

BÁRBARA LAURICE ARAÚJO VERÇOSA

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA, APOPTOSE E FIBROSE RENAL NA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: *Estudo histomorfométrico e molecular***



Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Janeiro-2015

BÁRBARA LAURICE ARAÚJO VERÇOSA

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA, APOPTOSE E FIBROSE RENAL NA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: *Estudo histomorfométrico e molecular***

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Anilton César Vasconcelos (ICB/UFMG)

Co-orientador: Profa. Dr^a. Maria Norma Melo (ICB/UFMG)

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Janeiro-2015

RESUMO

A patogenia da leishmaniose visceral (LV) está associada com a expressão alterada de quimiocinas e a deficiente migração de células inflamatórias. A apoptose se associa com a resolução da inflamação. No entanto, em rins de cães infectados por *L. infantum*, a apoptose parece agir como um marcador de atividade inflamatória, e não como um evento de resolução, se contrapondo com o recrutamento inflamatório. A fibrose é evento frequente na inflamação crônica e na leishmaniose visceral canina está associada à evolução prolongada da doença. Objetivou-se aqui caracterizar e quantificar algumas moléculas relacionadas com a apoptose, inflamação e fibrose; e correlacionar estes achados com a sintomatologia clínica e com as lesões histopatológicas renais provocadas pela *Leishmania infantum* em cães naturalmente infectados. A leishmaniose foi confirmada por *IFA* e *ELISA*, *imprints*, cultura e *PCR*. Fragmentos de rim foram coletados e processados para exame histológico. Dezesseis animais infectados e sete controles foram usados. *RNA*m de citocinas e quimiocinas foram quantificados por *qPCR*. A morfometria das lesões foi realizada em 20 campos histológicos representativos. A inflamação e celularidade do infiltrado inflamatório foi maior em cães sintomáticos, intermediária em assintomáticos e menor em controles. A apoptose nas células glomerulares e tubulares foi maior em sintomáticos que nos controles. Nos infiltrados inflamatórios a apoptose foi maior em sintomáticos, intermediário em assintomáticos e menor nos controles. A fibrose intertubular foi mais intensa em infectados enquanto a fibrose perivascular foi maior nos sintomáticos, intermediária nos assintomáticos, e menor nos controles. As expressões de *MCP2*, *CCL4*, *Bax*, *Bcl2*, *caspase 9*, *Fas*, *IFN- γ* , *TNF- α* , *IL-4*, *IL-10*, *IL-12*, *IL-13* e *TGF- β* foram maiores em sintomáticos que em assintomáticos. Já as expressões de *IL-4*, *Bax/Bcl2* e *CCL4* foram maiores nos sintomáticos que nos assintomáticos. *IL-6*, *IFN- γ /TGF- β* , *IL-12/TGF- β* ,

MCP-1, CCL5, Caspase 3, Caspase 8, Bax e Bcl-2 estavam superexpressas em ambos os grupos infectados. Já a *IL-2* foi menos expressa em ambos os grupos infectados. Além disso, *TNF- α /TGF- β* foi maior em assintomáticos e menor em sintomáticos. Conclui-se que a inflamação renal na leishmaniose visceral não está associada com a infecção tecidual, que a *IL-4* participa na regulação negativa da expressão de quimiocinas associadas com o recrutamento de linfócitos *Th1* para tecidos inflamados e que *IFN- γ , TNF- α , IL -4, IL-12 e IL-10* podem ser utilizados como marcadores de inflamação renal na infecção sintomática. Além disso, a apoptose não é sempre e somente correlacionada com a resolução da inflamação, mas pode ocorrer na fase ativa da inflamação, como evidenciado neste estudo morfológico e molecular concomitante. A fibrose renal atingiu os vasos e o estroma, e a via de fibrogênese foi dirigida por *IL-13*, que é *TGF- β* dependente.

Palavras chaves: Leishmaniose visceral canina, apoptose, inflamação, fibrose, rim

ABSTRACT

Pathogenesis of Visceral Leishmaniasis (VL) is associated with altered chemokine expression and defective migration of immune cells. Apoptosis is usually associated with resolution of inflammation. However, in kidneys of *L. infantum* infected dogs, apoptosis seems to be balancing inflammatory recruitment and acting as a marker of inflammatory activity, not as a resolution event. Fibrosis is an expected event in chronic inflammation and canine visceral leishmaniasis is always associated with a long and chronic evolution. The aim of this work was to quantify some molecules related to apoptosis, inflammation and fibrosis; correlate these findings with the clinical symptoms and the presence of renal histopathological lesions in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. Diagnosis of leishmaniasis was confirmed by *IFA* and *ELISA*, imprints, culture and *PCR*. Fragments of kidney were collected and processed for histological examination. Sixteen dogs with visceral leishmaniasis and seven non-infected controls were used. *mRNA* of some cytokines and chemokines were measured by *qPCR*. Morphometry were evaluated in 20 representative histological fields. Symptomatic dogs showed more intense inflammation and higher cellularity of the inflammatory infiltrates than asymptomatic ones, which were higher than controls. Glomerular and tubular cells showed a higher apoptotic index in symptomatic animals as compared to controls. Apoptosis within the inflammatory infiltrates was highest in symptomatic dogs, intermediary in asymptomatic and smallest in controls. Asymptomatic dogs had only discrete and focal inflammation. More intense intertubular fibrosis occurred in infected dogs. Adventitial fibrosis were more intense in symptomatic dogs than in asymptomatic ones, which had higher measurements than control dogs. *MCP2*, *CCL4*, *Bax*, *Bcl2*, caspase 9, *Fas*, *IFN- γ* , *TNF- α* , *IL-4*, *IL-10*, *IL-12*, *IL-13* e *TGF- β* expressions were upregulated in symptomatic dogs and down

regulated in asymptomatic dogs when compared with non-infected controls. Furthermore, *IL-4*, *Bax**Bcl2* and *CCL4* was more expressed in symptomatic dogs as compared with asymptomatic animals. *IL-6*, *IFN- γ* /*TGF- β* e *IL-12*/*TGF- β* , *MCP-1*, *CCL5*, *caspase 3*, *caspase 8*, *Bax*, and *Bcl-2* expression was upregulated in both groups studied. *IL-2* expression was down regulated in both infected groups. *TNF- α* /*TGF- β* was upregulated in asymptomatic dogs and down regulated in symptomatic dogs. Renal inflammation in VL is not associated with tissue infection. Our studies reveal an additional role for *IL-4* in the negative regulation of chemokine expression associated with *Th1* recruitment to inflamed tissues. *IFN- γ* , *TNF- α* , *IL-4*, *IL-12* and *IL-10* may be used as inflammatory markers for symptomatic infection in kidney. Therefore, in kidneys of *Leishmania* infected dogs, apoptosis may also occur in active inflammation, and seems to be balancing inflammatory recruitment. In conclusion, our results suggested that the renal fibrosis as an eventual consequence of immunopathologic mechanisms, involving injury of the vasculature and of the stroma; and, importantly, our study suggest an *IL-13*-driven pathway of fibrogenesis that is *TGF- β* dependent.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis, apoptosis, inflammation, fibrosis, kidney

LISTA DE ABREVIACES

CCL4	do ingls <i>Chemokine (C-C motif) ligand 4</i>
CCL5	do ingls <i>Chemokine (C-C motif) ligand 4</i>
ELISA	do ingls <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
IFN-γ	do ingls <i>Interferon gamma</i>
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
LV	Leishmaniose visceral
MCP-1	do inglês <i>Monocyte chemotactic protein-1</i>
MCP-2	do inglês <i>Monocyte chemotactic protein-2</i>
PCR	do inglês <i>Polimerase Chain Reaction</i>
TGF-β	do inglês <i>Transforming growth factor beta</i>
TNF-α	do inglês <i>Tumor necrosis factor alpha</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema mostrando as diversas fases do ciclo biológico do parasita de espécies do gênero <i>Leishmania</i> nos hospedeiros vertebrado e invertebrado.....	17
Figura 2: Estimativa do número mínimo representativo de campos para a morfometria da resposta inflamatória e índice apoptótico. Gráfico com coeficiente de variação (y) em função do número mínimo de campos (x).....	36
Figura 3: Captura de tela do computador com programa de análise de imagens <i>Media Cybernetics Image-Pro Plus</i> versão 4.5, utilizado para cálculo da celularidade e do índice apoptótico do infiltrado inflamatório, do glomérulo e das células epiteliais da região cortical e medular	37
Figura 4: Fotomicrografia de lesões histopatológicas renais de cão sintomático naturalmente infectado com <i>Leishmania</i> . A- Espessamento da cápsula de Bowman. B- Cilindros hialinos dentro dos túbulos renais e dilatação tubular. C-Atrofia tubular. D- Degeneração das células epiteliais tubulares. E- Espessamento das membranas mesangiais. PAS. F- Vaso dilatado com infiltrado inflamatório mononuclear. HE.....	45
Figura 5: Fotomicrografia de rim em cão sintomático infectado por <i>Leishmania infantum</i> mostrando células renais com características morfológicas e imunohistoquímica de apoptose em glomérulos (A) e túbulos (C). HE. Aglomerados intranucleares acastanhados confirmados	

em fragmentação in situ do <i>DNA</i> genômico por reação de <i>TUNEL</i> (B e D) e por imunohistoquímica para <i>Bax</i> (E) e <i>Bcl-2</i> (F). Immunoperoxidase	46
Figura 6: Fotomicrografia de fibrose perivascular renal em cães infectados e não infectados por <i>Leishmania infantum</i> . Picrosirius (A, C e E) e reticulina de Gomori (B, D e F)	47
Figura 7: Fotomicrografia da fibrose perivascular renal em cães infectados por <i>Leishmania infantum</i> (sintomáticos e assintomáticos). O colágeno perivascular intercaladas com células na região cortical. Picrosirius. Barra = 25 um (A). Infiltrados inflamatórios difusos e severos, com fibrose intertubular, cilindros hialinos e atrofia/dilatação tubular. PAS. (Observar no detalhe acima e a direita, fibrose intertubular corada em azul pelo Tricrômico de Masson) (B). Fibrose intersticial observada em cães assintomáticos (C e D) e em sintomáticos (E e F). Picrosirius (C e E) e Reticulina de Gomori (D e F)	48
Figura 8: Histomorfometria da fibrose intertubular e perivascular em rins de cães infectados e controles não infectados. Fibrose perivascular em cães controles não infectados (n = 6), assintomáticos (n = 8), e sintomáticos (n = 8). Fibrose intertubular foi superior nos sintomáticos, comparados aos controles. (Teste de Tukey, * p <0,05)	49
Figura 9: Níveis de expressão de <i>mRNA</i> das citocinas inflamatórias em rins de cães infectados com <i>Leishmania</i> , com ou sem sinais clínicos. Cães sintomáticos (n = 8) e assintomáticos (n = 8) (Mann-Whitney, *p <0,05)	50

Figura 10: Níveis de expressão de *mRNA* de quimiocinas inflamatórias em rins de cães infectados com *Leishmania*, com ou sem sinais clínicos. Cães sintomáticos (n = 8) e assintomáticos (n = 8) (Mann-Whitney, *p <0,05) 51

Figura 11: Níveis de expressão de *mRNA* das proteínas relacionadas a apoptose em rins de cães infectados com *Leishmania*, com ou sem sinais clínicos. Cães sintomáticos (n = 8) e assintomáticos (n = 8) (Mann-Whitney, * p <0,05) 52

Figura 12: Níveis de expressão de *mRNA* das citocinas relacionadas a fibrose em rins de cães infectados com *Leishmania*, com ou sem sinais clínicos. Cães sintomáticos (n = 8) e assintomáticos (n = 8) (Mann-Whitney, *p <0,05) 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sumário das principais manifestações clínicas em cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> (sintomáticos e assintomáticos)	54
Tabela 2: Parâmetros histomorfométricos do infiltrado inflamatório renal de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> (sintomáticos e assintomáticos) e não infectados (controles)	55
Tabela 3: Índice apoptótico nos glomérulos, nos túbulos (córtex e medula) e no infiltrado inflamatório renal de cães naturalmente infectados (sintomáticos e assintomáticos) e não-infectados (controles) pela <i>Leishmania infantum</i>	56
Tabela 4: Expressão de AgNOR no glomérulo e túbulos renais, região cortical e medular, em cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> , sintomáticos e assintomáticos	57
Tabela 5: Correlação entre os parâmetros morfométricos relacionados com a apoptose e a resposta inflamatória em cães, sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> e controles	58

Aos inesquecíveis animais utilizados nos experimentos, que olham questionando o que ocorre; que sentem dor, febre e não compreendem; que não entendem a dor, a perda da liberdade, que lambem as mãos do algoz, confundindo-o com um amigo.

Dedico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS	30
3. MATERIAL E MÉTODO	31
3.1. Animais	31
3.2. Casuística e diagnóstico da leishmaniose visceral	31
3.3. Delineamento experimental	31
3.4. Coleta e processamento das amostras	32
3.5. Imunohistoquímica para a detecção de amastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	32
3.6. <i>Polimerase Chain Reaction (PCR)</i>	33
3.6.1. Extração do <i>DNA</i> de material incluído em parafina.....	33
3.6.2. Amplificação do <i>DNA</i> através da <i>PCR</i> específica	34
3.6.3. Análise dos produtos amplificados	34
3.7. Análise descritiva da resposta inflamatória.....	34
3.8. Análise morfométrica	35
3.9. Detecção “ <i>in situ</i> ” da apoptose: método de <i>TUNEL</i>	36
3.10. Avaliação da expressão da proteína <i>caspases</i> (3 e 8), <i>Bax</i> e <i>Bcl2</i> por técnica de imunohistoquímica	38

3.11. Extração de <i>RNA</i> , reação de transcriptase reversa para obtenção de <i>cDNA</i> e <i>qPCR</i>	38
3.12. Delineamento estatístico e análise dos resultados	39
4. RESULTADOS	41
4.1. Diagnóstico e avaliação clínica dos cães com leishmaniose visceral	41
4.2. Descrição das alterações histopatológicas e bioquímicas	41
4.3. Análise morfométrica da resposta inflamatória	42
4.4. Índice apoptótico em glomérulos, túbulos e foco inflamatório	42
4.5. Quantificação de <i>AgNORs</i> no infiltrado inflamatório.....	43
4.6. Análise morfométrica das fibras colágenas	43
4.7. Análise molecular de proteínas, citocinas e quimiocinas relacionadas a inflamação, apoptose e fibrose	43
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXOS	107

1. INTRODUÇÃO

Leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Estes parasitos pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, são digenéticos (heteroxeno), com formas promastigotas (com flagelo externo) e amastigotas arredondadas (sem flagelo externo). São parasitos intracelulares obrigatórios de hospedeiro vertebrado cuja multiplicação ocorre por divisão binária. O tamanho da forma promastigota varia consideravelmente. Em geral, o corpo mede 10,0 a 20,0 x 1,5 a 3,0 μm , com um flagelo frequentemente muito maior que o corpo. As amastigotas são arredondadas, ovais e medem de 1,5 a 2,5 x 4,5 a 6,8 μm dependendo da espécie do parasito (LAINSON e SHAW, 1987). A doença é tradicionalmente dividida em duas síndromes clínicas principais: Leishmaniose visceral e tegumentar.

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose causada por *Leishmania infantum* (MAURICIO *et al.*, 2000) e transmitida pela picada da fêmea do flebotômíneo *Lutzomyia longipalpis* no Brasil (DEANNE e DEANNE, 1955; LANZARO e WARBURG, 1995). Espécies de *Leishmania* induzem uma reação imune específica de órgãos, tornando a resposta a este parasita ainda mais complexa (MUKHERJEE *et al.*, 2003). A doença acomete roedores e também mamíferos, inclusive o homem. A nomenclatura *Leishmania infantum* (CUNHA e CHAGAS, 1937) está sendo amplamente discutida atualmente. Com base na origem e taxonomia do parasito, Lainson e Shaw (1987) consideram que a espécie *L. infantum* se originou nas Américas enquanto que Killick-Kendrick (1985) e Rioux (1990) consideram que a *L. infantum* seja a espécie *Leishmania infantum* introduzida nas Américas por Portugueses e Espanhóis durante o período colonial.

Inicialmente, a LV apresentava distribuição rural, mas hoje se encontra em franca expansão para áreas urbanas no Brasil devido às mudanças ambientais decorrentes da atividade humana que influenciaram o ciclo silvestre da doença (LAINSON e SHAW, 1987). A LV apresenta manifestações clínicas que podem ser agrupadas sob três formas, a depender da complexa interação entre a virulência do parasito e a resposta imune do hospedeiro (LANZARO e WARBURG, 1995). A forma assintomática caracteriza-se por sorologia positiva sem nenhuma manifestação clínica. A forma oligossintomática, também encontrada em áreas endêmicas, caracteriza-se por

sorologia positiva e presença de sinais clínicos discretos como febre, hepatomegalia e/ou esplenomegalia de pequeno grau. A forma clássica é a doença manifesta caracterizada por hepatoesplenomegalia, febre, pancitopenia, hipergamaglobulinemia, com grande comprometimento do estado geral (BADARÓ *et al.*, 1986).

