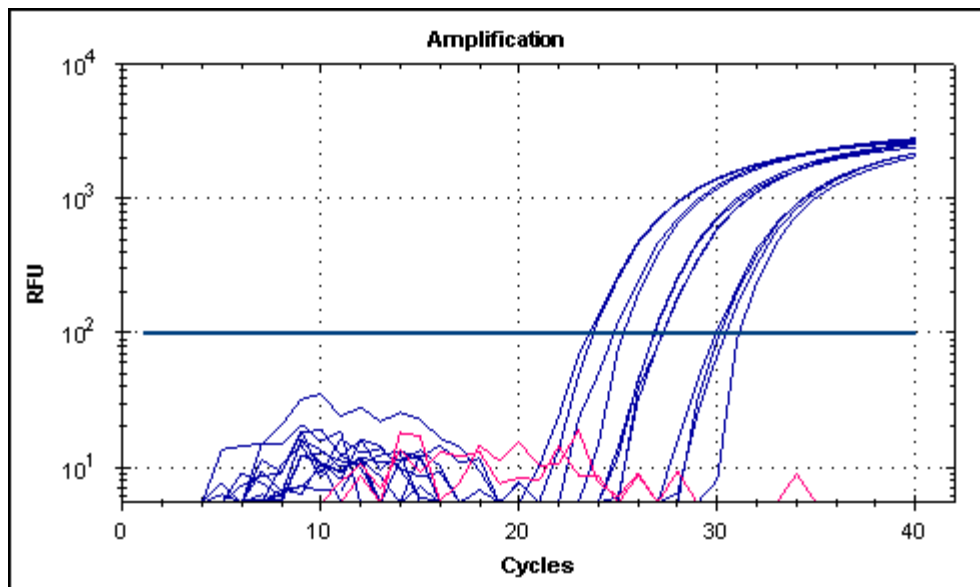


Figura 11 - Gráfico da expressão gênica de mRNA da interleucina IL-12p40 em amostras de baço de gatos do grupo 2 (gatos assintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*) por RT-PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014).

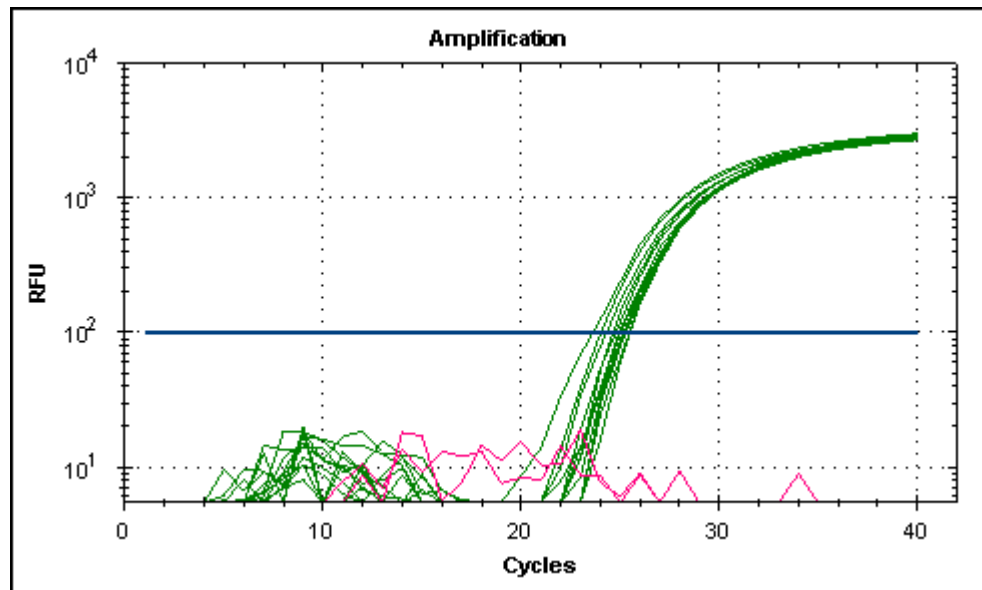


Figura 12 - Gráfico da expressão gênica de mRNA da interleucina IL-12p40 em amostras de baço de gatos do grupo 3 (grupo controle) por RT-PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014).

Nos gatos do grupo 1, a interleucina IL-12p40 teve sua expressão diminuída em 2,3 vezes em relação ao grupo controle. Essa expressão foi menor no grupo 2, observando uma diminuição de 2,52 vezes em relação ao grupo controle (Tabela 5), porém sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,5854$).

5.5.3 Expressão gênica de mRNA de interferon gama (IFN- γ)

A expressão gênica de IFN- γ apresentou um Ct médio variando de 26,06 a 37,62 (Figuras 13, 14 e 15). No grupo 1 esta variação de Ct médio foi de 26,06 a 29; no grupo 2 observou-se intervalos entre 27,36 e 30,96 e, no grupo 3 essa variação foi de 28,05 a 37,62 (Tabela 4).

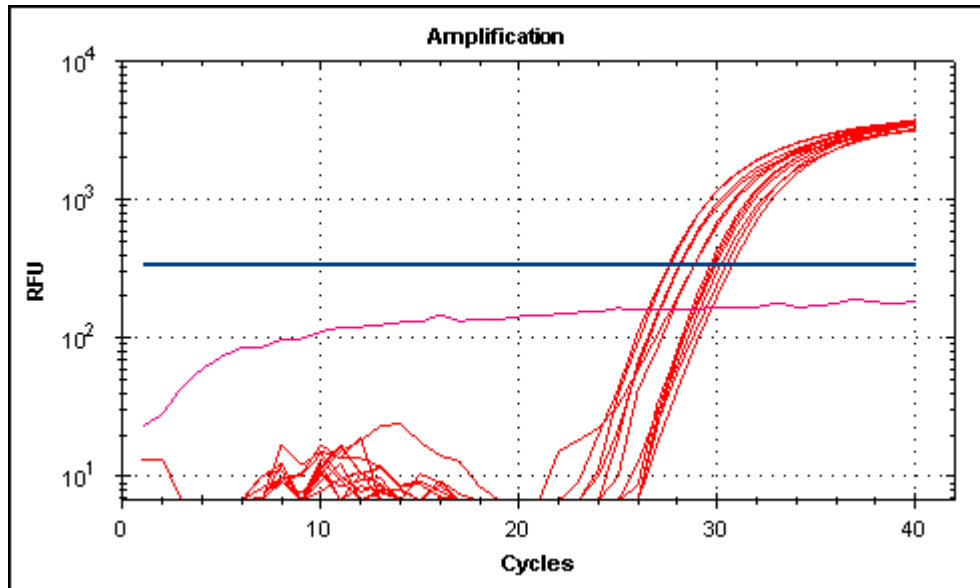


Figura 13 - Gráfico da expressão gênica de mRNA da citocina IFN- γ em amostras de baço de gatos do grupo 1 (gatos sintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*) por RT-PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014).

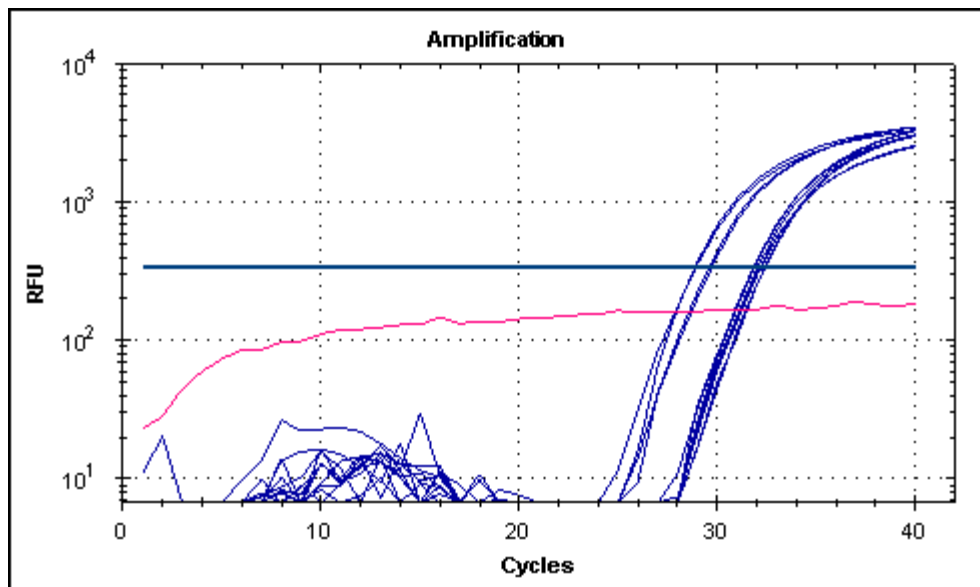


Figura 14 - Gráfico da expressão gênica de mRNA da citocina IFN- γ em amostras de baço de gatos do grupo 2 (gatos assintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*) por RT-PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014).

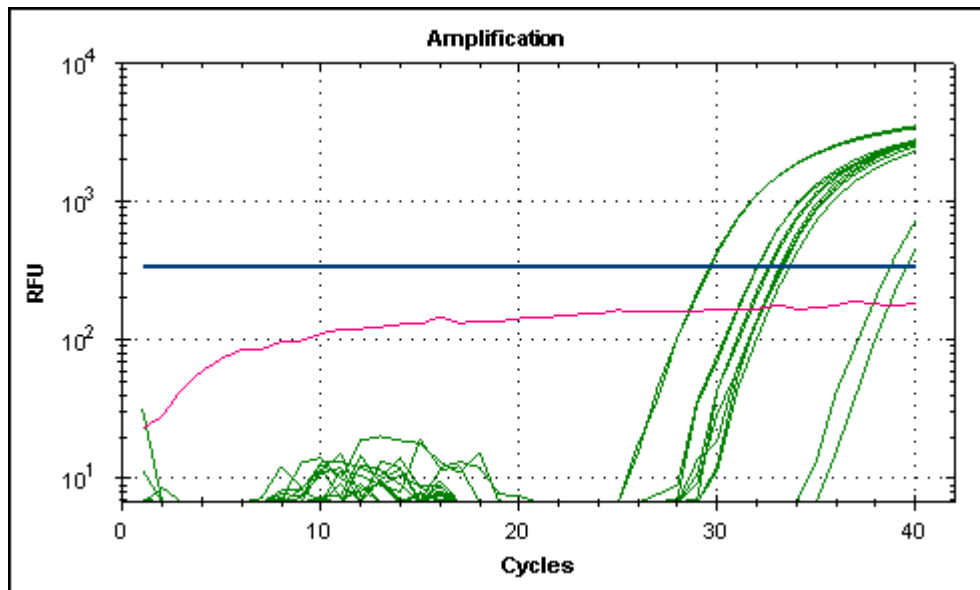


Figura 15 - Gráfico da expressão gênica de mRNA da citocina IFN- γ em amostras de baço de gatos do grupo 3 (grupo controle) por RT-PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014).