Os canídeos são os mais importantes elos na manutenção da cadeia epidemiológica da LV (DEANNE e DEANNE, 1955). O cão é o principal reservatório doméstico da doença (ABRANCHES *et al.*, 1998). Levantamentos epidemiológicos realizados em áreas endêmicas no Brasil e em outras regiões do Mundo concluíram que a população de cães infectados inaparentes é maior em relação à observada em cães infectados e portadores de sintomatologia clínica (CABRAL *et al.*, 1992; BERRAHAL *et al.*, 1996; SOLANO-GALLENO *et al.*, 2001). Baseado neste fato, o programa de controle da LV urbana no Brasil, dentre outras ações, preconiza a eliminação de todos os cães com sorologia positiva, como medida de prevenção da doença humana. Mas, tal procedimento não tem alcançado a eficiência esperada (DIETZE, 1997; REITHINGER *et al.*, 1999; CAPELLI *et al.*, 2004). Esse fato aponta para outros fatores que podem contribuir para a manutenção e expansão da LV, como animais da fauna sinantrópica atuando como reservatório primário de *Leishmania infantum* (BETTINI e GRANDONI *et al.*, 1986; LAINSON, 1988; ASHFORD, 1996). A participação de animais silvestres e insetos no ciclo do parasito nas matas e florestas associadas, em parte, à ocorrência de epidemia em área urbana com alta taxa populacional, a resistência dos insetos vetores aos inseticidas, bem como más condições de saneamento, dificultam a intervenção eficiente no sentido de controlar a infecção.

Durante seu ciclo biológico, o parasito se multiplica em células do sistema fagocítico mononuclear provocando alterações nos órgãos desse sistema (EVANS e RÊBELO, 1996) como observado em estudos realizados no homem (DUTRA *et al.*, 1985; DUARTE, 2000), em modelos de cão (EVANS e REBELO, 1996, VERÇOSA *et al.*, 2008) e hamster (SARTORI *et al.*, 1987). No interior de macrófagos do hospedeiro vertebrado, encontram-se as formas amastigotas, arredondadas e sem flagelo, sendo um parasito intracelular obrigatório. Estas formas transformam-se em formas promastigotas, alongadas e com flagelo externo, no tubo digestivo do inseto vetor e posteriormente evoluem, em parte, para a forma metacíclica, que é altamente infectante. A transmissão do parasito ocorre durante o repasto sanguíneo do vetor infectado, que inocula promastigotas na pele do hospedeiro vertebrado. Estas são

fagocitadas por macrófagos, no interior do qual se transformam em amastigotas, proliferam, distribuindo-se para muitos órgãos; desencadeando, assim, o processo patológico no hospedeiro devido à imunossupressão que acomete as espécies susceptíveis (PINELLE *et al.*, 1994). O ciclo biológico do parasita é mostrado na figura 1.

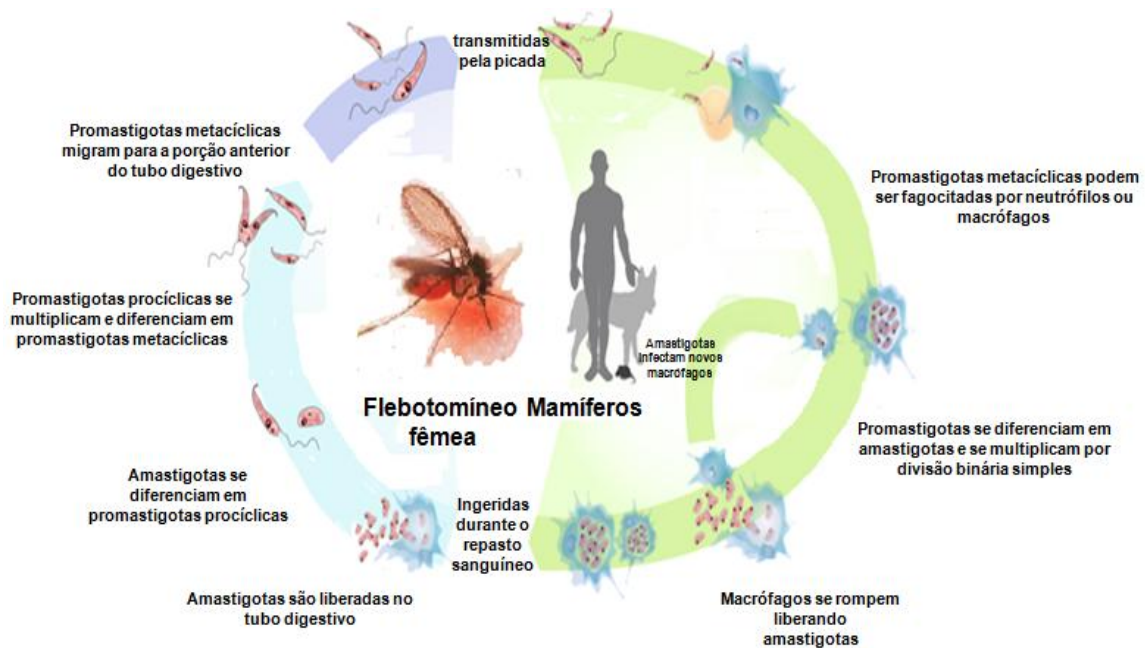


Figura 1: Esquema mostrando as diversas fases do ciclo biológico do parasita de espécies do gênero *Leishmania* nos hospedeiros vertebrado e invertebrado (Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Leishmaniose>).

O diagnóstico clínico da LV canina é tarefa complicada devido ao curso prolongado da enfermidade, ao alto pleomorfismo das lesões e à associação com infecções secundárias oportunistas (RAMOS VARA *et al.*, 1994), doenças autoimunes (SLANPENDEL *et al.*, 1988; GINEL *et al.*, 1993) e neoplasias (MARGARITO *et al.*, 1994). O teste sorológico pode ser insuficiente para diagnosticar a LV sendo recomendada a realização de testes parasitológicos, que permitem a visualização do parasito (CIARAMELLA *et al.*, 1997) e/ou o teste imunoistoquímico que permite rápida identificação das formas amastigotas presentes nos diversos tecidos. Este método possui grande especificidade e fácil realização (FERRER *et al.*, 1988; WUNDERLIN e POSPISCHIL *et al.*, 1992; BOURDOISEAU *et al.*, 1997; TAFURI *et al.*, 2004). A utilização da técnica de *PCR* é considerada uma ferramenta muito sensível e útil no

diagnóstico da LV, pois animais assintomáticos muitas vezes apresentam sorologia e parasitologia negativas (SOLANO GALLENDO *et al.*, 2001).

Vários modelos animais são utilizados para estudar a evolução da LV e as alterações em órgãos específicos. O cão é um bom modelo de estudo na LV quando naturalmente infectado (VERÇOSA *et al.*, 2008). No modelo murino, a progressão da infecção é observada somente nas primeiras semanas, ocorrendo controle da replicação do parasito posteriormente e diferenças entre linhagens (MURRAY *et al.*, 1987). O hamster é um bom modelo de estudo da LV e quando infectado experimentalmente, desenvolve a doença na sua forma clássica (MATHIAS *et al.*, 2001) o que permite estudar a patogenia, a dinâmica da evolução da doença e as alterações funcionais decorrentes da infecção.

Após a lesão tecidual decorrente da infecção, o hospedeiro responde a agressão com produção e liberação imediata e sequencial de diversos mediadores bioquímicos que provocam vasodilatação, aumentam o volume sanguíneo e expandem o leito vascular na área atingida e, ao mesmo tempo, aumentam a permeabilidade vascular para facilitar a formação de exsudato e o influxo de células inflamatórias. Os neutrófilos são recrutados 25 horas após infecção por *Leishmania major* e provavelmente são a primeira barreira do hospedeiro vertebrado à invasão do parasito (LIMA *et al.*, 1998; MULLER *et al.*, 2001). Migração de neutrófilos para o tecido é influenciada pela expressão de citocinas principalmente, quimiocina ativadora de neutrófilos (MÜLLER *et al.*, 2001; LAUFS *et al.*, 2002). Estas células também são atraídas ao local de infecção por peptídeos resultantes da ativação do complemento (C3a e C5a) e pela liberação de fator quimiotático de granulócitos pela promastigota de *Leishmania* (VAN ZANDEBERGEN *et al.*, 2004).

A resposta imune celular é considerada a mais importante tanto na resistência quanto na susceptibilidade do hospedeiro vertebrado à LV. O macrófago infectado pelo parasito apresenta antígenos aos linfócitos CD4+, induzindo assim a ativação de linfócitos Th1 e Th2. Uma resposta imune celular protetora contra *L. infantum* tem sido descrita em vários estudos (CABRAL *et al.*, 1992; PINELLE *et al.*, 1994; MORENO *et al.*, 1999; REIS *et al.*, 2006). Está sendo sugerido por alguns autores pesquisados que a resistência a infecção por *Leishmania* pode estar associada a baixos títulos de IgG e a produção de citocinas como IL-2 e TNF- α (PINELLE *et al.*, 1994; REIS *et al.*, 2006),

que podem estar relacionadas a resposta imune do tipo *Th1*. Os linfócitos *Th2* produzem *IL-4*, *IL-5*, *IL-6* e *IL-10*, que determinam a susceptibilidade do hospedeiro (KEMP *et al.*, 1996). Além disto, os macrófagos ativados geram elementos leishmanicidas como produtos reativos de oxigênio (como $O_2^{\bullet-}$; H_2O_2 ; $ROOH$; $HOCl$) e nitrogênio (MURRAY, 1987; LIEW, 1990). Por outro lado, além de seu papel na defesa contra agentes invasores, a produção exacerbada de reativos de oxigênio, pode, de forma não seletiva, está intimamente relacionada a processos patológicos ao reagir com moléculas do hospedeiro, levando à alteração no funcionamento de proteínas, membranas e ácidos nucléicos.

Produtos de reações de oxidação-redução do oxigênio (O_2) como o radical ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peróxidos orgânicos ($ROOH$) e o ácido hipocloroso ($HOCl$) são constantemente gerados por células inflamatórias com o intuito de neutralizar agentes invasores. Em células inflamatórias, a produção destes intermediários de oxigênio ocorre principalmente por ação catalítica da enzima *NADPH* oxidase, a qual catalisa a formação do radical ânion superóxido, e da enzima mieloperoxidase, que catalisa a formação do ácido hipocloroso a partir do peróxido de hidrogênio e cloreto. A mieloperoxidase é a enzima mais abundante em neutrófilos e sua versatilidade catalítica lhe confere habilidade de reagir com uma série de substratos que não somente o cloreto. Estes substratos incluem polifenóis, catecolaminas, aminoácidos, superóxido, nitrito, ácido ascórbico (vitamina C) e o ácido úrico (MEOTTI *et al.*, 2011).

O tipo de infiltrado inflamatório reflete o perfil da resposta imunológica contra o parasito e o grau de susceptibilidade dos animais à doença (LEMOS DE SOUSA *et al.*, 2000). O infiltrado inflamatório de hospedeiros resistentes é constituído por linfócitos, plasmócitos e macrófagos (TAFURI *et al.*, 2001; Dos SANTOS *et al.*, 2004) e poucos parasitos (KEENAN *et al.*, 1984; LEMOS DE SOUSA *et al.*, 2000). Por outro lado, em indivíduos susceptíveis, o infiltrado é composto quase que exclusivamente por macrófagos não ativados contendo vacúolos citoplasmáticos repletos de parasitos (BITTENCOURT e BARRAL NETTO, 1995; LEMOS DE SOUSA *et al.*, 2000).

A apoptose participa ativamente no processo de modulação da resposta inflamatória (WEINRAUCH e ZYCHLINSKY, 1999; CARRERO *et al.*, 2004). A fase de resolução da inflamação aguda é caracterizada pela infiltração de macrófagos que

fagocitam um grande número de células (MADERNA e GODSON *et al.*, 2003) em fase inicial da apoptose (EDA *et al.*, 2004) presentes nos sítios inflamatórios. Após a fagocitose de células ou corpos apoptóticos por macrófagos, ocorre a síntese de *TGF-β*, *PE2* e *PAF*, mediadores bioquímicos de resposta anti-inflamatória (HUYNH *et al.*, 2002; FADOK *et al.*, 1998). Quando células ou corpos apoptóticos não são fagocitados por macrófagos, eles comportam-se como células necróticas, sofrem lise, liberam seus constituintes intracelulares para o meio extracelular e reativam a resposta inflamatória (SAVILL *et al.*, 1989; COHEN *et al.*, 2002) com a liberação de mediadores pro inflamatórios como *IL-8* e *TNF-α* (REN *et al.*, 2001).

Apenas células necróticas induzem a expressão de genes pró-inflamatórios em macrófagos via *TLR-2* dependente de ativação de *NFκ-β* (LI *et al.*, 2001). Contudo, a resposta de macrófagos em relação à fagocitose de células apoptóticas em fase inicial ou tardia pode ser tanto anti-inflamatória quanto pró-inflamatória a depender do tipo de estímulo, do estado de ativação do macrófago assim como do receptor envolvido (KRYSKO *et al.*, 2006). Vários receptores de macrófagos estão relacionados com a fagocitose de células apoptóticas entre eles, receptores da família *scavenger* (PLATT *et al.*, 1998), integrinas (FADOK *et al.*, 1998) e receptores do sistema complemento (MEVORACH *et al.*, 1998). Receptores do tipo *TLR4* têm sido descritos tendo um papel importante na fagocitose de células apoptóticas (SHIRATSUCHI *et al.*, 2004). A deposição de *C3* e *C4* na superfície das células apoptóticas em decorrência da ativação da cascata do complemento ocorre na fase final da apoptose (GAIPL *et al.*, 2001; ZWART *et al.*, 2004).

A capacidade de sobrevivência de formas amastigotas no interior de vacúolos parasitóforos da célula do hospedeiro vertebrado e de formas promastigotas no interior do tubo gastrointestinal do vetor invertebrado determina o sucesso da infecção, desta forma, o processo de apoptose é um mecanismo importante na patogenia das Leishmanioses (SHAHA, 2006). Diversos estudos mostram apoptose da *Leishmania* em resposta a drogas leishmanicidas. Durante o crescimento estacionário de formas amastigotas axênicas de *L. donovani* tratadas com altas concentrações de antimoniato, houve uma maior atividade de caspases. Contudo, não foi observado nenhum aumento significativo desta atividade em formas promastigotas após tratamento com altas concentrações ou durante longos tratamentos com antimoniato. Isto demonstra que existem diferenças na atividade leishmanicida do antimoniato a depender da forma de

Leishmania (LEE et al., 2002). Outras drogas com potencial leishmanicida estão sendo avaliadas entre elas, o Metilfosine, droga de uso oral que induz a morte da *Leishmania* com condensação e fragmentação do DNA em padrão escada, ambas as características da apoptose (VERMA e DEY, 2004). Neste contexto, a apoptose pode representar um grande potencial farmacológico na estratégia de controle da infecção por *Leishmania* (DEBRABANT *et al.*, 2003).

Apoptose ou morte celular programada é um mecanismo de eliminação controlada de células. Trata-se de um fenômeno naturalmente controlado, iniciado ou inibido por vários estímulos, fisiológicos ou patológicos (KERR, 1993). Representa um tipo de autodestruição celular dependente de energia, síntese e degradação proteicas. Como processo ativo, a apoptose requer reservas de *ATP* (pelo menos nas fases iniciais), ao passo que a necrose se instala quando há depleção total do *ATP* (KERR e SEARLE, 1972). A necrose se caracteriza pela perda da integridade da membrana plasmática. Diferentes etiologias como isquemia, hipóxia, hipertermia, irradiação e metabólitos tóxicos podem levar à perda abrupta da integridade da membrana plasmática (citólise) e à alteração de seus gradientes eletroquímicos. Ademais, a liberação dos constituintes intracelulares para o meio extracelular estimula a resposta inflamatória e ampliam a lesão tecidual (PATEL, 2000).

A apoptose possui como marca registrada a autodigestão controlada dos constituintes celulares, devida à ativação de proteases endógenas e pode ser comparada metaforicamente a um "suicídio celular". A ativação dessas proteases compromete a integridade do citoesqueleto, provocando verdadeiro colapso da estrutura celular. Em resposta à contração do volume citoplasmático, a membrana celular forma bolhas e se altera o posicionamento de seus lipídios constituintes. Em células normais, a distribuição de fosfatidilserina se faz primariamente no folheto interno da membrana plasmática. Durante o processo de apoptose esse lipídio se expõe no folheto externo da membrana. O novo posicionamento da fosfatidilserina serve como sinalizador para que células fagocíticas das proximidades englobem os fragmentos celulares e completem o processo de degradação (PESSAYRE *et al.*, 1999).

Durante o processo de apoptose ocorrem alterações características no núcleo celular graças à ativação de endonucleases que degradam o *DNA*. Como resultado, o núcleo torna-se retraído e hipercromático, com cromatina condensada nas porções

adjacentes à membrana nuclear. Finalmente, o núcleo entra em colapso e se fragmenta. Simultaneamente, as bolhas que se formam no citoplasma separam a célula em fragmentos circundados por membrana, contendo fragmentos do núcleo e organelas intactas, dando origem a estruturas denominadas de corpos apoptóticos (KERR, 1993; THOMPSON, 1999). Um dos aspectos que distingue a apoptose da necrose é, nesta, a preservação da integridade da membrana plasmática que evita a liberação dos constituintes celulares para o meio extracelular e, conseqüentemente, a sinalização pró inflamatória e quimiotaxia e a ativação de células fagocíticas (KERR, 1993).

As caspases (*Cysteiny Aspartate-Specific Proteinase*) são endopeptidases cisteíno-proteases, que clivam obrigatoriamente substratos com ácido aspártico P1 (RANO *et al.*, 1997). As caspases estão presentes no citosol sob a forma de pró-enzimas inativas, tornando-se ativas após clivagem proteolítica (THOMPSON, 1999). Pelo menos 14 membros dessa família já foram identificados nos mamíferos e estão envolvidos no processo de inflamação e apoptose. Uma vez ativada, a maioria das caspases tem a habilidade de catalisar a ativação de múltiplos membros dessa família, resultando em amplificação da cascata proteolítica. Alguns membros, tais como a caspase-8, ocupam posição proximal na cascata proteolítica e agem como reguladores e iniciadores, enquanto outros como a caspase-3 são mais distais e agem como efetores da fragmentação celular (PATEL e GORES, 1998).

A participação de neutrófilos na LV ainda não está bem clara, mas sabe-se que neutrófilos parasitados, como os macrófagos, são protegidos de morte por apoptose (ROUSSEAU *et al.*, 2001). Assim, a sobrevivência da *Leishmania sp* em neutrófilos e sua posterior fagocitose por macrófagos, contribuem para a manutenção e progressão da infecção (AGA *et al.*, 2002; VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004; RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2005; VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2007). Durante a infecção por inúmeros tripanossomídeos, células do hospedeiro vertebrado promovem apoptose em detrimento da necrose (PIACENZA *et al.*, 2001). Em parasitos como *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania amazonensis*, a apoptose pode ser regulada por sinais advindos dos hospedeiros vertebrados (por exemplo, temperatura e síntese de lecitinas) associados aos componentes da resposta imune como a produção de proteínas do sistema complemento e citocinas (AMEISEN, 2002).

Para a sobrevivência de um parasito intracelular obrigatório, como a *Leishmania*, nas fases iniciais da infecção é preciso que a célula hospedeira não seja ativada adequadamente. Por meio da fagocitose de corpo apoptótico contendo parasitos (Van ZANDBERGEN *et al.*, 2004), amastigotas não entram em contato com os receptores do fagócito e desta forma este não é ativado, o que resulta em um meio propício para o desenvolvimento da infecção (SAVILL *et al.*, 1989; MEAGHER *et al.*, 1992). Camundongos com deleção de neutrófilos mesmo com a presença de macrófagos apresentam menor carga parasitária, indicando que a *Leishmania sp* na ausência de neutrófilos tem dificuldades para manter a infecção (PETERS *et al.*, 2008).

A presença de *Leishmania* apoptótica no interior de fagócitos facilita a sobrevivência das *Leishmanias* não apoptóticas, o que resulta na progressão da infecção e no desenvolvimento da doença. Ambas as formas promastigotas de *Leishmania*, Fosfatidil serina (PS) positivas e PS negativas, são internalizadas pelos macrófagos, mas apenas as formas PS negativas são infectivas. Contudo, quando macrófagos são infectados com promastigotas PS negativas na presença de formas PS positivas ocorre redução da síntese de óxido nítrico pelo macrófago ativado, o que favorece a sobrevivência de formas promastigotas viáveis (WANDERLEY *et al.*, 2009). Formas amastigotas de *Leishmania (L) amazonensis* expõem PS em sua superfície e usam este receptor para penetrar no macrófago. O pré tratamento das formas amastigotas com Anexina V – substância que se liga a PS em altas concentrações de Cálcio - inibe a infectividade das amastigotas em pelo menos 50% e reduz significativamente a secreção de *TGF-β1* (mediador bioquímico anti-inflamatório) por macrófagos infectados (FREITAS BALANCO *et al.*, 2001).

Após a picada do flebotomíneo, uma mistura de formas promastigotas apoptóticas e viáveis é inoculada na pele do hospedeiro. Ocorre o recrutamento de neutrófilos para o local. Formas promastigotas apoptóticas expressando PS são reconhecidas e fagocitadas por neutrófilos, onde não ocorre a multiplicação do parasito. Nesta fase, ocorre a produção de *TGF-β* para que ocorra uma desregulação na produção de *TNF-α*. Após a infecção do neutrófilo com formas promastigotas não apoptóticas e apoptóticas de *Leishmania sp* ocorre a produção de *MIB-1β* (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004). Elevados níveis de *MIB-1β*, citocina responsável pelo recrutamento de monócitos/macrófagos para o sítio de infecção, secretado por neutrófilos apoptóticos infectados favorecem o contato e posterior multiplicação do parasito na célula

hospedeira (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004). Este é o momento onde ocorre o recrutamento de macrófagos para o sítio de infecção e a fagocitose de corpos apoptóticos de neutrófilo contendo formas não apoptóticas de *Leishmania sp.* A endocitose silenciosa de corpos apoptóticos de neutrófilo é uma função básica do macrófago. Este fato facilita a sobrevivência da *Leishmania* no interior do macrófago por desregular a atividade microbicida do macrófago (FREITAS BALANCO *et al.*, 2001). Os corpos apoptóticos contendo *Leishmania* são fagocitados por macrófagos e, no interior deste, formas amastigotas se multiplicam, resultando na progressão da infecção por *Leishmania infantum*.

A apoptose representa um mecanismo de defesa contra viroses e provavelmente outros agentes infecciosos como bactérias e protozoários intracelulares (VAUX *et al.*, 1994). A apoptose desempenha papéis distintos na progressão (DAS *et al.*, 1999) ou na regressão (CONCEIÇÃO-SILVA *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 1998) da lesão provocada pela *Leishmania sp.* Os parasitos interagem com múltiplos sistemas regulatórios para tornar sua célula hospedeira refratária à apoptose durante as fases críticas da infecção incluindo a invasão celular, estabilização e multiplicação do patógeno (CARMEN e SINAI, 2007). Os mediadores responsáveis por esta modulação ainda são desconhecidos.

Além disto, existem evidências que apontam a ocorrência de apoptose em outros elementos celulares e até mesmo do próprio parasito como forma de controle populacional ou devido a restrições nutricionais (WELBURN *et al.*, 1997; KNIGHT *et al.*, 2002). A apoptose de formas amastigotas do parasito foi observada em hamsters durante infecção experimental com *Leishmania (L) infantum* nas fases finais da infecção enquanto que, nas células hospedeiras, o processo ocorria nas fases iniciais (LINDOSO *et al.*, 2004). Alguns fatores promovem a apoptose de formas amastigotas intracelulares como a elevada produção de NO (HOLZERMULLER *et al.*, 2005) e de peróxido de hidrogênio (DAS *et al.*, 2001), ambos são o resultado da ativação da célula hospedeira.

Outro fator importante é a participação de proteínas da família *Bcl2* na patogenia da LV devido à inibição da liberação do citocromo c (AKARID *et al.*, 2004) resultando em aumento dos níveis de *phospho-Bad*. A inibição da apoptose de macrófagos ainda pode resultar da ativação de *ERK1/2 MAP kinases CD74* dependente pela cepa *Lm1740MIF* (KAMIR *et al.*, 2008). Van Zandbergen *et al.* (2006) relata a

provável interferência do parasito na transformação enzimática da pró-caspase 3 na sua forma ativa, o que resultaria na sobrevivência da *Leishmania* no interior da célula hospedeira.

A inflamação, tal como um mecanismo de defesa do hospedeiro contra infecções parasitárias, desempenha um papel na progressão e a resolução da infecção. Assim, o infiltrado inflamatório modula a relação parasita-hospedeiro. Dependendo dos estímulos, do estado de ativação e dos receptores envolvidos, a resposta dos macrófagos pode ter um perfil anti-inflamatório ou pró-inflamatório (KRYSKO *et al.*, 2006). Além disso, a exacerbação de respostas anti-inflamatórias ou pro-inflamatórias vai determinar o êxito ou a falha de infecção por *Leishmania sp.*

O sucesso na imunidade durante a infecção por *Leishmania* depende do recrutamento adequado de células imunitárias efetoras para o local da infecção sendo que as quimiocinas desempenham um papel crucial nesse processo. A patogenia das lesões provocadas durante o curso da leishmaniose visceral é um processo complexo e está frequentemente associada com perfis alterados de expressão de quimiocinas e migração defeituosa de células imunes (STANLEY e ENGWERDA, 2007). O equilíbrio de respostas imunes do tipo *Th1* e *Th2* determinam o resultado da infecção e a correlação entre a resposta imune do hospedeiro e a virulência do parasito (SCOTT *et al.*, 1988).

Após a ativação pela *IL-4*, os linfócitos *Th2* produzem subsequentemente quantidade adicional de *IL-4*, o que diminui a produção de citocinas e células com perfil *Th1* (macrófagos, *IFN- γ* , células dendríticas e *IL-12*) (PAUL e ZHU, 2010). Durante a diferenciação celular, a *IL-4* inibe a sinalização e a diferenciação de células *T CD4 + naíve* em efetores *Th1* ou *Th17* (MURPHY e REINER, 2002; HARRINGTON *et al.*, 2006; VELDHOEN *et al.*, 2006). *IL-4* também controla a inflamação, regulando o equilíbrio entre a ativação de macrófagos com perfil pró-inflamatórios (*M1*) e macrófagos anti-inflamatórios (*M2*) (STEIN *et al.*, 1992; LOKE *et al.*, 2003; HELLER *et al.*, 2008). A *IL-4* foi descrita pela primeira vez com o único papel de inibir a ativação de macrófagos e suprimir a expressão de *TNF- α* e *IL-6*. Atualmente, é clara a função da *IL-4* em induzir positivamente as funções "anti-inflamatórias" de macrófagos associados com infecção crônica, inflamação alérgica e fibrose tecidual (GORDON e MARTINEZ, 2010; BISWAS e MANTOVANI, 2010; MURRAY e WYNN, 2011).

O equilíbrio entre agentes imunes efetores em tecidos inflamados é controlado pelo recrutamento, local e diferencial, de tipos celulares específicos da resposta imune inata e adaptativa (BROMLEY *et al.*, 2008; VOEHRINGER *et al.*, 2004). *Th1*, *Th2* e as células efectoras *Th17* preferencialmente expressam padrões distintos de receptores de quimiocinas que podem promover o recrutamento para o foco inflamatório. Citocinas e quimiocinas parecem amplificar e polarizar a inflamação do tecido (SUNDRUD *et al.*, 2003; MATHEW *et al.*, 2001). A expressão de *IL-4*, produzida pelas células imunitárias de resposta inata, é crítica para o recrutamento de linfócitos *Th2* para o tecido alvo afim de combater o patógeno e também durante a inflamação alérgica (VOEHRINGER *et al.*, 2006; URBAN *et al.*, 2001). O papel da *IL-4* na regulação negativa no recrutamento de células com perfil de resposta *Th1* foi pouco estudado até o presente momento.

Muitas doenças que afetam o rim, incluindo LV, são causados pela deposição "*in situ*" de complexos imunes circulantes (MCCLUSKEY e BHAN, 1982; MACIANTI *et al.*, 1989; LOPES *et al.*, 1996). Por outro lado, estudos recentes sobre a patogenia da glomerulonefrite canina causada por *L. infantum* revelaram o envolvimento de células *T* (COSTA *et al.*, 2000), citocinas, moléculas de adesão e a apoptose (COSTA *et al.*, 2010). Nefrite intersticial é uma lesão frequente na LV (OLSEN *et al.*, 1986). No entanto, a patogenia da lesão túbulo-intersticial ainda não é completamente compreendida, embora o mecanismo imune mediado por células em seres humanos (BOUCHER *et al.*, 1986) e em modelos experimentais (NIELSON *et al.*, 1984) é bem abordado.

Durante a progressão da glomerulonefrite experimental, a apoptose está envolvida na resolução da inflamação intra- e extra glomerulares (PRAGA e MORALES, 2002). A apoptose desempenha um papel essencial na celularidade renal durante a homeostase ou, mesmo, em estado patológico (YANG *et al.*, 2001; WONG *et al.*, 2001; ORTIZ *et al.*, 2002; SAVILL, 2008). Em modelos experimentais de lesão renal aguda tóxica, apoptose e morte em células epiteliais renais parecem contribuir para a perda da função renal (ARANY *et al.*, 2008). Além disso, a apoptose está envolvida na patogenia de diversas lesões renais, tais como glomerulonefrite e cistos, nefrite intersticial, cicatrizes e esclerose renal, a lesão de isquemia de reperfusão, a toxicidade da cisplatina, obstrução mecânica, e doença policística (MENE e AMORE, 1998; WONG *et al.*, 2001, RAMESH e REEVES, 2003).

No tecido renal saudável, fibroblastos quiescentes são envolvidos na rotina de manutenção da matriz extracelular (ECM). Dependendo de estímulos fisiológicos e patológicos, os fibroblastos são ativados e diferenciam-se em miofibroblastos (ZEISBERG *et al.*, 2000a; LIU, 2004). A fibrose é uma consequência normal da lesão e inflamação crônica persistente, caracterizado pela ativação e proliferação de fibroblastos, com grande deposição de proteínas da matriz extracelular. A distorção da arquitetura do tecido renal normal pode levar à diminuição da função. A fibrose pode afetar qualquer órgão e pode representar uma resposta aberrante de uma única lesão grave ou a uma lesão persistente ou repetitiva (ABBAS *et al.*, 1996, ALBANIS *et al.*, 2003).

A LV canina geralmente envolve deposição conspícua e sistêmica de colágeno no fígado, baço, linfonodos, pulmão e rim (SILVA *et al.*, 2013; MELO *et al.*, 2008). Além disso, várias outras infecções como *a Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Schistosoma mansoni*, e *Toxoplasma gondii* - são conhecidas por causar inflamação crônica e fibrose subsequente em múltiplos órgãos (HOGABOAM *et al.*, 2000; COSMA *et al.*, 2003; HOGABOAM e MENEHIN, 2007; SCHAAF *et al.*, 2000; KLEINER *et al.*, 2005; GLANVILLE *et al.*, 2005; ARORA *et al.*, 2005; CHEEVER *et al.*, 1994; NOEL *et al.*, 2004).

Tal como acontece com glomeruloesclerose, fibrose tubulointersticial envolve inflamação, proliferação e apoptose (ZEISBERG *et al.*, 2000b; EL NAHAS, 2003). Fibroblastos presentes no córtex renal têm papéis chave na mediação da comunicação intercelular e manutenção da arquitetura do tecido renal. Eles produzem uma variedade de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, sob condições basais e patológicas (QI *et al.*, 2005), e tem uma capacidade endocítica e de apresentação antigênica, o que facilita o seu papel na mediação de processos inflamatórios (ZEISBERG *et al.*, 2000a).

Fibrose glomerular e tubulointersticial inicialmente começa pela infiltração de monócitos e macrófagos, progredindo com o acúmulo excessivo de matriz extracelular (COUSER e JOHNSON, 1994; BENIGNI e REMUZZI, 2001; EDDY, 2001; RU e EYDEN, 2003). Células tubulointersticiais são substituídas por miofibroblastos, produzindo cicatrizes e fibrose, causando comprometimento da função renal. Perícitos podem residir suprajacente ao endotélio dos grandes vasos (ANDREEVA *et al.*, 1998) e podem participar como um precursor para miofibroblastos. A lesão vascular provoca a migração de perícitos para o interstício e sua diferenciação em miofibroblastos. Células

inflamatórias presentes no interstício renal podem interagir com fibroblastos intersticiais. A ativação e proliferação de fibroblastos e miofibroblastos culminam em fibrose intersticial, que comprimem túbulos renais gerando apoptose e atrofia tubular (ZEISBERG *et al.*, 2000a).

O $TGF-\beta$ é um fator chave no desenvolvimento da fibrose (LIU, 2004) e na diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (FINE e GOLDSTEIN, 1987; SPRUGEL *et al.*, 1987; BATTEGAY *et al.*, 1990; SPORN e ROBERTS, 1993). Vários tipos celulares, incluindo células *T*, macrófagos, fibroblastos e células epiteliais produzem $TGF-\beta$. Existem três isoformas do $TGF-\beta$ ($TGF-\beta 1-3$); todas elas têm atividade biológica semelhante, apesar de cada isoforma expressa um padrão distinto sob o controle de um único promotor (ATTISANO e WRANA, 1996; LETTERIO e ROBERTS, 1998). Devido aos seus efeitos de grande alcance no corpo, o $TGF-\beta$ está presente nas células em seu estado inativo, a partir de um complexo latente formado pela ligação com a proteína associado à latência (*LAP*) (SHARMA e ZIYADEH, 1994). A fim de atingir um estado ativo, o $TGF-\beta$ deve dissociar da *LAP*. Essa ativação e sinalização celular são processos complexos, envolvendo uma variedade de mediadores (LETTERIO e ROBERTS, 1998; LETTERIO, 2000).