Nos gatos do grupo 1, o IFN- γ teve sua expressão diminuída em 0,57 vezes em relação ao grupo controle. Essa expressão foi menor no grupo 2, observando uma diminuição de 1,15 vezes em relação ao grupo controle (tabela 5), porém sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,1226$).

5.5.4 Expressão gênica de mRNA para a interleucina IL-4

A expressão gênica da IL-4 apresentou um Ct médio variando de 30,07 a 39,25 (Figuras 16, 17 e 18). No grupo 1 esta variação de Ct médio foi de 31,28 a 39,25; no grupo 2 observou-se intervalos entre 30,07 e 37,93 e, no grupo 3 essa variação foi de 31,17 a 33,26 (Tabela 4).

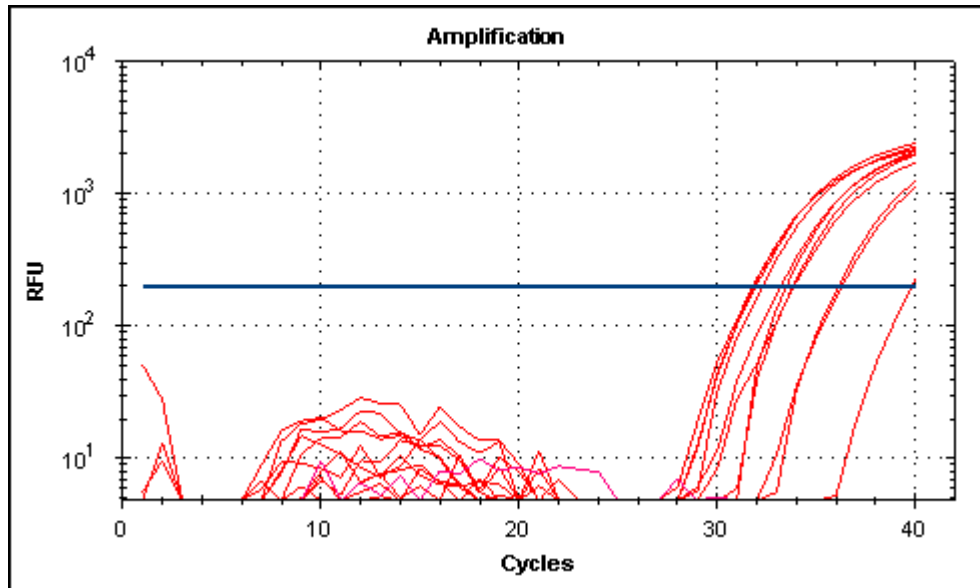


Figura 16 - Gráfico da expressão gênica de mRNA da interleucina IL-4 em amostras de baço de gatos do grupo 1 (gatos sintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*) por RT-PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014).

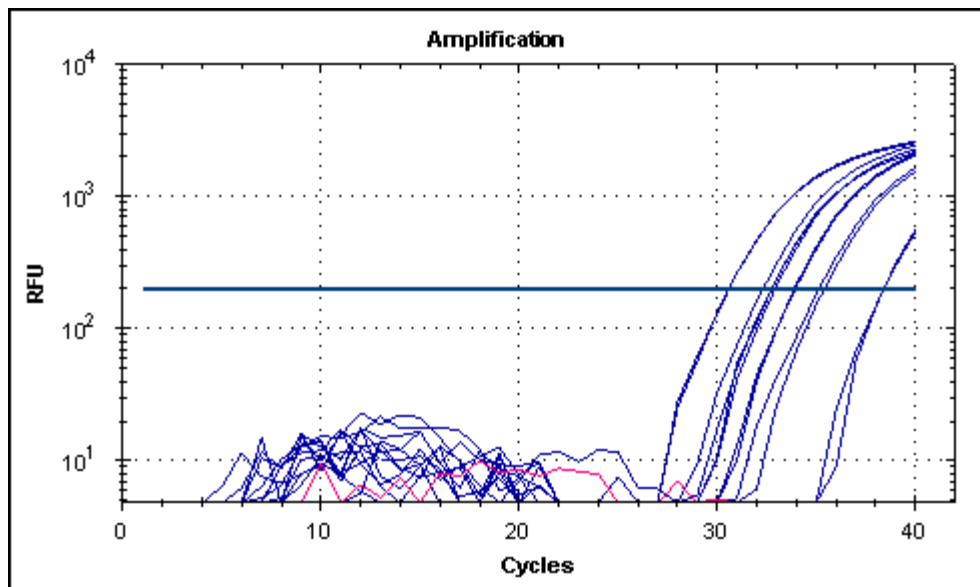


Figura 17 - Gráfico da expressão gênica de mRNA da interleucina IL-4 em amostras de baço de gatos do grupo 2 (gatos assintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*) por RT-PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014).

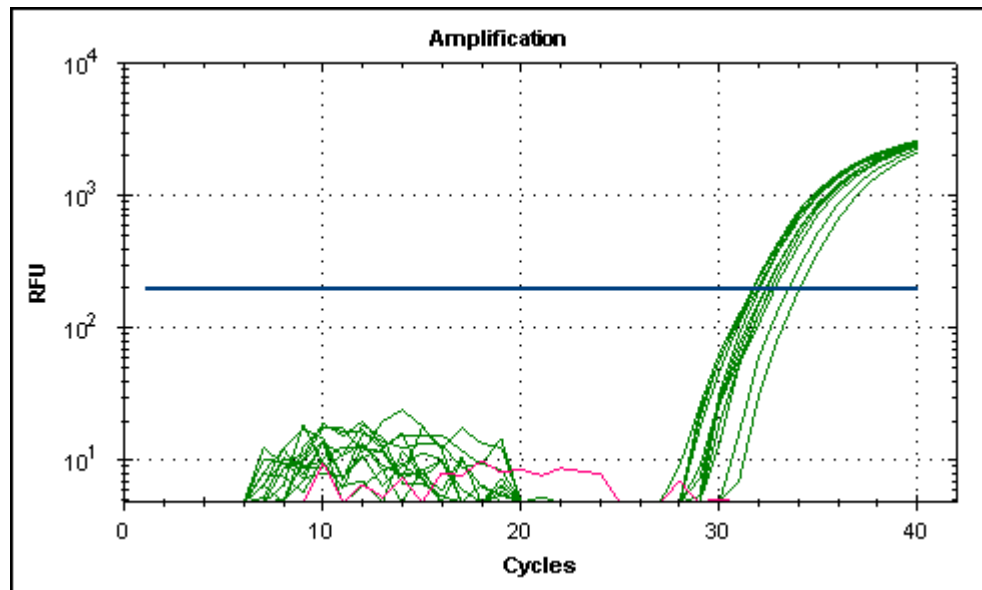


Figura 18 - Gráfico da expressão gênica de mRNA da interleucina IL-4 em amostras de baço de gatos do grupo 3 (grupo controle) por RT-PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014).

Nos gatos do grupo 1, a IL-4 teve sua expressão diminuída em 2,52 vezes em relação ao grupo controle. Essa expressão foi maior no grupo 2, observando uma diminuição de 2,22 vezes em relação ao grupo controle (Tabela 5), porém sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,7401$).

5.5.5 Expressão gênica de mRNA para a interleucina IL-10

A expressão gênica da IL-10 apresentou um Ct médio variando de 22,32 a 29,65 (Figuras 19, 20 e 21). No grupo 1 esta variação de Ct médio foi de 23,11 a 29,65; no grupo 2 observou-se intervalos entre 22,32 e 26,74 e, no grupo 3 essa variação foi de 22,68 a 24,53 (Tabela 4).

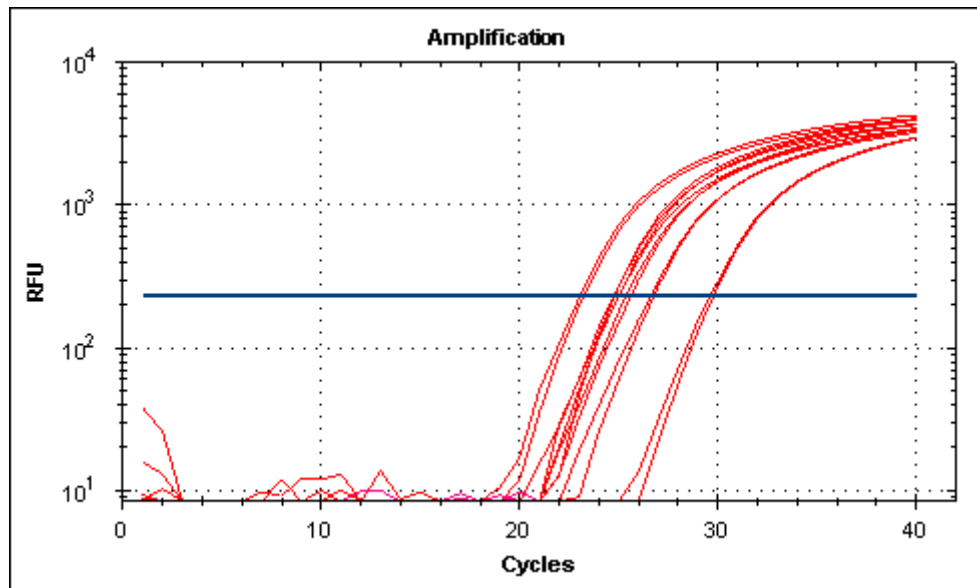


Figura 19 - Gráfico da expressão gênica de mRNA da interleucina IL-10 em amostras de baço de gatos do grupo 1 (gatos sintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*) por RT-PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014).