O $TGF-\beta$ é super expresso nos glomérulos e células tubulointersticiais durante a glomerulonefrite (NIEMER *et al.*, 1995; YAMAMOTO *et al.*, 1996). Sob a influência de $TGF-\beta$, algumas células tubulares adquirem um fenótipo embrionário com propriedades mesenquimais semelhantes aos de fibroblastos e miofibroblastos (WARDLE, 1996; BORDER e NOBLE, 1997; PETERS *et al.*, 1997; HAYASHIDA e SCHNAPER, 2003). Células tubulares podem contribuir para o aumento de células envolvidas na fibrogênese renal. O resultado de lesão tubulointersticial dependerá da regressão da inflamação, da capacidade de regeneração dos túbulos e da morte de fibroblastos. Assim, a lesão tubular, a inflamação, a ativação e proliferação fibroblástica possuem um papel chave no desenvolvimento da fibrose. Este conjunto de fatores associados de forma contínua e persistente irá conduzir a um quadro de fibrose irreversível (FAN *et al.*, 1999; EL NAHAS, 2003; IWANO e NEILSON 2004).

Regiões argirofílicas organizadoras de nucléolo (*AgNORs*) são proteínas nucleares envolvidas com a transcrição ativa durante a interfase e mitose. Eles são excelentes marcadores de ativação e/ou proliferação celular e podem ser detectadas por impregnação pela prata. Nesta técnica, os grânulos acastanhados dentro dos núcleos indicam a presença de proteínas argirofílicas (*AgNORs*) que podem ser consideradas

como uma unidade ativa de transcrição de *DNA* (PLOTON *et al.*, 1986).

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral: Caracterizar e quantificar algumas moléculas relacionadas com a apoptose, a inflamação e a fibrose renais; correlacionar estes achados com a sintomatologia clínica e com a presença de lesões histopatológicas renais provocadas pela *Leishmania (Leishmania) infantum* em modelos de infecção natural (cão).

Objetivos Específicos:

- **Objetivo 1:** avaliar a inflamação e a expressão de citocinas, por histomorfometria e *qPCR*, e correlacionar esses achados com a transcrição ativa pela expressão de *AgNORs* e com as manifestações clínicas em cães naturalmente infectados pela *L. infantum*;
- **Objetivo 2:** avaliar a morte celular em glomérulos, nos túbulos renais e dentro dos infiltrados inflamatórios, e correlacionar esses resultados com a intensidade da inflamação e com a evolução clínica em cães naturalmente infectados com *L. infantum*.
- **Objetivo 3:** avaliar a fibrose intersticial e perivascular, e correlacionar esses resultados com a intensidade da inflamação e com os sinais clínicos em cães naturalmente infectados com *L. infantum*.
- **Objetivo 4:** Quantificar a expressão de quimiocinas e outras moléculas envolvidas na apoptose, na inflamação, no recrutamento inflamatório e no processo fibrogênico por meio de *qPCR*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Todos os animais detectados como infectados com *Leishmania infantum* e cães abandonados não infectados são capturados e rotineiramente eutanasiados no Centro de Controle de Zoonoses como medidas de controle da LV e demais zoonoses, de acordo com normas do Ministério da Saúde. Este estudo seguiu os princípios éticos para uso de animais em experimentação, considerando os critérios de bem estar animal. Todos os procedimentos destes experimentos estão de acordo com normas do guia brasileiro para a utilização de animais em pesquisa (Projeto de lei nº 3964/97, www.planalto.gov.br) e o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG (protocolo nº 198/2007, aprovado em 27/03/08).

3.2. Casuística e diagnóstico da Leishmaniose Visceral:

Examinou-se um total de 16 cães positivos e 7 negativos para LV provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Teresina, Piauí, Brasil, de ambos os sexos e de raças, pesos e idades variadas. Após exame clínico, o diagnóstico para LV foi confirmado por meio da (1) detecção de anticorpos anti-*Leishmania* por RIFI e ELISA; (2) visualização direta do parasito em lâminas fixadas com metanol e coradas com Giemsa, aspirado de medula óssea vermelha esternal e *imprints* de linfonodo poplíteo, baço, fígado e pele da orelha, examinados em microscópio óptico (MIKEL, 1994); (3) cultivo de formas promastigotas através de cultura de aspirado de baço, fígado, medula óssea e linfonodo em meio NNN com fase líquida de meio de Scheiner's e (4) PCR para identificação de sequência alvo do complexo Donovan. Todos os animais utilizados como grupo infectado, sintomático e assintomático, ou controle possuíam, respectivamente, resultado positivo ou negativo em todos os testes.

3.3. Delineamento experimental:

Os animais foram divididos em três grupos: a) 8 animais positivos para LV com sinais clínicos da doença; b) 8 animais positivos sem sinais clínicos e c) 7 animais negativos para LV como grupo controle. Os cães foram considerados sintomáticos quando apresentaram pelo menos uma manifestação clínica clássica da doença, associada a lesão anatomopatológica sugestiva de infecção por *Leishmania infantum*. Os

cães assintomáticos não possuíam nenhum sinal clínico de LV e nenhuma lesão macroscópica observada durante exame necroscópico. Os parâmetros clínicos usados para classificar os animais seguiram a classificação proposta por Pozio *et al.*, (1981).

3.4. Coleta e processamento das amostras

Para a coleta das amostras, após tranquilização com Acepromazina 1% e sob efeito de anestesia geral até fase de anestesia cirúrgica com tiopental sódico 2,5% (MELBE JR. e ALTMAN, 1976; DIAS, 2000), os animais foram eutanasiados por overdose de tiopental sódico 7,5% (75 mg/kg) e necropsiados. Fragmentos de rim com aproximadamente 5 mm de espessura foram coletados e fixados em formol a 10% tamponado e, imediatamente, congelados em nitrogênio líquido após a coleta, sendo mantido a -80°C até proceder à extração do RNA e DNA genômico. Os fragmentos de rim conservados em formol, após processamento de rotina, foram incluídos em parafina. Os blocos de parafina foram cortados para a obtenção de cortes com $5\mu\text{m}$ de espessura. O sistema utilizado foi o de cortes parcialmente seriados. Os cortes foram desparafinados em xilol por 10 minutos e hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico por 5 minutos. Posteriormente, os mesmos foram corados com HE, PAS, Tricrômico de Masson, Picrosírius e Reticulina de Gomori (LUNA *et al.*, 1968).

Amostras de sangue foram coletadas e o soro obtido foi estocado a 20°C . Posteriormente, procedeu-se a mensuração dos concentrações séricas de creatinina, ureia, proteínas totais e albumina, usando o kit comercial do LABTEST (Labtest Diagnóstico SA, Lagoa Santa-MG, Brasil).

3.5. Imunohistoquímica para a detecção de amastigotas de *Leishmania (L) infantum*

A técnica de imunohistoquímica foi utilizada para marcação de formas amastigotas de *Leishmania* em material incluído em parafina (TAFURI *et al.*, 2004). Soro hiperimune de cão naturalmente infectado com exames sorológico e parasitológico positivos foi considerado com anticorpo primário. Amostras processadas de tecidos foram cortadas em lâminas silanizadas com solução de acetona + 4% de organosilano (3- Aminopropyl) triethoxysilane, ($\text{C}_9\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{Si}$; Sigma-Aldrich Co, Sto. Louise USA). Os cortes foram desparafinados em xilol por 10 minutos e hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico por 5 minutos. Em seguida foram submetidos ao bloqueio

de peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 4% em metanol, por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, bloquearam-se as reações inespecíficas (relacionadas ao anticorpo secundário) com leite em pó (caseína) a 6% em PBS 1X, em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário na diluição de 1:100 por 24 horas em câmara úmida a 4°C. A reação então foi amplificada com o sistema LSAB® System - HRP (Biotinylated Link Streptavidin – HRP, cat. K0675, DAKO corporation, Carpinteria, USA), revelada com solução de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) em PBS na concentração de 0,024% (Sigma Chemical, USA) e contracorada com Hematoxilina de Harrys (Sigma Chemical, USA). As lâminas foram montadas com Entellan e posteriormente examinadas em microscópio de luz. Como controle positivo e negativo foi utilizado fragmento de baço de cão infectado com *Leishmania infantum*, incubados com soro hiperimune e apenas PBS, respectivamente.

3.6. Polimerase Chain Reaction (PCR)

3.6.1. Extração do DNA de material incluído em parafina

Fragmentos de amostras de rim incluído em parafina de todos os animais foram submetidos à extração do DNA. Um corte contendo cerca de 10 mg de tecido teve o excesso de parafina retirado sendo colocado em tubo de microcentrifuga de 1,5 mL. Utilizou-se o Kit —Genomic DNA from tissue (NucleoSpin®Tissue, Macherey-Nagel, Dürren, Germany) seguindo instruções do fabricante. O DNA extraído foi ressuspensionado em 300 µL da solução de hidratação e deixado durante a noite a temperatura ambiente sendo, em seguida, estocado em geladeira a 4°C.

3.6.2. Amplificação do DNA através da PCR específica

A reação de cadeia da Polimerase foi realizada com o Kit GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation, cat. M7122. Madison, WI. USA). Utilizou-se 1µL do DNA da amostra e 1µL de cada iniciador diluído a 10 pL LV1 (5'-ACGAGGTCAGCTCCACTCC-3') e LV2 (5'-CTGCCACGCCTGTGTCTAC3'), ambos na concentração de 10pmoles e produzidos pela IDT Integrated DNA Technologies a partir da sequência de DNA específica para o complexo Donovanii descrito por Piarroux *et al.* (1993). Como controles positivos da PCR foram utilizados DNA de uma amostra

de baço de cão naturalmente infectado com *Leishmania infantum*, incluído em parafina (com parasitismo acentuado) e DNA de promastigotas de *Leishmania infantum* em cultura, cepa MHOM/BR/BH46, previamente dosado, contendo 1 ng/mL. Como controles negativos, foram utilizados DNA de baço de cão comprovadamente não infectado com *Leishmania infantum* e um controle sem DNA, no qual estavam presentes todos os componentes de reação exceto o DNA (Branco). A mistura final continha um volume de 25µL por amostra, que foi coberta por uma gota (20µL) de óleo mineral. Os tubos foram levados ao termociclador (M.J. Research Inc., modelo PTC-100) para amplificação do DNA segundo protocolo descrito por Laskay *et al.* (1995). Amostras foram inicialmente desnaturadas a 94°C durante por 30 segundos (30 ciclos), hibridizadas a 50°C por 30 segundos (30 ciclos), estendidas a 72°C por 30 segundos (30 ciclos) e finalizadas a 72°C por 10 minutos (10 ciclos).

3.6.3. Análise dos produtos amplificados

Os produtos amplificados pela PCR foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 5% não desnaturante em TBE (89 mM Tris-Borato, 2mM EDTA pH 8,0) por aproximadamente 2 horas, ou até que o corante xileno-cianol tivesse percorrido 2,0 cm. Foram aplicados 10µL do produto amplificado por canaleta, acrescidos de 5µL do tampão da amostra (Corante xileno cianol), o qual foi submetido a uma tensão de 120 volts. Após eletroforese, o gel foi fixado sob agitação suave à temperatura ambiente por 5 minutos em solução (10% de etanol absoluto + 0,5% de ácido acético). Em seguida, incubado por 10 minutos em solução contendo 0,17% de Nitrato de prata. A revelação foi realizada em solução contendo 3% de NaOH (p/v) e 0,1% de formaldeído 37% (v/v), até o aparecimento das bandas. Posteriormente, o gel foi transferido para a solução fixadora e fotografado em câmera digital para posterior análise.

3.7. Análise descritiva da resposta inflamatória

A intensidade, a composição e a distribuição da resposta inflamatória renal foram avaliadas em lâminas coradas com HE. Infiltrados inflamatórios foram caracterizadas como: (a) focal e discreto: quando os focos eram pequenos e isolados, (b) multifocal e moderado: com focos mais evidentes e coalescentes e (c) difuso e severo:

com grandes e extensas áreas inflamatórias, como descrito por Solano-Gallego *et al.*, (2004) e Verçosa *et al.* (2011). A intensidade do infiltrado inflamatório e fibrose foi classificada como se segue: 0- ausente, 1- mínima, 2- leve, 3- moderada e 4-grave, de acordo com Tisher e Brenner (1994), Verçosa *et al.* (2008) e Verçosa *et al.* (2011).

3.8. Análise morfométrica

O número mínimo de campos representativos foi obtido a partir de cinquenta campos iniciais, através da formação de 10 subgrupos de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35... 50, retirados aleatoriamente com reposição. Cada subgrupo foi caracterizado por sua média e respectivo coeficiente de variação. O tamanho amostral considerado como mínimo representativo foi o valor em que o incremento do nº de campos não resultou em redução considerável no valor do coeficiente de variação segundo Moro *et al.* (2004) com modificações. Na morfometria foram analisados 20 campos por animal, valor obtido como mínimo representativo neste estudo (Figura 2), capturando-se imagens com as objetivas planapocromáticas de 10x, para área, perímetro e diâmetros extremos dos focos de inflamação, área de fibrose intertubular, e 40x, para quantificação das células inflamatórias e células apoptóticas, área de fibrose vascular.

A morfometria da inflamação e fibrose intersticial e perivascular foi realizada por um único observador a partir da digitalização das imagens em analisador de imagens *Image-Pro Plus 4.5* (Media Cybernetics, Inc.), conforme figura 3. O critério utilizado na seleção das amostras e dos campos foi a presença de infiltrado inflamatório e fibras colágenas. Áreas ocupadas por glomérulos e grandes vasos não foram consideradas na análise morfométrica. Para a morfometria da inflamação, foi utilizada a coloração de HE e considerou-se como foco inflamatório o conjunto de três ou mais células inflamatórias agrupadas. Celularidade foi definida como o número total de células inflamatórias contidas em cada campo analisado. A quantificação de células apoptóticas foi feita considerando-se o seguinte critério de inclusão: só foram contadas as células que apresentaram pelo menos três características morfológicas peculiares do processo. O índice apoptótico (IA) foi determinado pela seguinte fórmula:

$$IA = (\Sigma \text{ n}^\circ \text{ de células apoptóticas} / \Sigma \text{ n}^\circ \text{ de células totais}) \times 100.$$

A quantificação das fibras colágenas foi realizada em lamínas coradas com Picrosírius sem contra-coloração por meio de densitometria da área total ocupada na

região intertubular. Por outro lado, a fibrose perivascular foi mensurada através da seguinte fórmula:

$$\text{Fibrose perivascular} = \Sigma \text{ área colágeno perivascular} / \text{área intravascular}.$$

A impregnação pela prata (*AgNOR*) foi utilizada para quantificar a ativação celular e a transcrição do *DNA*. A quantificação foi realizada em 100 núcleos de células por região (glomérulos, cortical e túbulos medulares), de acordo com Crocker *et al.* (1989). A morfometria foi realizada em um ensaio cego. O número total de pontos acastanhados de 100 células nos controles foi utilizado para se obter a média de *AgNORs* e funcionou como um ponto de corte para medir o número de grânulos em animais infectados, de acordo com a fórmula:

$$\text{AgNORs} = \Sigma \text{ AgNORs em 100 células} / 100.$$

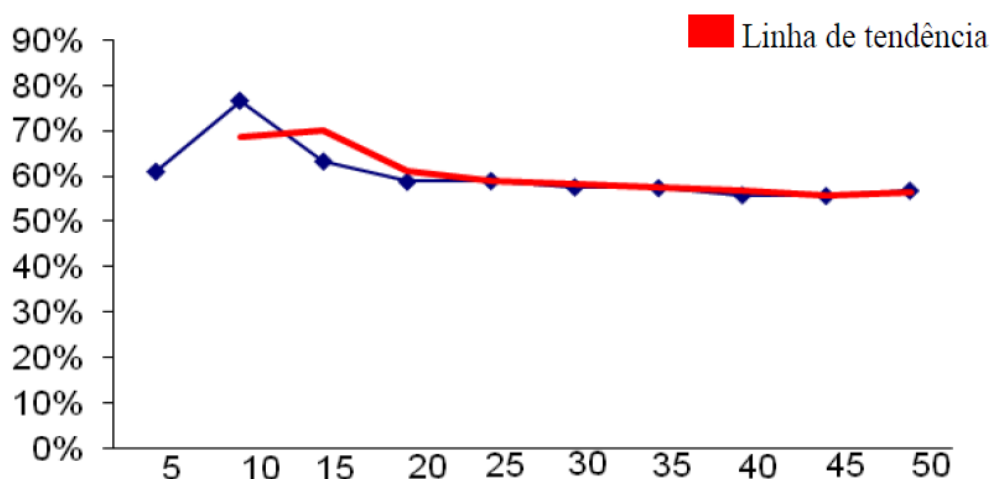


Figura 2: Estimativa do número mínimo representativo de campos para a morfometria da resposta inflamatória e índice apoptótico. Gráfico com coeficiente de variação (y) em função do número mínimo de campos (x). Observar a estabilização do coeficiente de variação a partir de 20 campos histológicos.

3.9. Detecção *in situ* de apoptose: método de *TUNEL* - *TdT*- mediated *DNTP* nick end labeling

Os cortes foram desparafinizados em xilol por 10 minutos e hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico por 5 minutos. Para permitir a penetração do tampão contendo *TdT* e nucleotídeos marcados foi feita a permeabilização com Proteinase K (2mg/mL) diluída em *PBS* na proporção 1:100 durante 20 minutos. Para o bloqueio da peroxidase endógena, utilizou-se o peróxido de hidrogênio (30vol.) diluído

em metanol na proporção de 1:2 durante 30 minutos. Após remoção do excesso da solução ao redor do corte, as lâminas foram cobertas com tampão de equilíbrio por 10 minutos e em seguida incubados em câmara úmida a 37°C com 100µL de tampão de reação (70µL de tampão contendo digoxigenina adicionada a 30µL de enzima *TdT*) durante 1 hora. Após lavagem 3X com *PBS*, os cortes foram cobertos com 100µL de tampão de parada, agitado por 15 segundos e incubados por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados em câmara úmida à temperatura ambiente com 100µL do antidigoxigenina conjugado com peroxidase por 30 minutos. Em seguida, a revelação foi efetuada com DAB+ (*Substrate Chromogen System, DAKO Corporation, Carpinteria, USA*) e a contra coloração com *Methyl Green*, durante 3 minutos, à temperatura ambiente. Após desidratação em álcool etílico absoluto e imersão em xilol, as laminas foram montadas com *Entellan* e posteriormente examinadas em microscópio óptico.

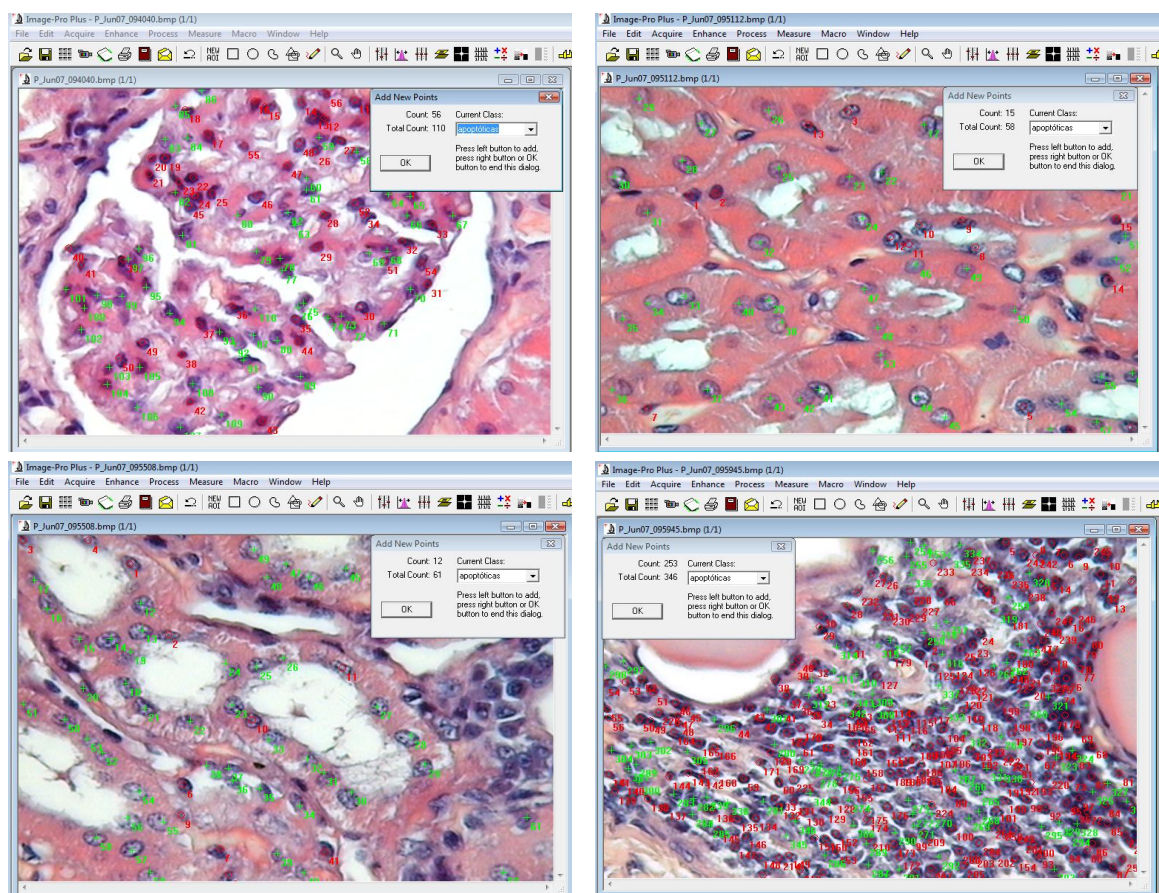


Figura 3: Captura de tela do computador com programa de análise de imagens *Media Cybernetics Image-Pro Plus* versão 4.5, utilizado para cálculo da celularidade e do índice apoptótico do infiltrado inflamatório, do glomérulo e das células epiteliais da região cortical e medular.

3.10. Detecção de caspase 3, caspase 8, Bax e Bcl2 por técnica de Imunohistoquímica

Após a sequência de preparação dos cortes histológicos através da desparafinização, hidratação, bloqueio da peroxidase endógena e desmascaramento antigênico com tampão citrato, estes foram incubados em câmara úmida com 100 µl do anticorpo primário *overnight* à temperatura ambiente. Os cortes foram totalmente cobertos com 100 µl do anticorpo secundário (1 µl/ml) e incubados à 37°C, em câmara úmida, por 30 minutos. Após lavagem, os cortes foram incubados novamente em câmara úmida, à temperatura ambiente, com 100 µl de *streptavidin-POD* (0,5 U/ml) por 30 minutos. Em seguida, a revelação foi efetuada com *DAB+* (*Substrate Chromogen System, DAKO Corporation, Carpinteria, USA, Cat. K3768*) conforme recomendação do fabricante.

3.11. Extração de RNA, Reação de Transcriptase Reversa para obtenção de cDNA e qRT-PCR:

Os fragmentos de rim, colhidos em nitrogênio líquido e armazenados à -80°C foram submetidos à extração de ácido ribonucleico (*RNA*) total, utilizando-se o *Micro Kit RnEasy™* (*Qiagen, Valencia, CA, USA*), de acordo com as instruções do fabricante. O *RNA* total de cada amostra foi dosado utilizando o equipamento “*Nanodrop N1000*” (*Thermo Scientific, Wilmington, USA*). A primeira fita de *cDNA*, foi sintetizada utilizando o kit “*High Capacity cDNA Reverse Transcription kit*” (*PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) de acordo com as recomendações do fabricante. Para isso, adicionou-se em um tubo de 0,2 mL com tampa redonda (“*domed cap*”), 1 µg de *RNA* total presente em um volume final máximo de 10 µL. Posteriormente, foi adicionado 10 µL do mix de transcrição reversa em cada tubo de 0,2 mL contendo *RNA*, e posteriormente, os tubos foram colocados no termociclador *Veriti™ Thermal Cycler* (*PE Applied Biosystems*) nas seguintes condições: 1 ciclo de 10 minutos a 25°C, 1 ciclo de 120 minutos a 37°C, 1 ciclo de 15 segundos a 85°C e 1 ciclo de 5 minutos a 10°C, consecutivamente. Após o término da etapa anterior, os tubos foram retirados do termociclador e armazenados a temperatura de -20°C até o momento da amplificação da etapa de *PCR* em tempo real.

A curva de dissociação dos iniciadores foi realizada no intuito de averiguar a ocorrência de possíveis amplificações inespecíficas. Ao final dos 40 ciclos de *PCR* realizados para amplificação gênica é adicionada uma etapa na qual a temperatura

aumenta gradualmente de 60°C a 95°C, mantendo-se por 15s em cada temperatura, durante o qual é feita a leitura da emissão de fluorescência. Na medida em que os produtos gerados por *PCR* desnaturam com o aumento da temperatura, o sinal fluorescente emitido pelo *SYBR™ Green* é reduzido. O gráfico resultante permite verificar se há um ou mais produtos de *PCR* presentes em cada reação devido a diferenças de T_m entre produtos de *PCR* com diferente número e composição de bases de cada *amplicon*.

O *qPCR* foi realizado em um sistema de detecção de sequência de *ADN ABI Prism 7500* utilizando *SYBR Green PCR Master Mix* (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), com 100 mM de cada iniciador e de *cDNA* diluído a 1:10. Todos os *primers* específicos de citocinas, quimiocinas e proteínas apoptóticas foram utilizadas conforme Del Puerto *et al.* (2010) e Meneses-Sousa *et al.* (2011). Os oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* designados para as reações de *qPCR* foram selecionados com base na análise da sequência genômica descrita no GeneBank, obtida através do programa Blast. As amostras foram incubadas a 95°C durante 10 min e, em seguida, submetidas a 40 ciclos de 95°C durante 15s e 60°C durante 1 min, durante o qual os dados de fluorescência foram recolhidos em duplicata. A quantidade de *RNA* alvo foi normalizada em relação aos controles endógenos, os genes *GAPDH*, *RPS18*, *HPRT*, *RPL1* e β - *actina*. Por fim, cada *qPCR* foi realizado com cinco controles internos que avaliam tanto o potencial de contaminação do *DNA* genômico (sem transcriptase reversa adicionado) como a pureza dos reagentes utilizados (sem *cDNA* da amostra). A especificidade dos produtos da *PCR* foi confirmada pelas curvas de dissociação de pico individuais de cada *amplicon*. Os dados foram expressos de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando o valor médio do ΔCt do grupo de controle endógeno como calibrador (BUSTIN *et al.*, 2009). Após a normalização, os níveis de expressão dos genes no grupo infectado foram considerados regulada para cima ou para baixo em comparação com os níveis de expressão no grupo de controle.

3.12. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (COCHRAN e COX, 1957) desenvolvido na forma de ensaio cego. Os resultados morfométricos obtidos dos diversos campos histológicos foram submetidos ao teste de Lilliefors para verificação de distribuição normal (Gaussiana) e ao Teste de Cochran e Bartlett para verificar a homogeneidade das variâncias (homocedasticidade). Quando os dados

tinham distribuição Gaussiana, procedeu-se à Análise de Variância e à múltipla comparação de Tukey. Para verificar a existência de correlações entre as variáveis utilizou-se o teste de Pearson e para a frequência das variáveis, o teste de Qui-quadrado foi utilizado. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão. Todas as análises foram realizadas no Programa *SAEG* pelo Setor de Estatística do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

4. RESULTADOS

4.1. Diagnóstico e avaliação clínica dos cães com leishmaniose visceral

Todos os cães assintomáticos e sintomáticos foram positivos em *PCR* e em pelo menos um dos dois exames parasitológicos, *imprint* corados pelo Giemsa e cultura, em diferentes órgãos, medula óssea, baço, fígado, pele e linfonodos. Animais controles não infectados tiveram resultados negativos em todos os testes, incluindo *PCR*.

Os anticorpos *anti-Leishmania* foram detectados no soro de todos os animais infectados, com títulos variando de 1:40 a 1: 640 (*IFAT*). Todos os cães eram adultos e mestiços. As principais manifestações clínicas de animais sintomáticos foram linfadenopatia, conjuntivite, hepatoesplenomegalia e onicogribose (Tabela 1). Sete cães sintomáticos tiveram lesões cutâneas como alopecia, pele escamosa seca, seborreia, nariz descoloridos e ulcerações em várias regiões do corpo como nariz, orelha, extremidades e regiões ungueais.

4.2. Descrição das alterações histopatológicas e bioquímicas

Alterações na coloração e consistência do tecido renal, congestão nas áreas corticais e medulares, aderência de cápsula renal e nefrite intersticial caracterizada por diversos pontos esbranquiçados no parênquima renal foram observados apenas em cães sintomáticos.

Aumento nas concentrações séricas da ureia, creatinina e globulina e albuminemia foram observadas em cães sintomáticos. Cães assintomáticos apresentaram apenas valores elevados de ureia e diminuição nos valores séricos de albumina. *Leishmanias* não foram encontradas nas amostras de rim de nenhum cão infectado, sintomáticos ou não, nem por análise histopatológica nem por imunohistoquímica.

Lesões histopatológicas como atrofia tubular, cilindros hialinos presentes em túbulos corticais e medulares, espessamento da cápsula de Bowman e das membranas mesangiais, degeneração hidrópica das células epiteliais e dilatação tubular foram observadas apenas em cães infectados, sintomáticos e assintomáticos (Figura 4A-E). Calcificação dos túbulos renais e vasos dilatados na cápsula foram observados apenas em um animal sintomático (Figura 4F). Todas as lesões renais observadas em cães

infectados variaram em intensidade de mínima à severa. Controles não infectados apresentaram lesões renais de intensidade mínima.

Cortes histopatológicos de todos os cães, infectados e não infectados, mostraram infiltrados inflamatórios. Os cães sintomáticos apresentavam infiltrados multifocais ou difusos, variando de discreto a severos, perivasculars, periglomerulares e peritubulares. Os macrófagos foram as células predominantes, além de linfócitos. Pielonefrite foi observada apenas em cães com sinais clínicos de LV.

A maioria dos cães assintomáticos apresentaram inflamação discreta e focal. Os infiltrados inflamatórios eram perivasculars, periglomerulares, peritubulares e raramente subcapsulares, composto predominantemente de macrófagos e linfócitos. Apenas dois cães controles apresentaram infiltrado inflamatório mínimo, focal, perivascular, periglomerular e peritubular, composto por macrófagos e raros linfócitos.

4.3. Análise morfométrica da resposta inflamatória

A intensidade inflamatória estava diretamente associada com a presença de manifestações clínicas ($p < 0,05$, teste do Qui-quadrado). Cães sintomáticos apresentaram maior área de infiltrados inflamatórios, intermediária nos assintomáticos e menor nos controles. O número de focos inflamatórios, assim como os perímetros e diâmetros extremos em cães infectados foram também maiores do que nos controles ($p < 0,05$; teste de Tukey), tal como é mostrado na Tabela 2.

4.4. Índice apoptótico nas células glomerulares, tubulares e inflamatórias

Nenhuma diferença estatística foi verificada na celularidade glomerular e tubular entre os cães sintomáticos, assintomáticos e controles ($p > 0,05$; teste de Tukey). As células apoptóticas foram quantificadas considerando a presença simultânea de pelo menos três características morfológicas peculiares do processo. A apoptose ocorreu em glomérulos, túbulos e focos inflamatórios de todos os animais por reação de *TUNEL* e imunohistoquímica (Figura 5). Células glomerulares e tubulares (em ambas as regiões corticais e medulares) apresentaram maior índice de apoptose em animais sintomáticos que nos animais controle ($p < 0,05$, teste de Tukey). A apoptose dentro dos infiltrados inflamatórios foi maior em cães sintomáticos, intermediário em assintomáticos e menor nos controles ($p < 0,05$; teste de Tukey), conforme tabela 3. Foi detectada correlação positiva entre celularidade do infiltrado inflamatório e apoptose em glomérulos (0,49),

nos túbulos corticais (0,64), nos túbulos medulares (0,31) e nos focos inflamatórios (0,58).

4.5. Quantificação de AgNORs em células glomerulares e tubulares

AgNORs, aqui considerados como marcadores para a ativação e/ou proliferação de células, foram expressos difusamente em células glomerulares e tubulares em todos os animais infectados, marcação foram mais intensos e mais evidentes nas células tubulares de cães sintomáticos, em comparação com os animais assintomáticos ($p > 0,05$, teste t), como mostrado na tabela 4.

4.6. Análise morfométrica das fibras colágenas

A fibrose intertubular e perivascular estavam intercaladas com focos inflamatórios em ambas as regiões, cortical e medular, nos cães infectados. Perícitos em estreita relação com a membrana basal em pequenos vasos e fibroblastos foram detectados em permeio das fibras colágenas mais espessas dispostas ao redor da adventícia vascular (Figuras 6 e 7). Fibrose intersticial e perivascular estavam diretamente relacionados com a presença de sinais clínicos em cães infectados ($p < 0,05$, teste do Qui-quadrado). Fibrose intersticial mais intensa ocorreu em cães infectados ($p > 0,05$, teste de Tukey). Fibroses perivasculares, medida morfometricamente pela média da área do colágeno, foram mais intensas nos cães sintomáticos do que nos assintomáticos e tiveram medidas mais altas em relação aos cães controle ($p > 0,05$, teste de Tukey) (Figura 8).

4.7. Análise molecular de citocinas e quimiocinas relacionadas a inflamação, apoptose e fibrose

A expressão de *IFN- γ* , *IL-4*, *TNF- α* , *IL-12* e *IL-10* foram reguladas positivamente em cães sintomáticos e negativamente em cães assintomáticos. Além disso, a *IL-4* mostrou expressão mais elevada nos rins de cães sintomáticos que em assintomáticos ($p < 0,05$, teste de Mann Whitney). A expressão de *IL-4* foi diretamente associada com a presença de manifestações clínicas ($p < 0,05$, teste do Qui-quadrado). Não houve diferença na expressão dos níveis de *RNAm de IFN- γ* , *TNF- α* e *IL-2* encontrados em tecidos renais, independentemente da forma clínica. *IL-2* foi regulada negativamente em ambos os grupos estudados (Figura 9). Além disso, foram detectadas fortes correlações positivas entre os níveis de *RNAm da IL-4* no tecido renal com os de

IL-10 ($r = 0,70$), *IL-12* ($r = 0,70$) e *TNF- α* ($r = 0,67$). Além disso, a expressão de *IL-12* foi positivamente associada com *IL-10* ($r = 0,79$). Todas as outras correlações não foram importantes no contexto do presente estudo.