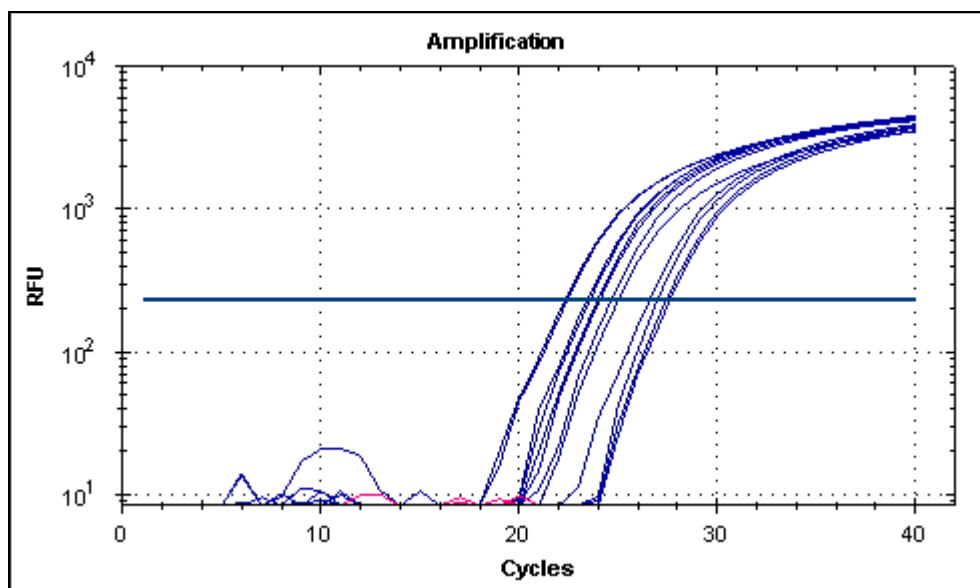


Figura 20 - Gráfico da expressão gênica de mRNA da interleucina IL-10 em amostras de baço de gatos do grupo 2 (gatos assintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*) por RT-PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014).

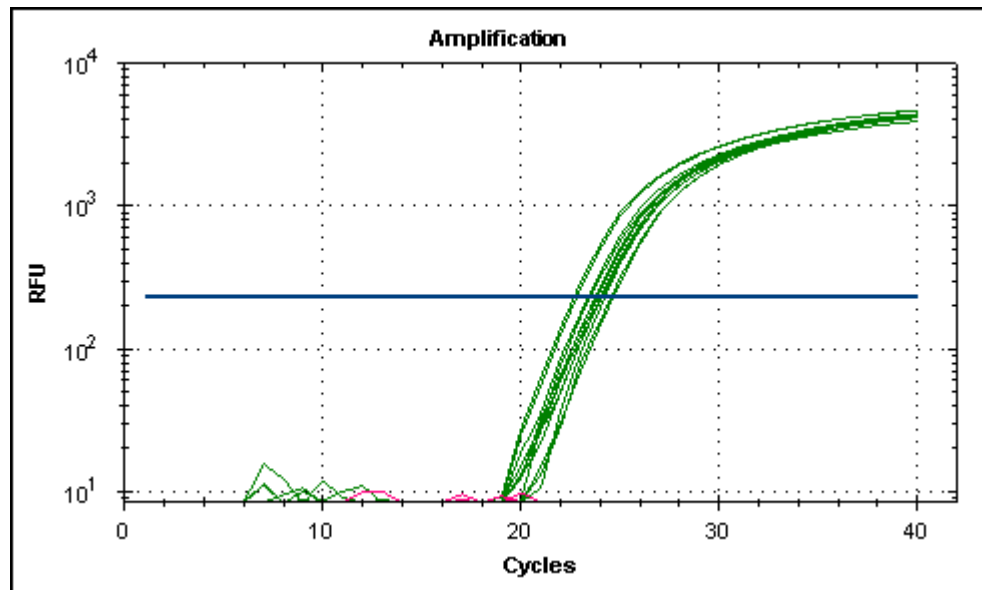


Figura 21 - Gráfico da expressão gênica de mRNA da interleucina IL-10 em amostras de baço de gatos do grupo 3 (grupo controle) por RT-PCR em tempo real. Rosa: controle negativo (Araçatuba, 2014).

Nos gatos do grupo 1, a IL-10 teve sua expressão diminuída em 2,40 vezes em relação ao grupo controle. Essa expressão foi maior no grupo 2, observando uma diminuição de 2,15 vezes em relação ao grupo controle (Tabela 5), porém sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,4823$).

Tabela 4 – Resultados dos valores de Ct médio da expressão gênica do gene de referência beta-actina e das citocinas: IL-12p40, IFN- γ , IL-4 e IL-10 por RT-PCR em tempo real de 18 gatos, subdivididos em três grupos. Grupo 1: composto por seis felinos sintomáticos infectados por *L. infantum chagasi*; grupo 2: constituído por seis felinos assintomáticos infectados por *L. infantum chagasi* e; grupo 3: constituído por 6 felinos hígidos, não infectados (grupo controle). (Araçatuba, 2014)

| GRUPO | ANIMAL | beta-actina | IL-12p40 | IFN- γ | IL-4 | IL-10 |
|-------|--------|-------------|----------|---------------|-------|-------|
| G 1 | 1 | 20,38 | 27,01 | 28,45 | 31,28 | 25,43 |
| | 2 | 17,29 | 29,07 | 29,00 | 35,63 | 26,63 |
| | 3 | 14,41 | 22,95 | 26,06 | 39,25 | 29,65 |
| | 4 | 17,50 | 26,47 | 27,14 | 33,29 | 25,01 |
| | 5 | 15,78 | 26,28 | 28,27 | 32,83 | 24,73 |
| | 6 | 15,43 | 24,87 | 26,55 | 31,54 | 23,11 |
| G 2 | 7 | 20,62 | 29,62 | 30,96 | 34,72 | 27,45 |
| | 8 | 18,43 | 30,44 | 30,64 | 37,93 | 26,74 |
| | 9 | 15,10 | 26,85 | 30,34 | 33,37 | 23,43 |
| | 10 | 18,20 | 24,65 | 28,11 | 31,95 | 24,01 |
| | 11 | 15,40 | 26,41 | 30,42 | 32,30 | 24,81 |
| | 12 | 13,79 | 23,21 | 27,36 | 30,07 | 22,32 |
| G 3 | 13 | 22,67 | 24,76 | 31,68 | 31,32 | 23,38 |
| | 14 | 31,08 | 24,08 | 37,62 | 32,03 | 23,71 |
| | 15 | 19,17 | 25,12 | 30,41 | 33,26 | 22,68 |
| | 16 | 22,47 | 23,35 | 31,11 | 31,99 | 24,53 |
| | 17 | 24,71 | 24,77 | 31,84 | 31,72 | 24,10 |
| | 18 | 17,35 | 24,42 | 28,05 | 31,17 | 23,95 |

Tabela 5 – Diminuição da expressão das interleucinas (IL-12p40, IFN- γ , IL-4 e IL-10) de dois grupos de gatos infectados por *L. infantum chagasi* (G 1 – sintomáticos; G 2 – assintomáticos) em relação ao grupo controle, por RT-PCR em tempo real (valores de log na base 10 derivados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Araçatuba, 2014)

| GRUPO | IL-12p40 | IFN- γ | IL-4 | IL-10 |
|-------|----------|---------------|------|-------|
| G 1 | 2,30 | 0,57 | 2,52 | 2,40 |
| G 2 | 2,52 | 1,15 | 2,22 | 2,15 |

Para avaliar a interação entre diferentes citocinas, valores de log na base 10 derivados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foram submetidos à análise de correlação pelo teste de Pearson. Dentre as interleucinas do grupo 1, a IL-4 apresentou forte correlação positiva com a IL-10 ($p = 0,0003$; $r = 0,9865$) e, dentre os gatos do grupo 2, três análises apresentaram forte correlação positiva: o IFN- γ com a IL-10 ($p = 0,0176$; $r = 0,8896$), a IL-12 com a IL-4 ($p = 0,010$, $r = 0,9171$) e a IL-12 com a IL-10 ($p = 0,0469$, $r = 0,8175$). Não foi observada correlação nas outras possíveis combinações.

6. DISCUSSÃO

O objetivo específico da realização desta pesquisa baseou-se na dificuldade encontrada para o estabelecimento do diagnóstico da infecção por *L. infantum chagasi* em gatos. Em um estudo prévio, Vides et al. (2011) demonstraram uma elevada prevalência desta infecção em gatos com dermatopatias no município de Araçatuba, por meio da combinação de vários métodos de diagnóstico. Dos 55 animais avaliados, a presença de *L. infantum chagasi* foi identificada em 27 gatos, dos quais 25 apresentavam outras comorbidades, tais como lesões neoplásicas, parasitárias e fúngicas na pele. Desta forma, fica claro que o diagnóstico de uma dermatopatia em um felino que vive em área endêmica para leishmaniose visceral não exclui a necessidade de uma investigação minuciosa para a pesquisa do parasita. A importância no destaque dessa informação deve-se ao fato de que alguns autores associam as lesões cutâneas como a melhor caracterização clínica da leishmaniose visceral nesta espécie animal (PENNISI et al., 2004; SAVANI et al., 2004; SHERRY et al., 2011). Provavelmente, este é o primeiro de muitos desafios, visto que dificilmente é investigada a presença do parasita em felinos com outros sinais clínicos ou hígidos.

Os animais sintomáticos do presente estudo apresentavam lesões cutâneas, perda de peso, linfadenomegalia, esplenomegalia, além de secreção ocular e úlceras em cavidade oral. Entretanto não foi possível descartar a associação com outros agentes infecciosos, exceto os vírus da imunodeficiência felina e da leucemia felina. Acredita-se que esses sinais clínicos também possam estar associados às condições de manejo inadequadas, e não exclusivamente à patogenia do parasito. Os animais eram semi-domiciliados, isto é, possuíam livre acesso à rua, o que lhes permitia contato com outros felinos errantes ou semi-domiciliados. Estudos prévios também identificaram alterações sistêmicas na leishmaniose felina, tais como a perda de peso, apatia, hipertermia, lesões oculares, respiratórias e digestórias,

porém em nenhum deles foi descartada a possibilidade de coinfeções (CHATZIS et al., 2014; PENNISI et al., 2004; SERRANO et al., 2008; SHERRY et al., 2011). Assim, ainda não está claro quais são os sinais clínicos decorrentes da infecção por *L. infantum chagasi* em felinos, sugerindo que em áreas endêmicas para a doença, a investigação deva ser realizada sempre que possível.

No presente estudo, dos 12 gatos com leishmaniose visceral, apenas quatro (33,3%) foram sororeagentes pelos métodos de ELISA indireto e/ou RIFI, corroborando os achados de Sobrinho et al. (2012) que, avaliando 30 gatos parasitologicamente positivos do mesmo município, identificaram a mesma porcentagem de positividade na combinação dos métodos sorológicos. Costa et al. (2010), identificaram porcentagem menor na avaliação de gatos da mesma região, detectando soroconversão em dois animais (25%) de oito parasitologicamente positivos. Entretanto, a porcentagem de animais sororeagentes foi menor do que as observadas por Maia et al. (2008), Martín-Sánchez et al. (2007) e Sherry et al. (2011), de 42,86%, 38,94% e 66,67% respectivamente, quando comparados com as técnicas moleculares como teste padrão.