A expressão de *CCL5*, *CCL4*, *MCP-1*, *MCP-2*, *caspase 3*, *caspase 8*, *caspase 9*, *Bax*, *Bcl-2* e *Fas*, moléculas importantes envolvidas na apoptose e no recrutamento de células inflamatórias, foram medidos por *qPCR*. A expressão de *MCP2*, *CCL4*, *Bax*, *Bcl2*, *Caspase 9* e *Fas* foram superiores em cães sintomáticos e negativamente reguladas em cães assintomáticos. Expressão de *MCP1*, *CCL5*, *Caspase 3*, *Caspase 8*, *Caspase8/Caspase3* e *Bax/ Bcl2* foi positivamente regulada nos dois grupos estudados. A razão da expressão entre *Caspase 9/Caspase 3* foi regulada negativamente em ambos os grupos infectados. Expressão de *Caspase 3*, *caspase 8*, *caspase 8/caspase 3* e a razão entre *Bax /Bcl2* foi negativamente regulada nos dois grupos estudados. Além disso, *Bax/Bcl2* e *CCL4* mostraram maior expressão nos tecidos renais de cães sintomáticos, que nos assintomáticos ($p < 0,05$; teste de Mann Whitney) e estava diretamente associada com a presença de manifestações clínicas ($p < 0,05$, teste do Qui-quadrado). Não houve diferenças nos níveis de expressão do *mRNAs* das outras quimiocinas e proteínas (anti ou pró apoptóticas), mensuradas em tecido renal, independentemente da forma clínica estudada (Figuras 10 e 11). Além disso, uma forte correlação positiva entre os níveis de expressão de *mRNA* apoptóticos e quimiocinas no tecido renal são apresentados na Tabela 5. Todas as demais correlações não foram significativas.

A expressão do *mRNA* de *IL-13* e *TGF- β* foi regulada positivamente em cães sintomáticos e negativamente em cães assintomáticos. A razão das expressões de *TNF- α /TGF- β* foi regulada positivamente em cães assintomáticos e negativamente em sintomáticos. Além disso, as expressões de *IL-6*, das razões *IFN- γ /TGF- β* e *IL-12/TGF- β* foram regulados positivamente em ambos os grupos infectados (Figura 12).

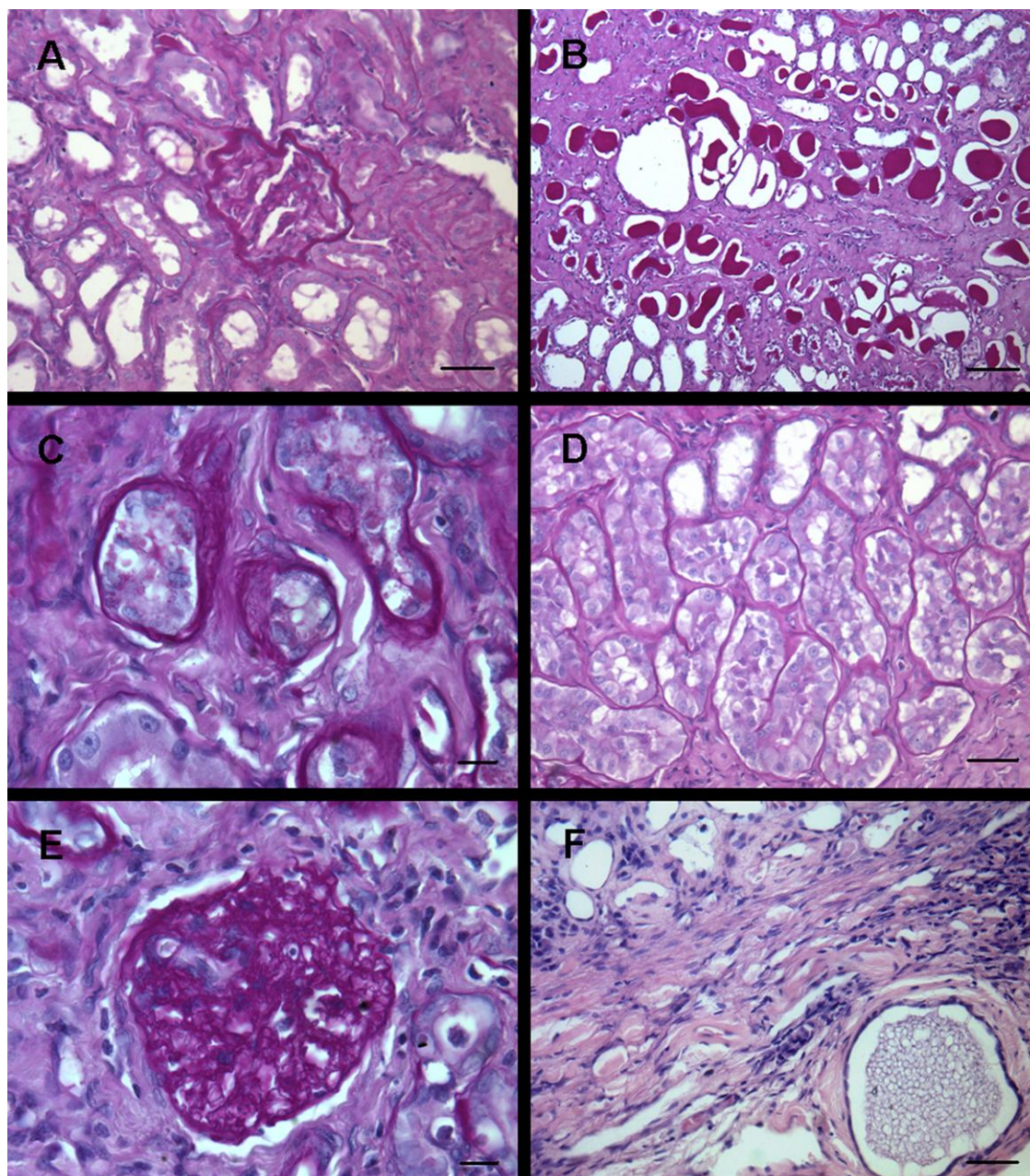


Figura 4: Fotomicrografia de lesões histopatológicas renais de cão sintomático naturalmente infectado com *Leishmania*. **A-** Espessamento da cápsula de Bowman. Barra = 200 μ m. **B-** Cilindros hialinos dentro dos túbulos renais e dilatação tubular. Barra = 100 μ m. **C-** Atrofia tubular. Barra = 20 μ m. **D-** Degeneração das células epiteliais tubulares. Barra = 200 μ m. **E-** Espessamento das membranas mesangiais. PAS. Barra = 20 μ m. **F-** Vaso dilatado. HE. Bar = 100 μ m

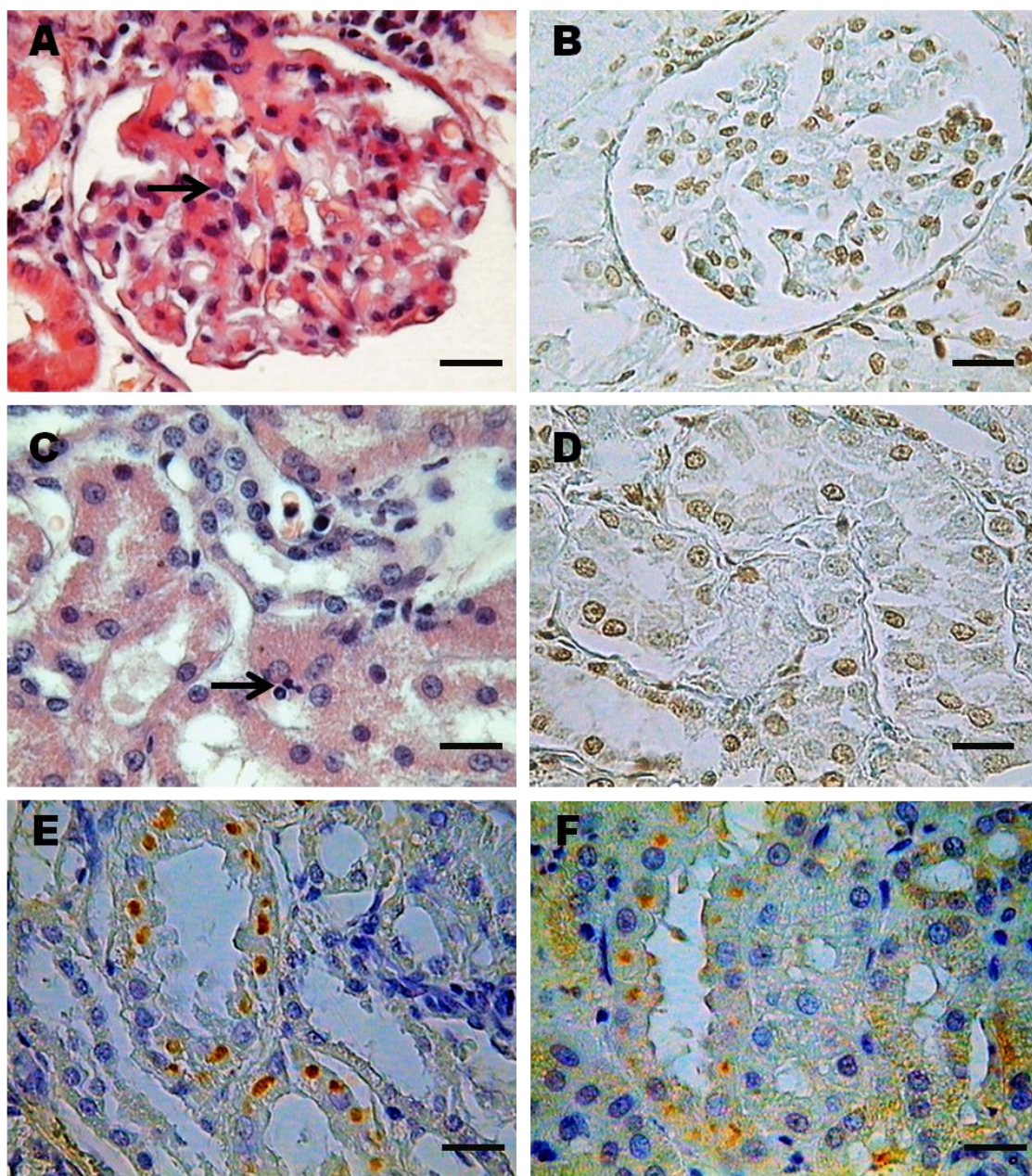


Figura 5: Fotomicrografia de rim em cão sintomático infectado por *Leishmania infantum* mostrando células com características morfológicas (seta) e imunohistoquímica de apoptose em glomérulos (A) e túbulos (C). HE. Aglomerados intranucleares acastanhados confirmados em fragmentação *in situ* do DNA genômico por reação de *TUNEL* (B e D) e por imunohistoquímica para *Bax* (E) e *Bcl-2* (F). Imunoperoxidase, Barra = 32 μ m.

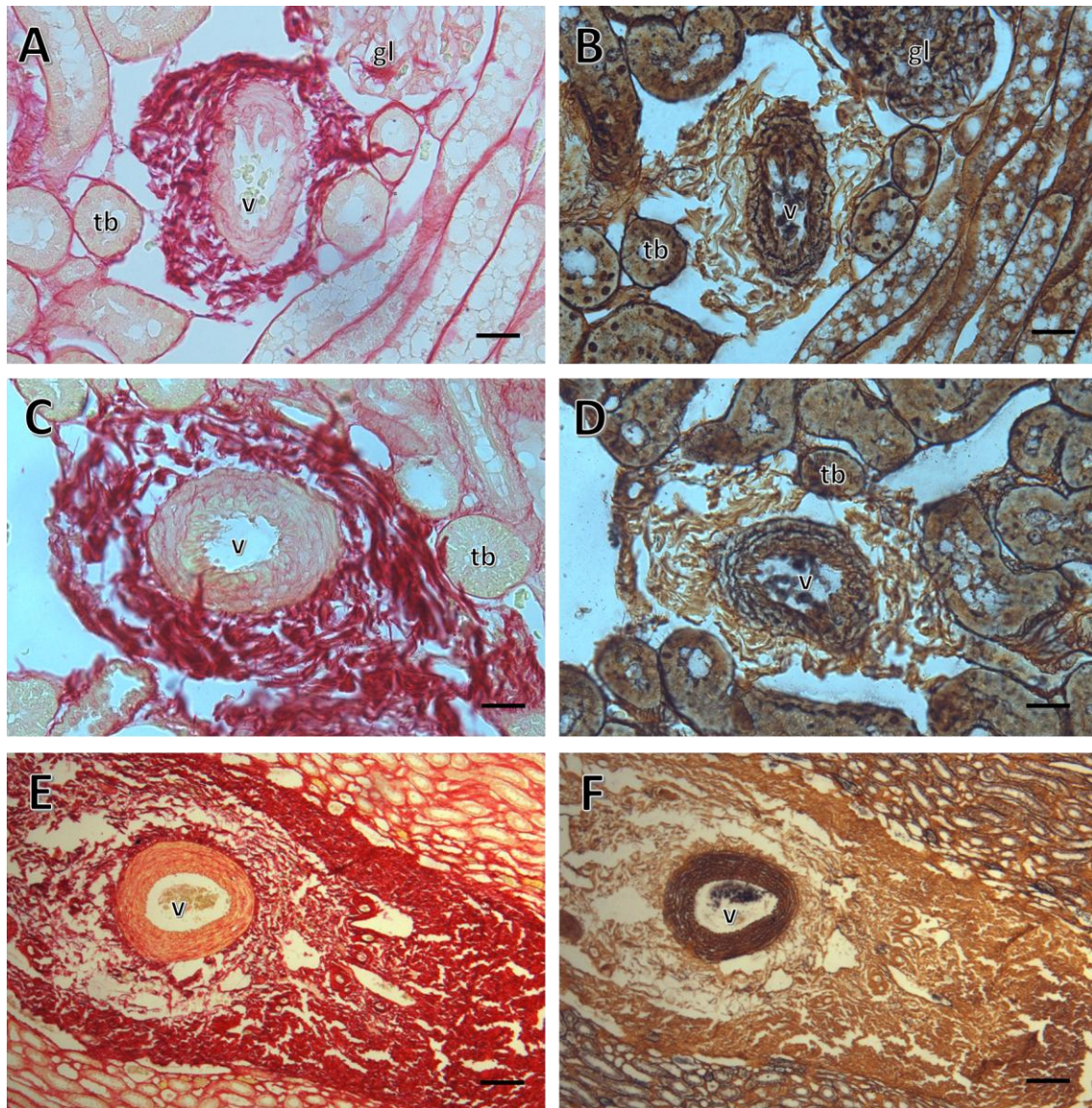


Figura 6: Fotomicrografia da fibrose perivascular renal em cães infectados e não infectados por *Leishmania infantum*. Picrosirius (A, C e E) e reticulina de Gomori (B, D e F). v = vaso, gl = glomérulo, tb = túbulos. Barra = 50 μ m (A a D) e 100 μ m (E e F).

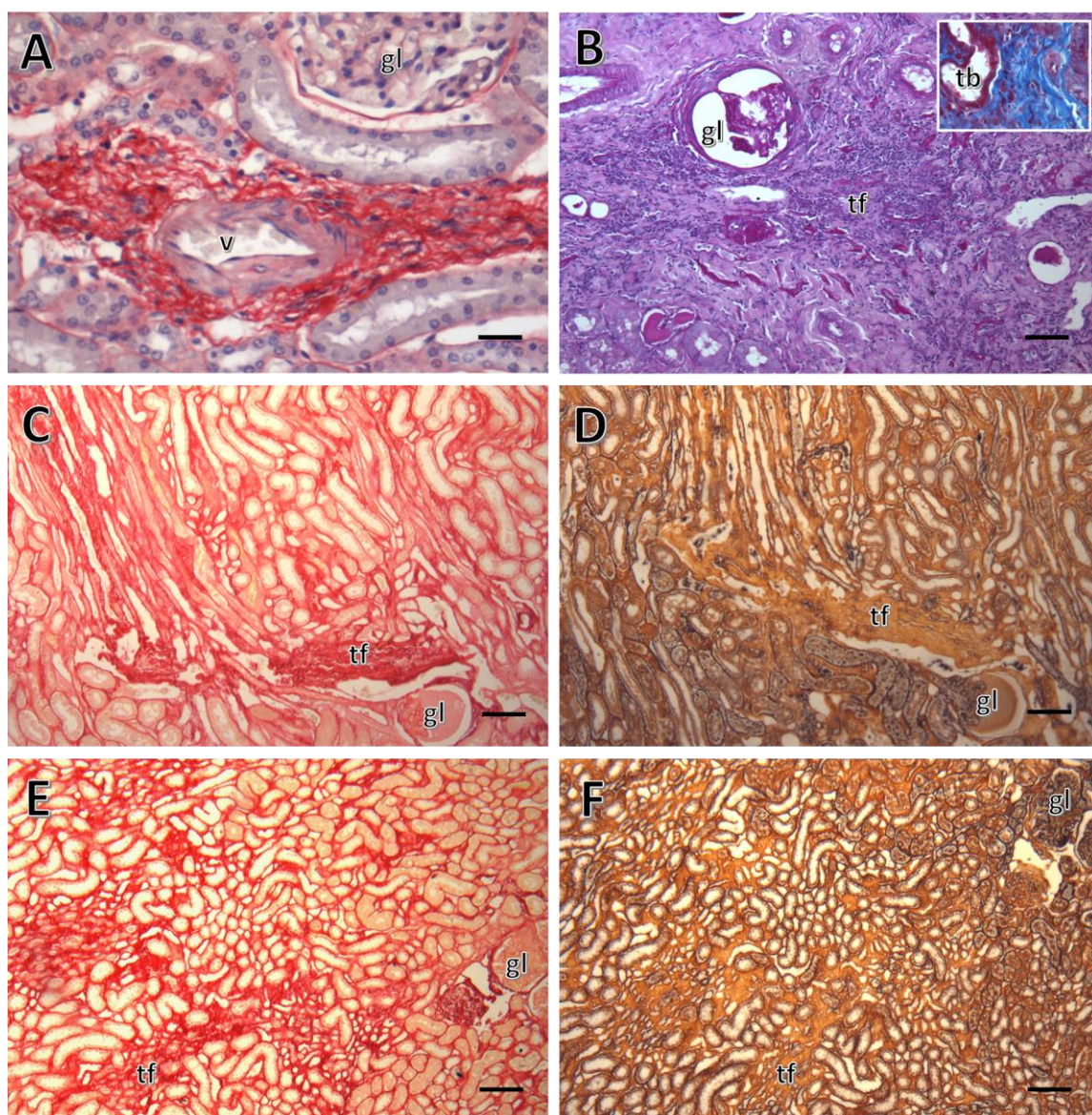


Figura 7: Fotomicrografia de fibrose perivascular renal em cães infectados por *Leishmania infantum*, sintomáticos e assintomáticos. O colágeno perivascular intercaladas com células na região cortical. Picrosirius. Barra = 25 μm (A). Infiltrados inflamatórios difusos e severos, com fibrose intertubular, cilindros hialinos e atrofia/dilatação tubular. PAS. Observar no detalhe acima e a direita, fibrose intertubular corada em azul pelo Tricrômico de Masson (B). Fibrose intersticial observada em cães assintomáticos (C e D) e em sintomáticos (E e F). Picrosirius (C e E) e Reticulina de Gomori (D e F). v = vaso, gl = glomérulo, tb = túbulos, tf = fibrose intertubular. Barra = 100 μm .

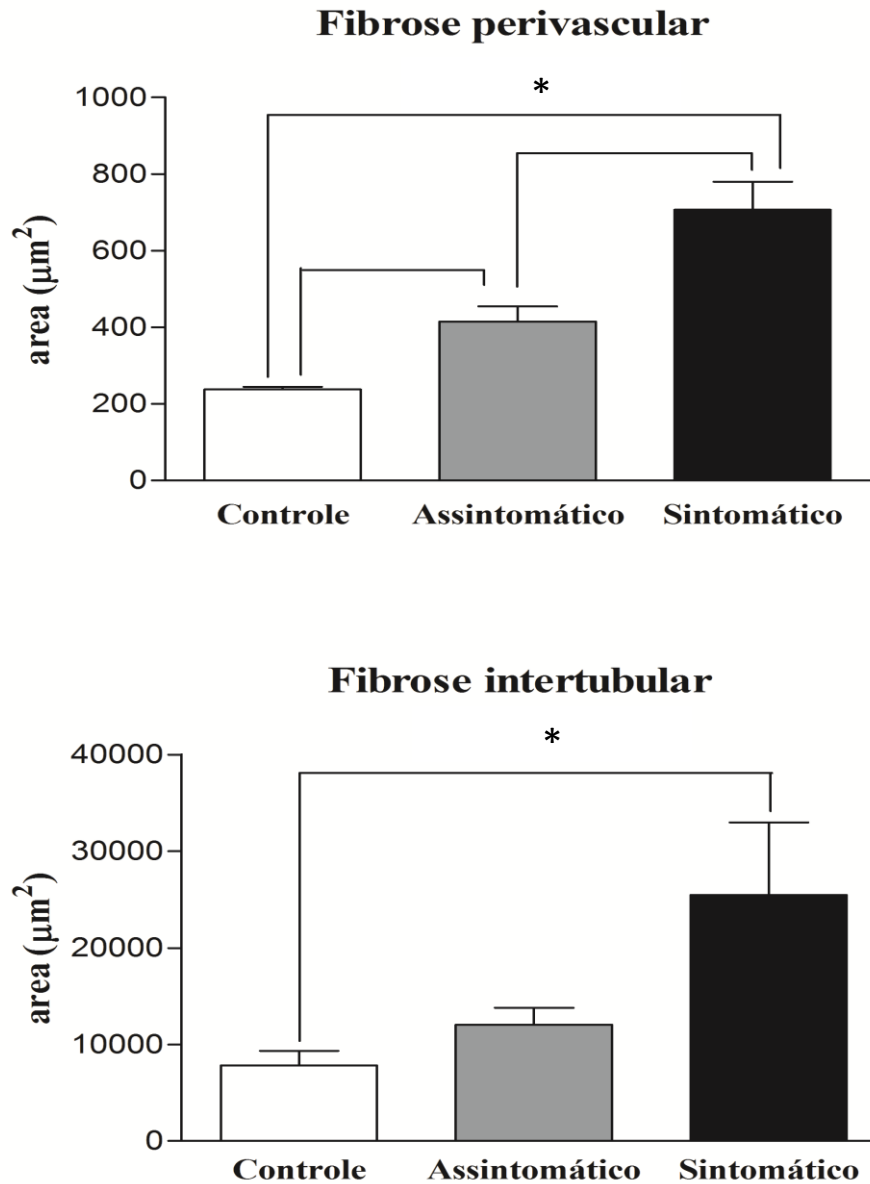


Figura 8: Histomorfometria da fibrose intertubular e perivascular em rins de cães infectados e controles não infectados com *Leishmania infantum*. Fibrose perivascular foi mínima nos cães controles não infectados (n = 6), intermediária nos assintomáticos (n = 8), e intensa nos sintomáticos (n = 8). Fibrose intertubular foi superior nos sintomáticos, comparados aos controles. (Teste de Tukey, * p < 0,05).

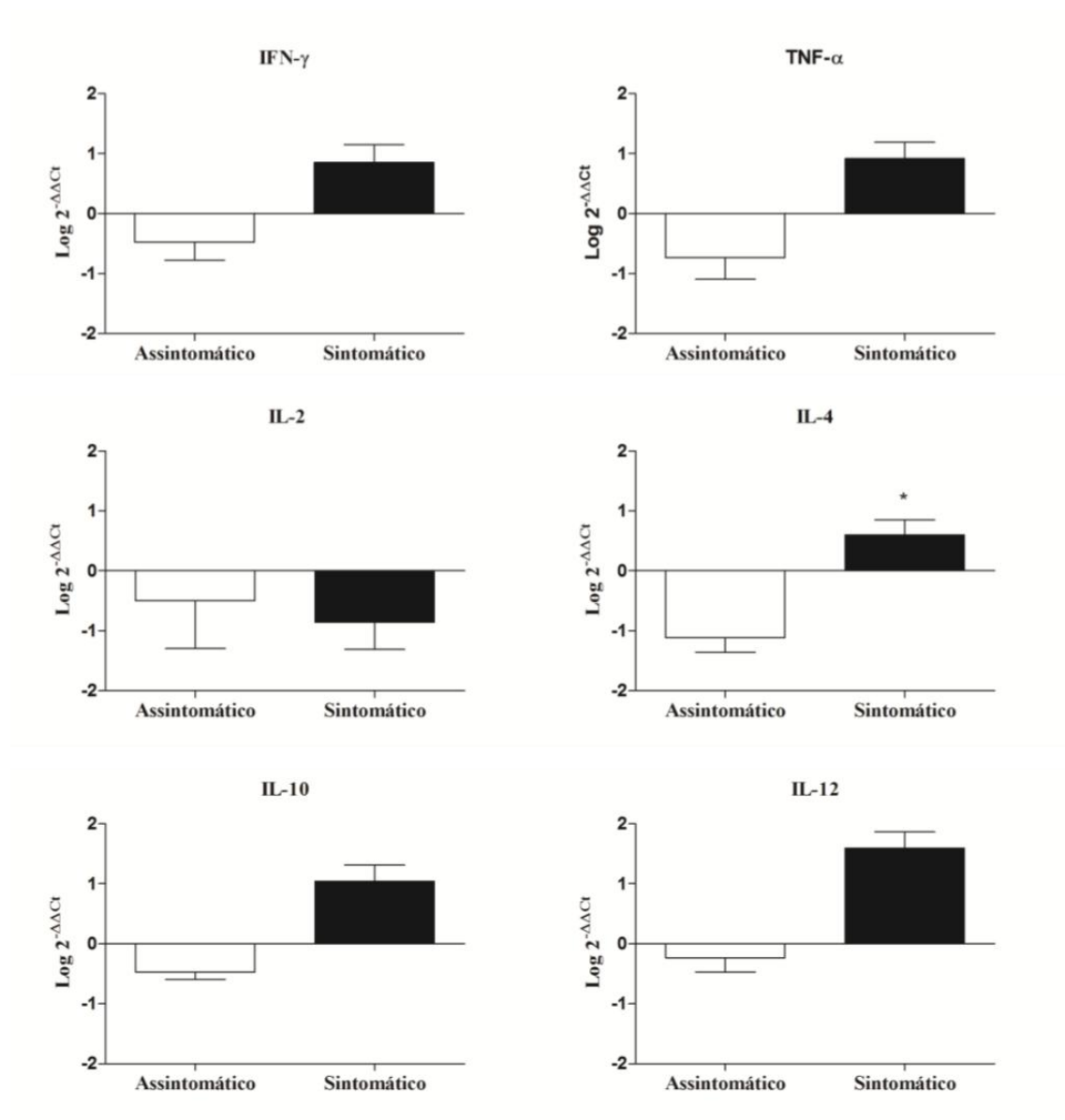


Figura 9: Níveis de expressão de *mRNA* das citocinas inflamatórias em rins de cães infectados com *Leishmania infantum*, com ou sem sinais clínicos. Cães sintomáticos (n = 8) e assintomáticos (n = 8) (teste de Mann-Whitney, * p < 0,05).

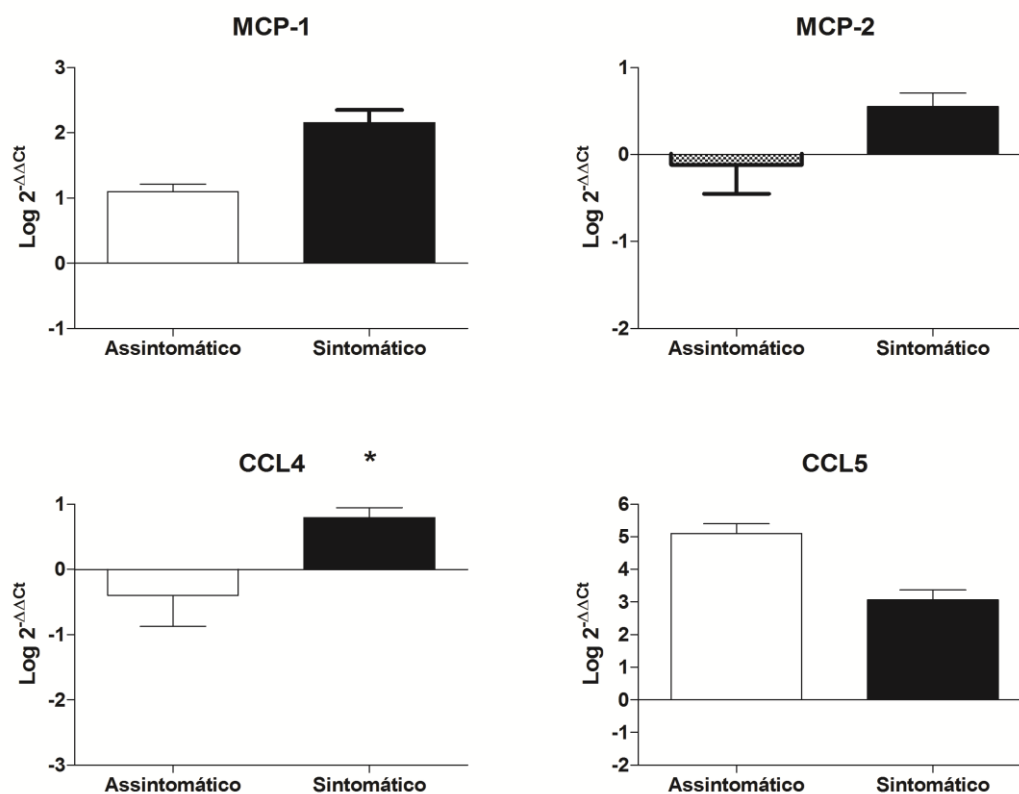


Figura 10: Níveis de expressão de *mRNA* de quimiocinas inflamatórias em rins de cães infectados com *Leishmania infantum*, com ou sem sinais clínicos. Cães sintomáticos (n = 8) e assintomáticos (n = 8) (teste de Mann-Whitney, * p <0,05).

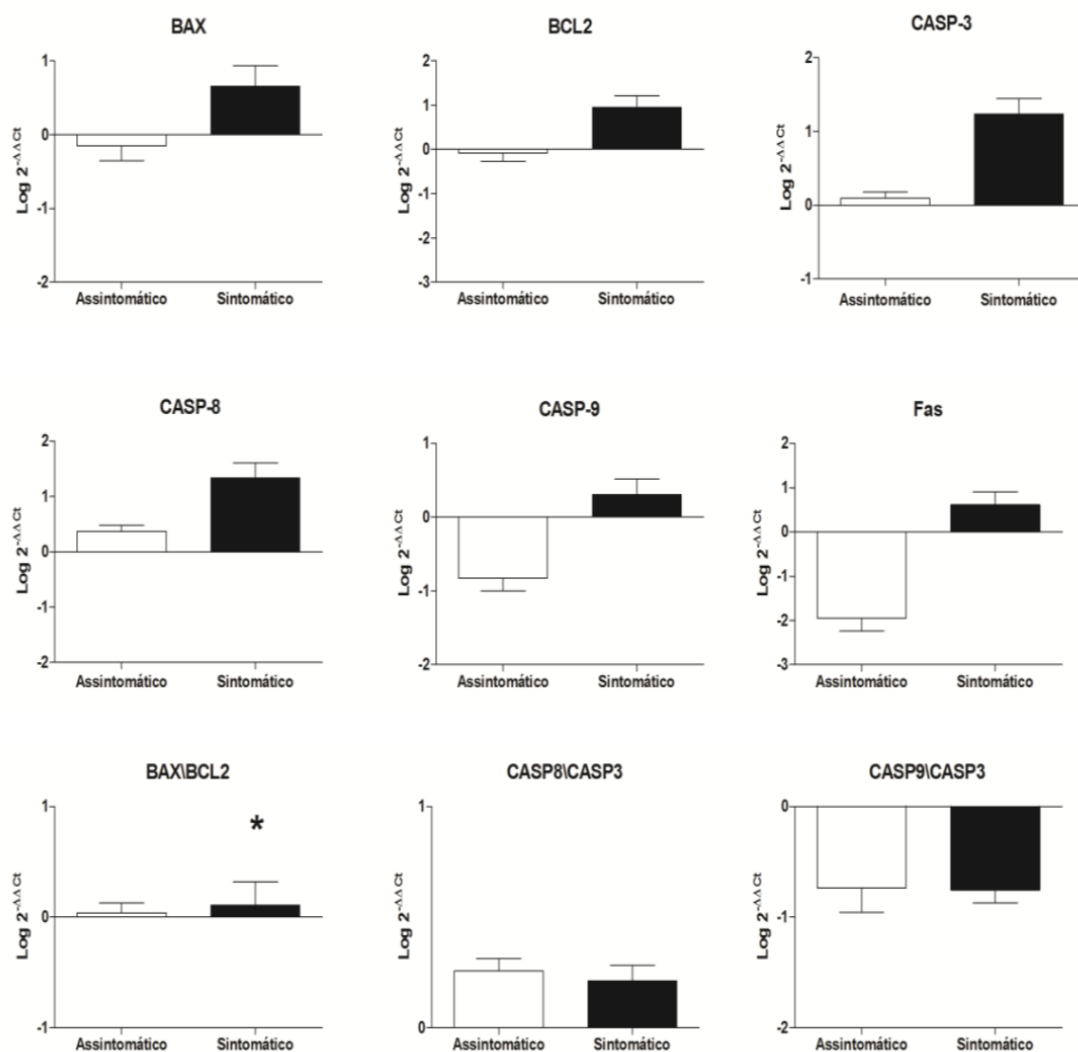


Figura 11: Níveis de expressão de *mRNA* das proteínas relacionadas a apoptose em rins de cães infectados com *Leishmania infantum*, com ou sem sinais clínicos. Cães sintomáticos (n = 8) e assintomáticos (n = 8) (teste de Mann-Whitney, * p < 0,05).