A discrepância entre os resultados do presente ensaio e aqueles referidos por autores de pesquisas similares pode ser devida a diferenças nas técnicas empregadas e na interpretação dos resultados. No método de ELISA indireto notam-se diferenças nas concentrações dos reagentes empregados e, na interpretação dos resultados da RIFI observam-se variações quanto ao ponto de corte da reação. No presente estudo consideramos o ponto de corte de 1:40 à semelhança do que se utiliza para cães (COSTA et al., 2010; SOLANO-GALLEGO et al., 2007; VITA et al., 2005). No entanto, é necessário um maior conhecimento da resposta imune desenvolvida por felinos frente à infecção, para que se estabeleça com segurança o real ponto de corte da RIFI.

O exame parasitológico direto de linfonodo e de medula óssea é um método tradicional e, supostamente, mais simples dentre os empregados no diagnóstico da leishmaniose visceral. A alta porcentagem de animais infectados

confirmada pelo exame parasitológico direto no presente estudo (58,3%) é explicada pela escolha dos animais, realizadas a partir da triagem com exames direto na busca do parasita. Estudos prévios identificam uma baixa prevalência da infecção por este método de diagnóstico, a qual varia de zero a 18% (BRESCIANI et al., 2010, CHATZIS et al., 2014; COELHO et al., 2011; HATAM et al., 2009; VIDES et al., 2011). A identificação do parasita foi identificada, na sua maioria, na medula óssea dos gatos infectados, corroboram os achados de Vides et al. (2011) que observaram maior porcentagem de gatos infectados neste tecido. Cabe destacar que a sensibilidade desta técnica é baixa, apesar de ser 100% específica (CHATZIS et al., 2014).

No presente estudo cinco (41,7%) gatos tiveram a infecção por *Leishmania* spp. confirmada apenas pela técnica de PCR, corroborando estudos anteriores que demonstraram a importância da PCR como método de identificação de gatos infectados por *Leishmania* spp. (CHATZIS et al., 2014; MAIA et al., 2008; MOHAMMADIHA et al., 2013). Por essa razão optou-se por utilizar a PCR como teste ouro no diagnóstico. A escolha da medula óssea como tecido foi fundamentada por melhores resultados observados no diagnóstico da espécie canina com este material biológico. Ainda, Chatzis et al. (2014) descrevem melhores resultados na amplificação de DNA do parasita em amostras de medula óssea e de biopsia de pele de gatos quando comparadas a amostras de sangue; reforçando a importância do tecido em interesse.

Uma dificuldade encontrada quando da avaliação da expressão das citocinas no tecido esplênico dos gatos do presente estudo foi a escassa literatura no que diz respeito à descrição da sequência dos primers de interleucinas nesta espécie animal. Foram testadas algumas sequências previamente descritas (LEUTENEGGER et al., 1999) que, apesar de terem sido compatíveis quando inseridas no programa Nucleotide BLAST[®] (Basic Local Alignment Search Tool), não amplificaram mRNA no baço dos gatos avaliados. Segundo Dean et al. (1998), isto pode ser devido a diferenças entre os tecidos avaliados. Desta forma, foi necessário testar outras sequências de primers até se obter a amplificação das citocinas. A escolha por utilizar baço foi justificada

por tratar-se de um órgão de grande importância na resposta imunológica frente a esta infecção em outras espécies (LAGE et al., 2007; NYLÉN et al., 2007). A concentração adequada, em ng, de RNA a ser convertida em cDNA foi outro obstáculo encontrado, uma vez que na literatura pertinente não há referência sobre a concentração base para o estudo (LEVY et al., 1998; LEUTENEGGER et al., 1999). A técnica de RT-PCR com o sistema Taqman® para análise da expressão de interleucinas foi escolhida por ter como sua principal característica alta especificidade e sensibilidade como descrita por Dean et al. (1998).

Até onde é de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avaliou a expressão de citocinas em felinos com leishmaniose visceral. A expressão do gene do IFN- γ estava reduzida em todos os animais naturalmente infectados por *L. infantum chagasi*, independente da presença ou não de sintomas, quando comparados ao grupo controle. A redução foi mais significativa nos animais assintomáticos (grupo 2), porém não houve diferença estatisticamente significativa quanto a esta expressão na comparação entre os dois grupos, o que diverge dos achados de Chamizo et al. (2005) e de Alves et al. (2009), que ao avaliarem cães com LV, relacionaram a presença de altos níveis de IFN- γ em animais assintomáticos, demonstrando assim o efeito protetor desta interleucina na doença. A redução da expressão gênica de IFN- γ pode ser relacionada com a resposta imune em gatos frente à infecção, visto que Corrêia et al. (2007) e Panaro et al. (2009) avaliando cães com LV, e Hailu et al. (2005) em estudos com humanos, associaram a presença desta citocina com a progressão da doença e ao pior prognóstico do paciente. Entretanto, os resultados de Lage et al. (2007), identificaram que no início da infecção em cães por *L. infantum* não há resposta mediada por IFN- γ , e que esta ocorre meses após a instalação do parasita no organismo. Pelo presente estudo tratar-se de gatos naturalmente infectados, não há como determinar o tempo de infecção do animal.

Nos animais assintomáticos (grupo 2), foi observada uma forte correlação entre a expressão de IFN- γ e de IL-10. A produção de IFN- γ é

associada com a resposta Th1, enquanto a IL-10 tem sua produção mediada por linfócitos Th2 e Treg. Ainda, o IFN- γ é um fator de inibição na diferenciação das células Th2 e Th17, enquanto a IL-10 é inibitória para o desenvolvimento das células Th1. Desta forma, a redução associada dessas duas interleucinas sugere que em gatos infectados pode haver uma supressão ou não ativação na diferenciação dos linfócitos Th1 e Th2. Vale destacar que a supressão das respostas Th1, Th2 e Treg deve ser evidenciada pela análise das citocinas envolvidas em suas diferenciações, tais como a IL-12, a IL-4 e o TGF- β .

A expressão da interleucina IL-12 esteve reduzida em ambos os grupos e não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão gênica dos animais dos grupos 1 e 2. A baixa expressão encontrada nos gatos sintomáticos corrobora com os achados de Roberts (2006), que também identificou nível reduzido de IL-12 no sangue de cães sintomáticos infectados por *L. infantum*. Entretanto, diferem das conclusões de Barbosa et al. (2011), que observaram níveis semelhantes de IL-12 na medula óssea de cães sintomáticos, assintomáticos e do grupo controle. A presença de IL-12 pode estar relacionada ao período de infecção. Assim, Barbiéri (2006), observou a expressão desta interleucina apenas por um curto período em cães infectados, enquanto Manna et al. (2006), não identificaram expressão de IL-12 após seis meses de infecção em cães assintomáticos, todavia nos cães sintomáticos havia uma expressão significativa. Ainda, Lage et al. (2007) avaliando cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, sem o conhecimento do tempo da infecção, detectaram expressões de IL-12 em apenas alguns dos cães infectados. A IL-12 está intimamente relacionada com a via de resposta mediada por células Th1, que conferem imunidade celular. Desta forma, era de se esperar que animais sintomáticos naturalmente infectados apresentassem uma menor resposta do tipo Th1, no entanto, os assintomáticos deveriam expressar uma maior imunidade celular, como verificado em cães por Pinelli et al. (1994).

A falta de diferença na expressão do gene para IL-4 nos grupos corrobora os achados de Manna et al. (2006) e de Michelin et al. (2011), os

quais não evidenciaram distinção na sua expressão em cães sintomáticos e assintomáticos. A redução na expressão gênica desta interleucina também foi identificada no estudo de Quinnell et al. (2001), que observaram baixos níveis da expressão de IL-4 na medula óssea de cães infectados. Assim, a ausência de relação na expressão de IL-4 em animais sintomáticos e assintomáticos é sugerida por Strauss-Ayali et al. (2007) como uma evidência da falta de relevância de seu papel no progresso da doença, ainda que os autores a considerem como um fator importante no estabelecimento da infecção. Cabe destacar seu importante papel na diferenciação dos linfócitos em Th2, sendo a sua redução associada ao déficit na produção de anticorpos. O baço foi reportado por Mukherjee et al. (2003) como o tecido de maior expressão dessa interleucina em ratos infectados experimentalmente por *L. donovani*, entretanto, Michelin et al. (2011) observaram uma maior expressão no fígado de cães infectados naturalmente por *L. infantum*, fato este que pode ter contribuído para a baixa detecção da interleucina no presente estudo.

Nos animais sintomáticos (grupo 1) foi constatada uma correlação de grande intensidade na expressão de IL-4 e de IL-10, evidenciando a redução na resposta de linfócitos Th2, a qual está relacionada com a imunidade humoral. A interferência nesta via de resposta imune resulta numa menor produção de anticorpos, fato que foi evidenciado no presente grupo, visto que apenas dois dos seis animais infectados foram sororeagentes. A correlação na redução das duas interleucinas foi observada também por Quinnell et al. (2001) na medula óssea de cães naturalmente infectados. No entanto, Panaro et al. (2009), ao avaliarem cães naturalmente infectados por *L. infantum*, observaram uma maior expressão de IL-4 após quatro meses do diagnóstico e de IL-10 após oito meses do diagnóstico nos animais sintomáticos, evidenciando diferenças na expressão ao longo do tempo.

A forte correlação entre a redução de IL-12 e IL-4 observada nos gatos assintomáticos (grupo 2) sugere uma supressão na ativação tanto da resposta por linfócitos Th1 como Th2, visto que estas são as principais interleucinas ligadas à diferenciação desses linfócitos. Estas observações reforçam a nossa

hipótese de que em felinos não ocorra a ativação da resposta celular imune adquirida.

A IL-10 estava reduzida nos dois grupos, corroborando os achados de Panaro et al. (2009), ao identificarem baixos níveis de IL-10 em cães sintomáticos e assintomáticos após quatro meses do diagnóstico. De acordo com Lage et al. (2007) e Michelin et al. (2011), o aumento da expressão de IL-10 está diretamente relacionado ao grau de parasitismo encontrado. No presente estudo não foi avaliada a carga parasitária dos animais, fato que poderia enaltecer essa análise. Ainda, a quantificação desta citocina foi referida por Corrêa et al. (2007), como mais significativa no fígado de cães infectados sintomáticos e assintomáticos, quando comparado com o baço.

Nos animais assintomáticos foi identificada uma correlação entre a expressão reduzida de IL-12 e IL-10, sugerindo uma pequena resposta imune celular e humoral, o que contradiz o padrão imunológico estabelecido para a leishmaniose visceral em outras espécies. Embora a IL-12 esteja associada a uma resposta de linfócitos Th1 (celular), a IL-10 parece desempenhar diferentes papéis. Ainda que Nylén et al. (2007) tenham descrito uma possível produção de IL-10 por células Th1, sua secreção está sabidamente ligada às células Th2 e Treg, exercendo função na produção de anticorpos e/ou na regulação da resposta imune. Sendo assim, por intermédio da avaliação dessas interleucinas, conclui-se novamente a baixa participação dessas três linhagens celulares nos felinos com LV. A correlação entre a redução das duas citocinas pode sugerir a participação de outras interleucinas frente à infecção por diferentes vias.

Quatro animais foram sororeagentes, porém não foi possível a identificação de uma resposta humoral por intermédio da análise destas citocinas, o que pode sugerir a participação de outras interleucinas na ativação dos linfócitos B. Ainda, cabe ressaltar que o desconhecimento do tempo de infecção dos animais culmina na dificuldade do estabelecimento da resposta imune, uma vez que autores relatam a presença de interleucinas em tempos determinados após a infecção.

Embora seja inédita, a análise da expressão das quatro interleucinas não permite a caracterização da resposta imunológica desenvolvida e, reforça a necessidade de estudos a fim de se avaliar a participação de outras citocinas. Os resultados do presente estudo revelam que em gatos infectados por *Leishmania infantum chagasi* não há o predomínio da resposta imunológica mediada por linfócitos Th1 nos gatos assintomáticos e de Th2 nos gatos sintomáticos. O não envolvimento de uma das duas vias de resposta enfatiza a complexidade envolvida na resposta imune contra o parasita nesta espécie animal. A participação da resposta imune inata deve ser avaliada em felinos com leishmaniose visceral, uma vez que a não participação da resposta celular imune adquirida, por intermédio destas citocinas, foi constatada. Assim, sugere-se que a imunidade inata possa atuar de forma decisiva no controle da doença, sem que haja a necessidade em requisitar a resposta mediada por linfócitos auxiliares, o que poderia caracterizar o felino como uma espécie resistente à infecção.

7. CONCLUSÃO

Nas condições do presente estudo, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a expressão gênica das interleucinas IL-12, IL-4, IL-10 e de IFN- γ nos gatos infectados por *Leishmania infantum chagasi* (sintomáticos e assintomáticos) e gatos hípidos, não infectados. Esses resultados evidenciam a pequena, ou ausente, participação dos linfócitos Th1 e Th2 na resposta frente à leishmaniose felina.

REFERÊNCIAS

ALVES, C.F.; DE AMORIM, F.G.; MOURA, E.P.; RIBEIRO, R.R.; ALVES, C.F.; MICHALICK, M.S.; KALAPOTHAKIS, E.; BRUNA-ROMERO, O.; TAFURI, W.L.; TEIXEIRA, M.M.; MELO, M.N. Expression of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.128, p.349-368, 2009.

AMSEN, D.; SPILIANAKIS, C.G.; FLAVELL, R.A. How are Th1 and Th2 effector cells made? **Current Opinion in Immunology**, v.21, p.153-160, 2009.

ANDRADE, H.M.; REIS, A.B.; DOS SANTOS, S.L.; VOLPINI, A.C.; MARQUES, M.J.; ROMANHA, A.J. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v.140, p.213-238, 2006.

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

BANETH, G. (Ed.). Leishmaniasis. In GREENE: Infectious diseases. Canadá: Elsevier, 2006, p. 685-698.

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

BARBOSA, M.A.G.; ALEXANDRE-PIRES, G.; SOARES-CLEMENTE, M.; MARQUES, C.; ROOS RODRIGUES, O.; DE BRITO, T.V.; DA FONSECA, I.P.; ALVES, L.C.; SANTOS-GOMES, G.M. Cytokine gene expression in the tissues

of dogs infected by *Leishmania infantum*. **Journal of Comparative Pathology**, v.145, p.336-344, 2011.

BETTELLI, E.; KORN, T.; KUCHROO, V.K. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. **Current Opinion in Immunology**, v.19, p.652-657, 2007.

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

CARDIA, D.F.F.; CAMOSSO, L.G.; NETO, L.S.N.; LANGONI, H.; BRESCIANI, K.D.S. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. infection in cats from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.197, p.634-637, 2013.

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

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

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

CHATZIS, M.K.; ANDREADOU, M.; LEONTIDES, L.; KASABALIS, D.; MYLONAKIS, M.; KOUTINAS, A.F.; RALLIS, T.; IKONOMOPOULOS, J.; SARIDOMICHELAKIS, M.; Cytological and molecular detection of *Leishmania*

infantum in different tissues of clinically normal and sick cats. **Veterinary Parasitology**, v.202, p.217-225, 2014.

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

CORRÊIA, A.P.F.L.; DOSSI, A.C.S.; VASCONCELOS, R.O.; MUNARI, D.P.; DE LIMA, C.M.F. Evaluation of transformation growth factor β 1, interleukin-10, and interferon- γ in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v.143, p.267-274, 2007.

COSTA, T.A.C. **Utilização da técnica de ELISA com proteína A e anti-IgG para o diagnóstico sorológico da leishmaniose felina**, 2008. 57f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba e Curso de Medicina Veterinária – Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2008.

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

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

DARDALHON, V.; KORN, T.; KUCHROO, V.K.; ANDERSON, A.C. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, v.31, p.252-256, 2008.

DEAN, G.A.; HIGGINS, J.; LAVOY, A.; FAN, Z.; PEDERSEN, N.C. Measurement of feline cytokine gene expression by quantitative-competitive R_T-PCR. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.63, p.73-82, 1998.

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

FIGUEIREDO, F.B.; BONNA, I.C.F.; NASCIMENTO, L.D.; COSTA, T.; BAPTISTA, C.; PACHECO, T.M.V.; AMENDOEIRA, M.R.R.; MADEIRA, M.F. Avaliação Sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, p.141-145, 2009.

FOWELL, D.J.; BIX, M.; SHINKAI, K.; LACY, D.; LOCKSLEY, R.M. Disease susceptibility and development of the cytokine repertoire in the murine *Leishmania major* model. **European Cytokine Network**, v.9, p.102-106, 1998.

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

GORIELY, S.; CAVOY, R.; GOLDMAN, M. Interleukin-12 family members and type interferons in Th17-mediated inflammatory disorders. **Allergy**, v.64, p.702-709, 2009.

GUMY, A.; LOUIS, J.A.; LAUNOIS, P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. **International Journal Parasitology**, v.34, p.433-444, 2004.

GUO, L.; HU-LI, J.; PAUL, W.E. Probabilistic regulation of IL-4 production. **Journal of Clinical Immunology**, v.25, p.573-581, 2005.

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

HATAM, G.R.; ADNANI, S.J.; ASGARI, Q.; FALLAH, E.; MOTAZEDIAN, M.H.; SADJJADI, S.M.; SARKARI, B. First report of natural infection in cats with *Leishmania infantum* in Iran. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.0, p.1-4, 2009.

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

KUSHAWAHA, P.K.; GUPTA, R.; SUNDAR, S.; SAHASRABUDDHE, A.A.; DUBE, A. Elongation Factor-2, a Th1 stimulatory protein of *Leishmania donovani*, generates strong IFN- γ and IL-12 response in cured *Leishmania*-infected patients/hamsters and protects hamsters against *Leishmania* challenge. **The Journal of Immunology**, v.187, p.6417-6427, 2011.

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

LEIVA, M.; LIORET, A.; PEÑA, T.; ROURA, X. Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in a cat. **Veterinary Ophthalmology**, v.8, p.71-75, 2005.

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

LEVY, J.K.; RITCHNEY, J.W.; ROTTMAN, J.B.; DAVIDSON, M.G.; LIANG, Y-H.; JORDAN, H.L.; TOMPKINS, W.A.; TOMPKINS, M.B. Elevated interleukin-10-to-interleukin-12 ratio in feline immunodeficiency virus-infected cats predicts loss of type 1 immunity to *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Infectious Diseases**, v.178, p.503-511, 1998.

MACHADO, J.G.; HOFFMANN, J.L.; LANGONI, H. Imunopatologia da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, n.12, p.50-58, 2007.

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

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

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

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

MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; LOPEZ-LOPEZ, M.C.; ACEDO-SANCHEZ, C.; CASTRO-FAJARDO, J.J.; PINEDA, J.A.; MORILLAS-MARQUEZ, F. Diagnosis of infections with *Leishmania infantum* using PCR-ELISA. **Veterinary Parasitology**, v.122, p.607-615, 2001.

MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; ACEDO, C.; MUÑOZ-PÉREZ, M.; PESSON, B.; MARCHAL, O.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. **Veterinary Parasitology**, v.145, p.267-273, 2007.

MARTÍNEZ-MORENO, A.; 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.

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

MOHAMMADIHA, A.; HAGHIGHI, A.; MOHEBALI, M.; MAHDIAN, R.; ABADI, A.R.; ZAREI, Z.; YEGANEH, F.; KAZEMI, B.; TAGHIPOUR, N.; AKHOUNDI, B.; BARATI, M.; MAHMOUDI, M.R. Canine visceral leishmaniasis: A comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct agglutination on sera for

the detection of *Leishmania infantum* infection. **Veterinary Parasitology**, v.192, p.83-90, 2013.

MUKHERJEE, P.; GHOSH, A.K.; GHOSE, A.C. Infection pattern and immune response in the spleen and liver of BALB/c mice intracardially infected with *Leishmania donovani* amastigotes. **Immunology Letters**, v.86, p.131-138, 2003.

MURPHY, M.L. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. **European Journal of Immunology**, v.31, p.2848-2856, 2001.

MURRAY, H.W. Determinants of response to interleukin-10 receptor blockade immunotherapy in experimental visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.188, p.458-464, 2003.

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

NYLÉN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **TRENDS in Immunology**, v.28, p.378-384, 2007.

OZON, C.; MARTY, P.; PRATLONG, F.; BRETON, C.; BLEIN, M.; LELIÈVRE, A.; HAAS, P. Disseminated feline leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in Southern France. **Veterinary Parasitology**, v.75, p.273-277, 1998.

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

PARK, H.; LI, Z.; YANG, X.O.; CHANG, S.H.; NURIEVA, R.; WANG, Y-H.; WANG, Y.; HOOD, L.; ZHU, Z.; TIAN, Q.; DONG, C. A distinct lineage of CD4T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature Immunology**, v.6, p.1133-1141, 2005.

PAUL, W.E. What determines Th2 differentiation, *in vitro* and *in vivo*? **Immunology and Cell Biology**, v.88, p.236-239, 2010.

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

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

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

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

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

REINER, S.L.; LOCKSLEY, R.M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Review Immunology**, v.13, p.151-177, 1995.

RESENDE, M.; MOREIRA, D.; AUGUSTO, J.; CUNHA, J.; NEVES, B.; CRUZ, M.T.; ESTAQUIER, J.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; SILVESTRE, R. *Leishmania*-infected MHC class II^{high} dendritic cells polarize CD4⁺ T cells toward a nonprotective T-bet⁺ IFN- γ ⁺ IL-10⁺ phenotype. **The Journal of Immunology**, v.191, p.262-273, 2013.

ROBERTS, N.T.M. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **British Medical Bulletin**, v.17, p.115-121, 2006.

RODRÍGUEZ-CÓRTEZ, A.; OJEDA, A.; LÓPEZ-FUERTES, L.; TIMÓN, M.; ALTET, L.; SOLANO-GALLEGO, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; FRANCINO, O.; ALBEROLA, J. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. **International Journal for Parasitology**, v.37, p.683-693, 2007.

ROGERS, K.A.; DEKREY, G.K.; MBOW, M.L.; GILLESPIE, R.D.; BRODSKYN, C.I. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **Microbiology**, v. 209, p.1-7, 2002.

ROMERO, G.A.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America a systematic review. **PloS Neglected Tropical Diseases**, n.4, e584, 2010.

ROSSI, C.N. **Ocorrência de *Leishmania* sp. em gatos do município de Araçatuba**. São Paulo, 2007. 69f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária e Ciências Agrárias, Unesp, Jaboticabal, 2007.

RÜFENACHT, S.; SAGER, H.; MÜLLER, N.; SCHAERER, V.; HEIER, A.; WELLE, M.M.; ROOSJE, P.J. Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. **Veterinary Record**, v.156, p.542-545, 2005.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Natural Review Immunology**, v.2, p.845-858, 2002.

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RUBEIRO, A.A.; PAIVA, H.M.; FREITAS, R.A.; MALACCO, M.A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical Veterinarian Entomology**, v.12, p.315-317, 1998.

SARKARI, B.; HATAM, G.R.; ADNANI, S.J.; ASGARI, Q. Seroprevalence of feline leishmaniasis in areas of Iran where *Leishmania infantum* is endemic. **Annals of Tropical Medicine e Parasitology**, v.103, p.275-277, 2009.

SAVANI, E.S.M.M.; CAMARGO, M.C.G.O.; CARVALHO, M.R.; ZAMPIERI, R.A.; SANTOS, M.G.; D'ÁURIA, S.R.N.; SHAW, J.J.; FLOETER-WINTER, L.M. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.120, p.229-233, 2004.

SCOTT, V.L.; SHACK, L.A.; EELLS, J.B.; RYAN, P.L.; DONALDSON, J.R.; COATS, K.S. Immunomodulator expression in trophoblasts from the feline immunodeficiency virus (FIV)-infected cat. **Virology Journal**, v.8, p.336-346, 2011.

SERRANO, A.C.M.; NUNES, C.M.; SAVANI, E.S.M.; D'AURIA, S.R.N.; BONELLO, F.L.; VASCONCELOS, R.O.; DE LIMA, V.M.F.; BRESCIANI, K.D.S.

Leishmaniose em felinos na zona urbana de Araçatuba, SP – relato de caso. **Clínica Veterinária**, n.76, p.36-40, 2008.

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

SIMÕES-MATTOS, L.; BEVILAQUA, C.M.L.; MATTOS, M.R.F.; POMPEU, M.M.L. Feline Leishmaniasis: uncommon or unknown? **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.99, p.79-87, 2004.

SOBRINHO, L.S.V.; ROSSI, C.N.; VIDES, J.P.; BRAGA, E.T.; GOMES, A.A.D.; DE LIMA, V.M.F.; PERRI, S.H.V.; GENEROSO, D.; LANGONI, H.; LEUTENEGGER, C.; BIONDO, A.W.; LAURENTI, M.D.; MARCONDES, M. Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.187, p.302-306, 2012.

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

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

TRINCHIERI, G. Interleukin-10m production by effector T cells: Th1 cells show self control. **The Journal of Experimental Medicine**, v.38, p.547-564, 2007.

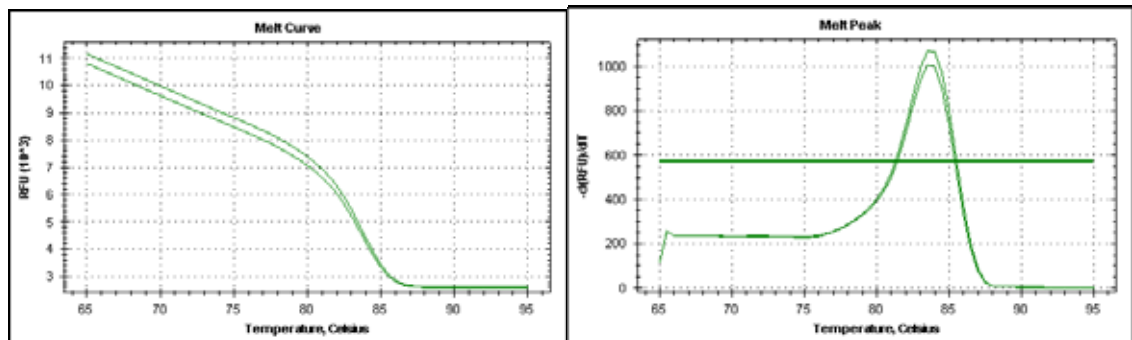
VIDES, J.P.; SCHWARDT, T.F.; SOBRINHO, L.S.V.; MARINHO, M.; LAURENTI, M.D.; BIONDO, A.W.; LEUTENEGGER, C.; MARCONDES, M. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.178, p.22-28, 2011.

VITA, S.; SANTORI, D.; AGUZZI, I.; PETROTTA, E.; LUCIANI, A.; Feline leishmaniasis and ehrlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. **Veterinary Research Communications**, v.29, p.319-321, 2005.

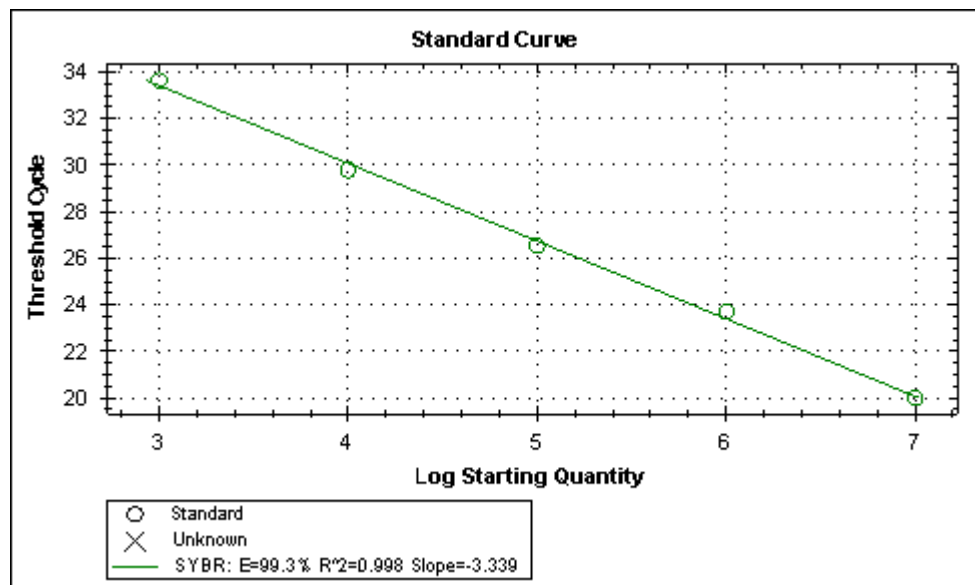
YANNAM, G.R.; GUTTI, T.; POLUEKTOVA, Y. IL-13 in infections, inflammation, autoimmunity and cancer: possible role in HIV-1 and AIDS. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v.7, p.95-112, 2012.

APÊNDICES

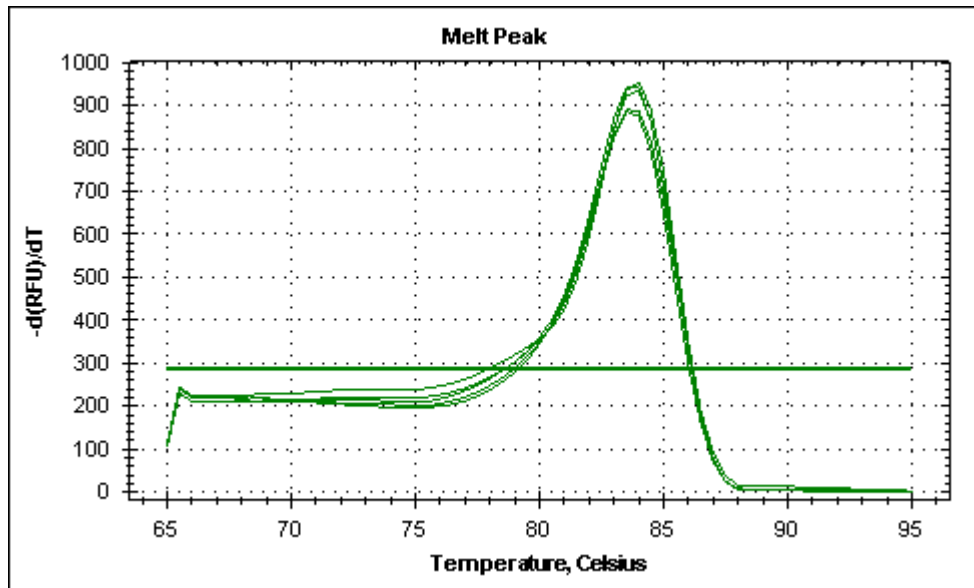
APÊNDICE A. PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DE DNA DE *Leishmania* spp. – TITULAÇÃO DE PRIMERS E CURVA PADRÃO



Apêndice 1A – Gráfico da curva de *melt* (A) e pico de *melt* (B) da titulação dos oligonucleotídeos senso e anti-senso de *Leishmania* spp., ambos nas concentrações de 600 nM. Temperatura de *melt* de 83,5°C (Araçatuba, 2014).

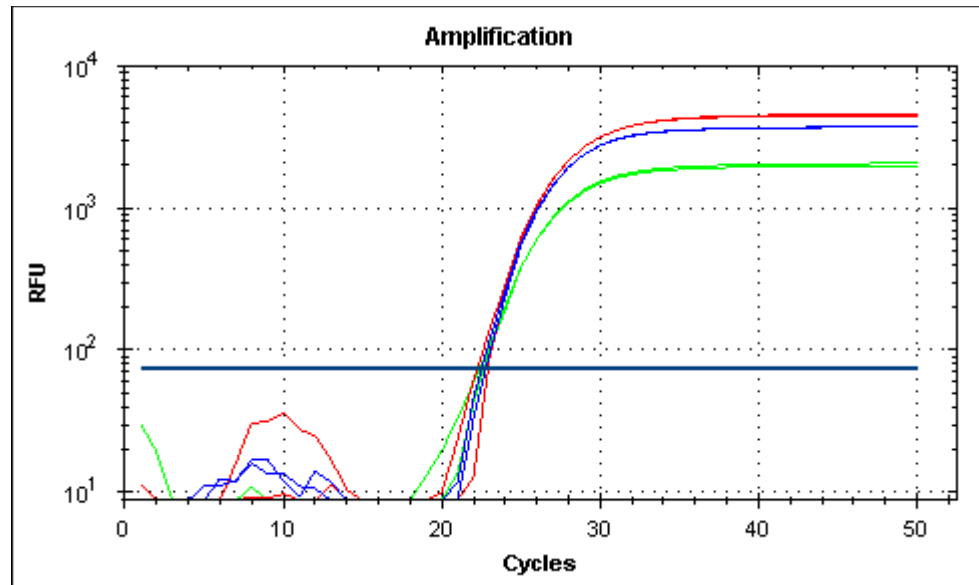


Apêndice 2A – Gráfico de linha da padronização da curva padrão, com cinco pontos em intervalos de diluição seriada (2×10^7 a 2×10^3) da cultura de promastigotas de *Leishmania infantum chagasi*. Eficiência da reação de 99,3%; coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,998 e *slope* de -3,339 (Araçatuba, 2014).

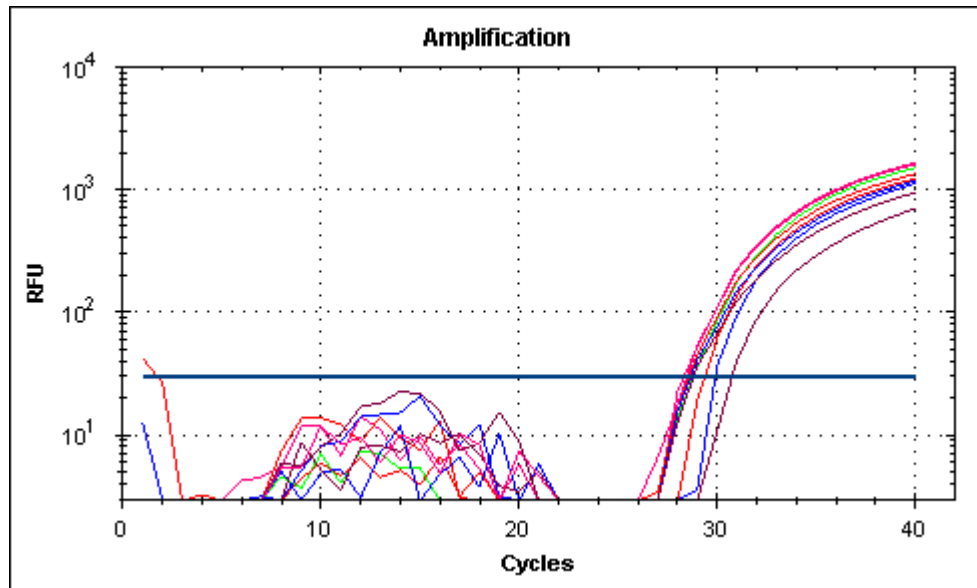


Apêndice 3A - Gráfico representativo dos picos de *melt* únicos, com cinco pontos em intervalos de diluição seriada (2×10^7 a 2×10^3) da cultura de promastigotas de *Leishmania infantum chagasi*, com temperatura de *melt* de 83.5°C (Araçatuba-SP, 2014).

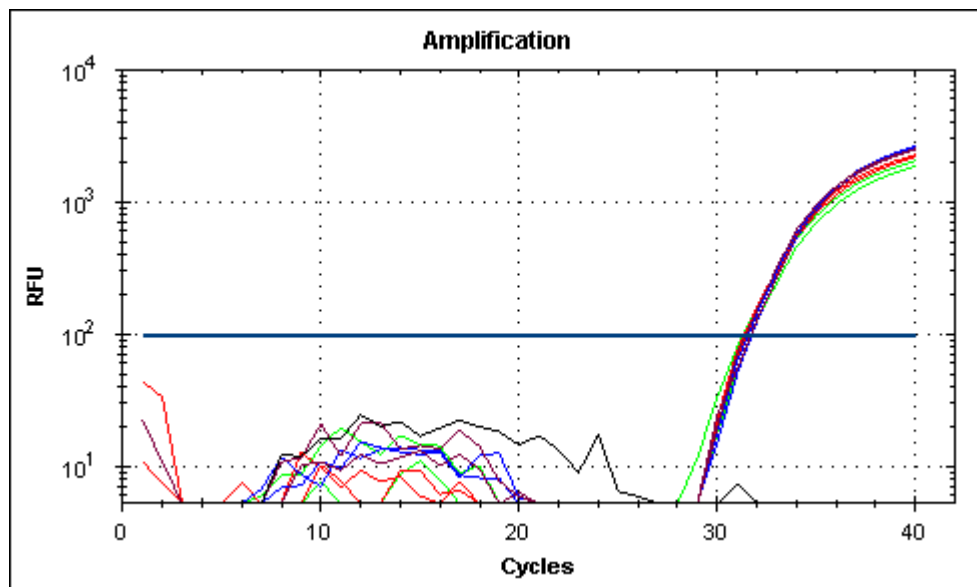
APÊNDICE B. RT-PCR EM TEMPO REAL PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS – TITULAÇÃO DOS PRIMERS



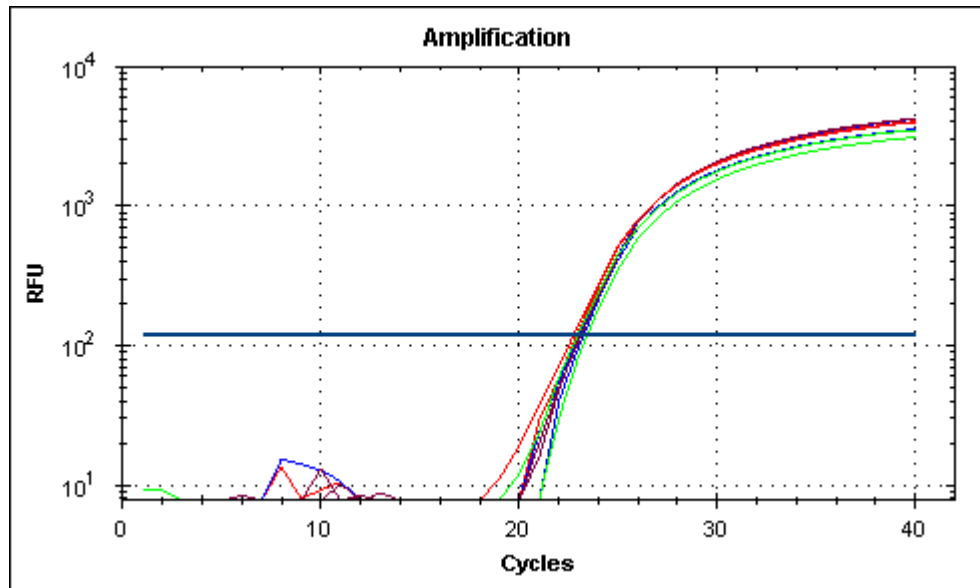
Apêndice 1B – Gráfico da titulação dos oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso do gene de referência beta-actina, com as seguintes concentrações: 240 nM (vermelho), 480 nM (azul) e 960 nM (verde). NTC = preto (Araçatuba, 2014).



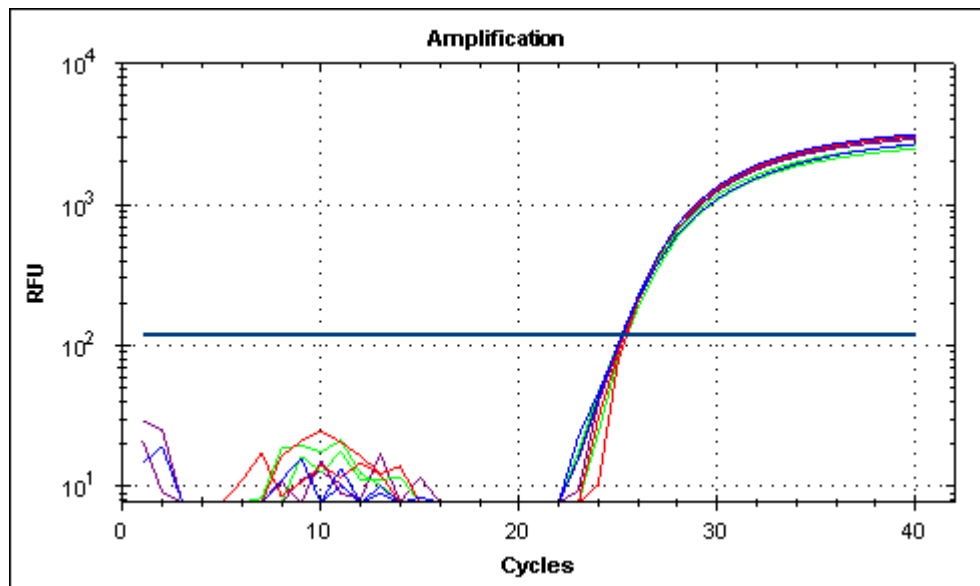
Apêndice 2B – Gráfico da titulação dos oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso de IFN- γ , com as seguintes concentrações: 240 nM (vermelho), 480 nM (azul), 720 nM (roxo) e 960 nM (verde). NTC = preto (Araçatuba, 2014).



Apêndice 3B – Gráfico da titulação dos oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso de IL-4, com as seguintes concentrações: 240 nM (vermelho), 480 nM (azul), 720 nM (roxo) e 960 nM (verde). NTC = preto (Araçatuba, 2014).

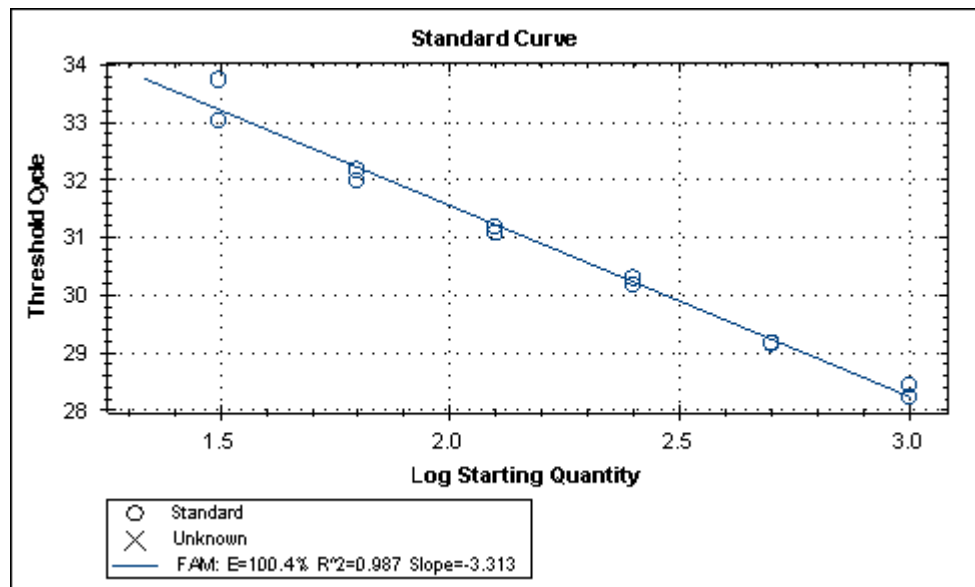


Apêndice 4B – Gráfico da titulação dos oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso de IL-10, com as seguintes concentrações: 240 nM (vermelho), 480 nM (azul), 720 nM (roxo) e 960 nM (verde). NTC = preto (Araçatuba, 2014).

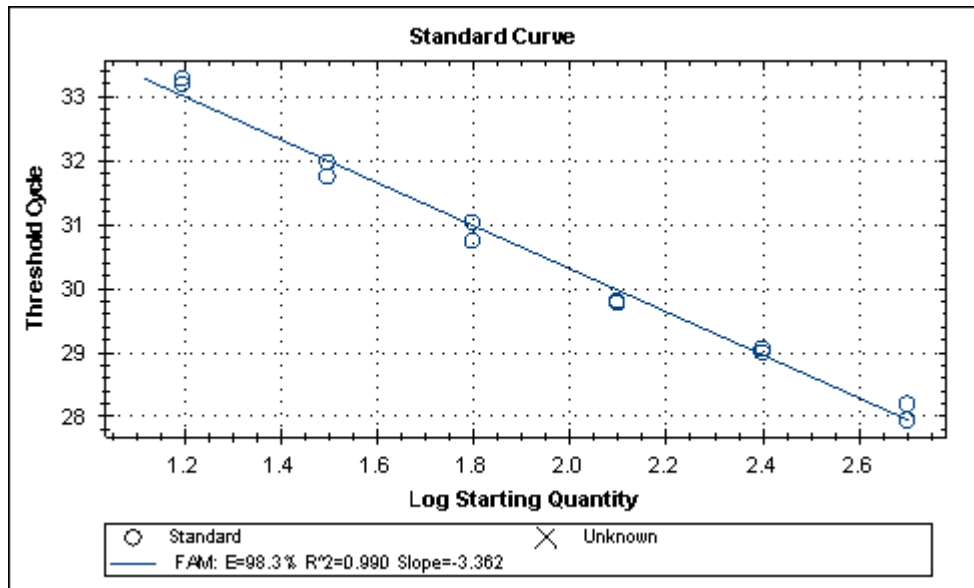


Apêndice 5B – Gráfico da titulação dos oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso de IL-12, com as seguintes concentrações: 240 nM (vermelho), 480 nM (azul), 720 nM (roxo) e 960 nM (verde). NTC = preto (Araçatuba, 2014).

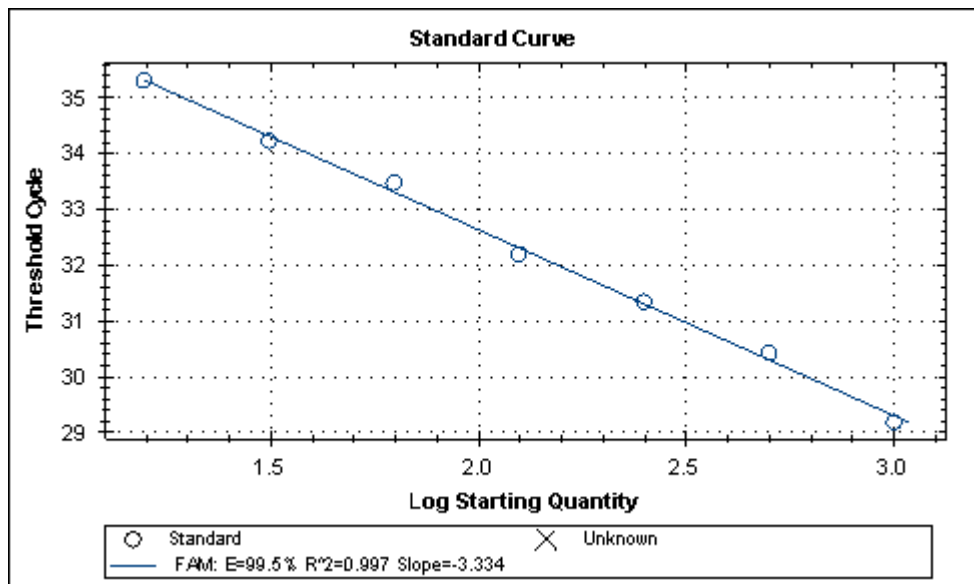
APÊNDICE C. RT-PCR EM TEMPO REAL PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS – CURVA PADRÃO



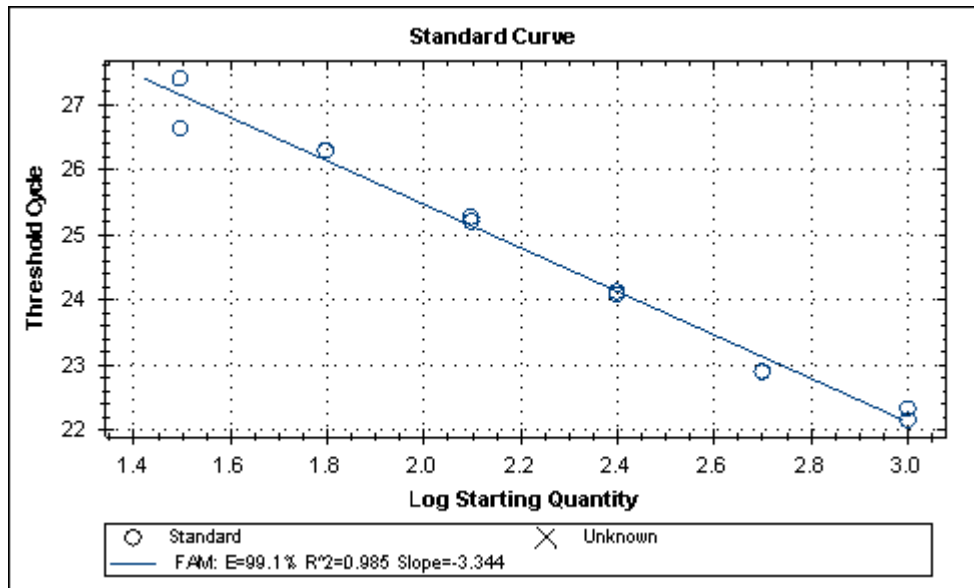
Apêndice 1C – Gráfico de linha da curva padrão do gene de referência beta-actina do *pool* de amostras de baço de felinos, com seis pontos, em duplicata, em intervalos de diluição seriada (500 ng a 15,62 ng). Eficiência da reação de 100,4%, coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,987 e *slope* de - 3,313 (Araçatuba, 2014).



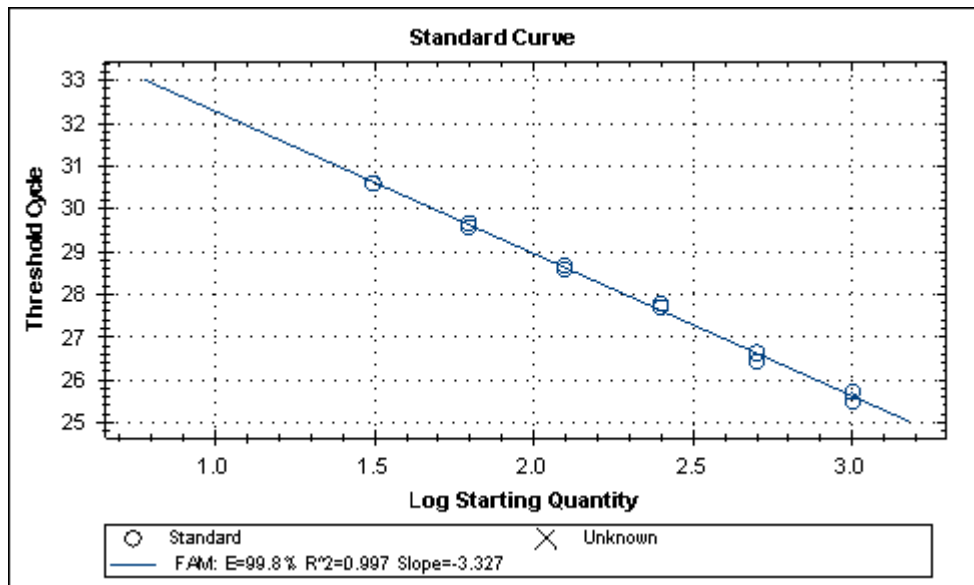
Apêndice 2C – Gráfico de linha da curva padrão de IFN – γ do *pool* de amostras de baço de felinos, com seis pontos, em duplicata, em intervalos de diluição seriada (500 ng a 15,62 ng). Eficiência da reação de 98,3%, coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,990 e *slope* de – 3,362 (Araçatuba, 2014).



Apêndice 3C – Gráfico de linha da curva padrão de IL - 4 do *pool* de amostras de baço de felinos, com sete pontos, em intervalos de diluição seriada (500 ng a 7,81 ng). Eficiência da reação de 99,5%, coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,997 e *slope* de – 3,334 (Araçatuba, 2014).



Apêndice 4C – Gráfico de linha da curva padrão de IL - 10 do *pool* de amostras de baço de felinos, com seis pontos, em duplicata, em intervalos de diluição seriada (500 ng a 15,62 ng). Eficiência da reação de 99,1%, coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,985 e *slope* de - 3,344 (Araçatuba, 2014).



Apêndice 5C – Gráfico de linha da curva padrão de IL - 12 do *pool* de amostras de baço de felinos, com seis pontos, em duplicata, em intervalos de diluição seriada (500 ng a 15,62 ng). Eficiência da reação de 99,8%, coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,997 e *slope* de - 3,327 (Araçatuba, 2014).