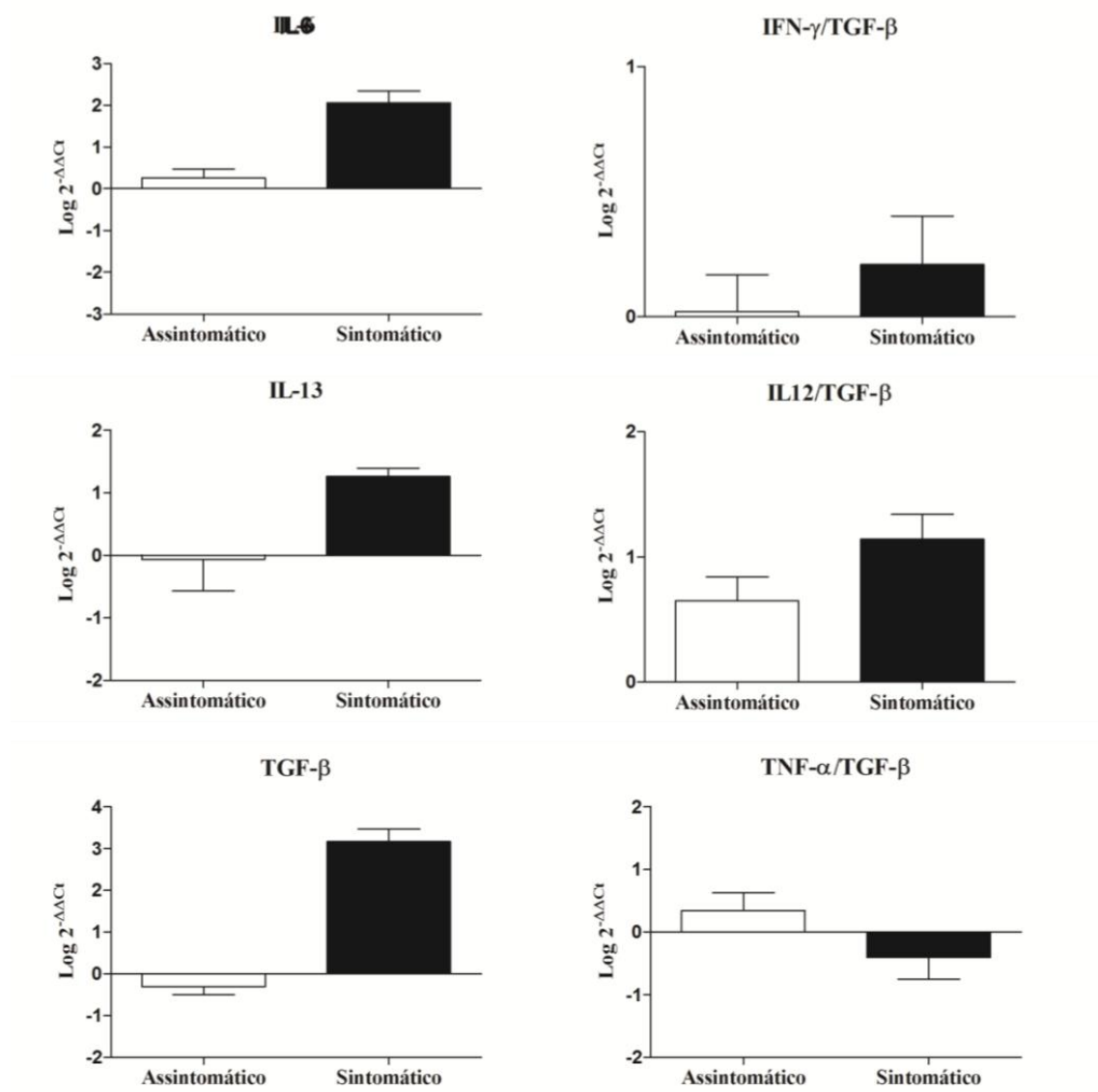


Figura 12: Níveis de expressão de *mRNA* das citocinas relacionadas a fibrose em rins de cães infectados com *Leishmania infantum*, com ou sem sinais clínicos. Cães sintomáticos (n = 8) e assintomáticos (n = 8) (teste de Mann-Whitney, * p <0,05).

Tabela 1: Sumário das principais manifestações clínicas em cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* (sintomáticos e assintomáticos).

ANIMAIS	SEXO	GRUPOS	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS				
			Linfadenopatia	Conjuntivite	Onicogribose	Hepatoesplenomegalia	Febre
01	F	Sintomático	+	-	+	+	+
02	F	Sintomático	+	+	-	+	-
03	F	Sintomático	+	-	+	+	-
04	M	Sintomático	-	+	-	-	-
05	M	Sintomático	+	+	-	-	-
06	F	Sintomático	-	-	-	+	-
07	F	Sintomático	+	+	+	-	-
08	M	Sintomático	+	+	+	-	+
09	F	Assintomático	-	-	-	-	-
10	M	Assintomático	-	-	-	-	-
11	F	Assintomático	-	-	-	-	-
12	F	Assintomático	-	-	-	-	-
13	F	Assintomático	-	-	-	-	-
14	M	Assintomático	-	-	-	-	-
15	F	Assintomático	-	-	-	-	-
16	F	Assintomático	-	-	-	-	-

Tabela 2: Parâmetros histomorfométricos do infiltrado inflamatório renal de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* (sintomáticos e assintomáticos) e não infectados (controles).

PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS DA INFLAMAÇÃO*					
GRUPOS	Número de focos	Área (μm^2)	Perímetro (μm)	Diâmetro menor (μm)	Diâmetro maior (μm)
Sintomáticos (N= 8)	338.00 $\pm$ 45.50 ^a	318.64 $\pm$ 34.55 ^a	81.91 $\pm$ 7.60 ^a	14.07 $\pm$ 0.89 ^a	27.69 $\pm$ 1.91 ^a
Assintomático (N= 8)	240.12 $\pm$ 21.80 ^a	187.84 $\pm$ 15.42 ^b	64.46 $\pm$ 3.33 ^a	12.26 $\pm$ 1.03 ^b	22.82 $\pm$ 0.91 ^a
Controle (N= 7)	42.00 $\pm$ 2.58 ^b	80.01 $\pm$ 1.53 ^c	43.38 $\pm$ 0.89 ^b	8.49 $\pm$ 0.07 ^c	16.59 $\pm$ 0.41 ^b

* Letras diferentes na mesma coluna indicam valores que são significativamente diferentes entre os grupos (sintomáticos, assintomáticos e controles) para cada parâmetro histomorfométrico. Teste de Tukey (p <0,05). Média $\pm$ erro padrão.

Tabela 3: Índice apoptótico nos glomérulos, nos túbulos (córtex e medula) e no infiltrado inflamatório renal de cães naturalmente infectados (sintomáticos e assintomáticos) e não-infectados (controles) pela *Leishmania infantum*.

GRUPOS	APOPTOSIS*			
	Glomérulo	Túbulos		Infiltrado inflamatório
		Cortical	Medular	
Sintomáticos (N= 8)	42.04 ± 3.90 ^a	20.86 ± 2.73 ^a	29.57 ± 3.61 ^a	49.30 ± 3.43 ^a
Assintomático (N= 8)	33.49 ± 3.46 ^{ab}	17.49 ± 1.13 ^{ab}	23.33 ± 2.86 ^{ab}	38.47 ± 1.72 ^b
Controle (N= 7)	23.89 ± 2.15 ^b	12.22 ± 0.93 ^b	17.90 ± 1.87 ^b	26.22 ± 1.34 ^c

* Letras diferentes na mesma coluna indicam valores que são significativamente diferentes entre os grupos (sintomáticos, assintomáticos e controles) para cada parâmetro histomorfométrico. Teste de Tukey (p <0,05). Média ± erro padrão.

Tabela 4: Expressão de AgNOR no glomérulo e túbulos renais, região cortical e medular, em cães naturalmente infectados com *L. infantum*, sintomáticos e assintomáticos.

GRUPOS	EXPRESSÃO DE AgNOR *		
	Glomérulo	Túbulos renais	
		Cortical	Medular
Sintomáticos (N= 8)	2,15 ± 0,044a	2,35 ± 0,032 ^a	2,31 ± 0,07a
Assintomático (N= 8)	2,00 ± 0,13a	2,06 ± 0,089b	1,98 ± 0,11b

* Letras diferentes na mesma coluna indicam valores que são significativamente diferentes entre os grupos (sintomáticos, assintomáticos e controles) para cada parâmetro histomorfométrico. Teste de Tukey (p <0,05). Média ± erro padrão.

Tabela 5: Correlação entre os parâmetros morfométricos relacionados com a apoptose e a resposta inflamatória em cães, sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com *Leishmania infantum* e controles

INFLAMACÃO	APOPTOSE			
	Glomérulo	Túbulos renais (cortical)	Túbulos renais (medular)	Células inflamatórias
Número de focos	0,75	0,53	0,52	0,78
Área	0,52	0,71	0,39	0,67
Perímetro	0,47	0,69	ns	0,73
Diâmetro menor	0,50	0,69	ns	0,77
Diâmetro maior	0,47	0,71	ns	0,70
Celularidade	0,49	0,64	0,31	0,58

Teste de Pearson ($p < 0,05$). A classificação quanto a intensidade da correlação foi estabelecida conforme. ns- não significativo.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, a infecção por *L. infantum* foi confirmada por testes sorológicos, parasitológicos e moleculares, usando soros, *imprints* e fragmentos de várias vísceras, incluindo baço, fígado, linfonodo e medula óssea vermelha. Curiosamente, nem amastigotas nem seus antígenos foram detectados por imunohistoquímica em amostras de rim em nenhum dos cães infectados. Estes resultados também foram descritos por Costa *et al.* (2002) e Costa *et al.* (2010), onde a inflamação renal na LV não está diretamente associada com a infecção tecidual, mas com mecanismos imunológicos secundários. A glomerulonefrite é frequentemente encontrada em muitas doenças caninas (CAMARGO *et al.*, 2006). No entanto, exames clínicos e anatomopatológicos não constatarem manifestações sugestivas de outras doenças. Assim, todas as lesões renais neste estudo foram consideradas como causadas por *L. infantum*. Além disso, tais lesões não se resumiam a glomerulonefrite e nefrite intersticial, mas havia também cilindros hialinos e degeneração hidrópica, assim como apoptose, fibrose renal e atrofia tubular. Tais lesões, ocorrendo em conjunto ou isoladamente, podem indicar disfunção renal em cães com LV (BANETH *et al.*, 2008).

As manifestações clínicas mais frequentes nos animais sintomáticos do presente estudo foram linfadenopatia, conjuntivite, hepatoesplenomegalia e onicogrifose, que também foram observadas por Almeida *et al.*, (2005). O diagnóstico clínico da LV canina em área endêmica é muito difícil, porque os sintomas podem variar e muitas vezes coincidir com outros encontrados em diferentes doenças (GRADONI, 2002; BRYDEN *et al.*, 2005). Essa é a razão do uso de diferentes abordagens para detectar a infecção - sorologia, parasitologia e molecular. Embora os sinais clínicos não possam, por si só, determinar o diagnóstico, os resultados do presente estudo indicam que os rins de cães sintomáticos apresentam lesões mais intensas, tanto inflamatórias como fibróticas. Somente cães infectados apresentaram alterações bioquímicas séricas. A proteinúria tem um papel importante na iniciação da inflamação tubulointersticial. Reabsorção excessiva de albumina pelas células dos túbulos proximais estimulam a liberação de quimiocinas pró-inflamatórias (PETERSON *et al.*, 1995).

A inflamação, tal como um mecanismo de defesa do hospedeiro contra infecções parasitárias, desempenha um papel importante na resolução ou a progressão da infecção. Assim, o infiltrado inflamatório modula a relação parasita-hospedeiro.

Cortes histopatológicos dos rins em todos cães infectados mostraram infiltrados inflamatórios. Os macrófagos foram as células predominantes nos infiltrados inflamatórios de cães sintomáticos e assintomáticos. Quando presentes em rins de controle, a inflamação foi mínima, escassa e inespecífica. A presença de infiltrados inflamatórios nesses cães foi atribuída ao fato de que os controles eram provenientes da rua, capturados como parte de um programa de controle da LV e raiva urbana. Embora não tenha sido possível ter um conhecimento prévio das condições de saúde e nutricionais destes cães em estudo, não se podem descartar outras infecções concomitantes à LV. No entanto, o exame clínico e autópsia não mostraram evidências de outras doenças, o que sugere que os focos inflamatórios esparsos encontrados em rins de cães controles possam ser considerados inespecíficos.

A presença do DNA de *Leishmania* foi essencial para associar infecções e lesões glomerulares ou intertubulares em cães sintomáticos e assintomáticos. Em cães controles, a técnica de PCR foi utilizada para eliminar resultados falsos negativos. Nestes casos, a técnica de PCR é indispensável para mostrar a ausência de um contato entre o animal e parasita (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001).

Dependendo do estímulo, do estado de ativação e dos receptores envolvidos, a resposta dos macrófagos pode ter um perfil anti-inflamatório ou pró-inflamatória. Além disso, a exacerbação de respostas anti-inflamatórias ou pro-inflamatórias vai determinar o êxito ou fracasso da infecção por *Leishmania sp* (KRYSKO *et al.*, 2006). Neste estudo, a morfometria revelou que os infiltrados inflamatórios foram encontrados em todos os animais, mas eram mais intensos e evidentes em animais sintomáticos e estavam diretamente relacionados com a presença de manifestações clínicas, como descrito por outros autores (COSTA *et al.*, 2004; VERÇOSA *et al.*, 2008; VERÇOSA *et al.*, 2011).

Parasitas como a *Leishmania infantum* possuem a capacidade de modificar os perfis de citocinas de seus hospedeiros, facilitando deste modo o estabelecimento da infecção (RACOOSIN e BEVERLEY, 1997; RITTER e KORNER, 2002; ANTONIAZI *et al.*, 2004). Cães assintomáticos expressam níveis mais elevados de mRNAs de IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF- α e têm uma menor carga parasitária nos gânglios linfáticos pré escapulares, sangue periférico e pele (CHAMIZO *et al.*, 2005; ALVES *et al.*, 2009; MENEZES-SOUSA *et al.*, 2011). Em contraste, cães susceptíveis desenvolvem uma resposta imune adaptativa inclinada para o perfil Th2, com a super regulação da

produção de mRNA de *IL-4* e *IL-10*, que é correlacionada com uma elevada carga parasitária (ALVES *et al.*, 2009).

Neste estudo, *IFN- γ* , *TNF- α* , *IL-4*, *IL-12* e *IL-10* foram regulados positivamente em cães sintomáticos e regulados negativamente em animais assintomáticos, sugerindo que tais moléculas podem ser utilizadas como marcadores inflamatórios em rins de cães sintomáticos com LV. *IL-4* foi mais expressa em cães sintomáticos, em comparação com os animais assintomáticos e estava diretamente associado com manifestações clínicas. *IL-2* foi regulada negativamente nos grupos infectados e não parece suportar um diferencial papel no desenvolvimento de sinais clínicos. Enquanto que os níveis de *IL-4* podem ser um fator de prognóstico para a progressão da LV por possuírem um papel fundamental na resolução de infecção hepática por *Leishmania donovani* (STAGER *et al.*, 2003). A resposta imune em LV é compartimentada (REIS *et al.*, 2009).

A imunidade à infecção com agentes patogênicos intracelulares é regulada por *IL-12*, que medeia as respostas do tipo *Th1*, ou por *IL-4*, que induz os linfócitos *Th2* e a susceptibilidade a infecção (SCOTT *et al.*, 1988; CORRÊA *et al.*, 2007). *IL-12* tem um papel central na iniciação e manutenção da resposta do tipo *Th1*, sendo importante na indução da produção de *IFN- γ* por linfócitos T e NK em humanos (KOBAYASHI *et al.*, 1989; CHAN *et al.*, 1991; MANETTI *et al.*, 1993).

Uma correlação forte foi detectada entre a *IL-4* com o *IL-10*, *IL-12* e *TNF- α* sugerindo que a produção de *IL-4* resulta na resposta inflamatória esperada contra o parasita. Por outro lado, a elevada produção de *IL-4* pode refletir na modulação da inflamação pelo hospedeiro na tentativa de controlar a resposta exacerbada provocada pelo parasita. Além disso, a expressão de mRNA de *IL-10* foi associada positivamente com a *IL-12*. A *IL-4* tem um papel adicional na regulação negativa da expressão de quimiocinas associada com o recrutamento de linfócitos *Th1* para tecidos inflamados. A produção aumentada de *IL-4* resulta na diminuição da expressão gênica de quimiocinas associadas a resposta do tipo *Th1*. Assim, a produção de *IL-4* em tecidos inflamados amplifica a diferenciação de células do tipo *Th2*, em parte, através da regulação negativa do recrutamento de células com perfil *Th1*. Isto poderia ser potencialmente benéfico para o parasita através do recrutamento de células hospedeiras. Algumas espécies de *Leishmania* devido, em parte, a sua virulência, aumentam a capacidade de inibir a indução de citocinas pró-inflamatórias e genes de quimiocinas, tornando a sua entrada menos detectável para o hospedeiro (MATTE *et al.*, 2002; Ji *et al.*, 2003). Um

certo número de agentes patogênicos, tais como *Francisella tularensis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii* e *Leishmania* podem provocar o aumento da concentração de *IL-4*, citocina com efeitos reguladores, no local da infecção afim de limitar o recrutamento de células hospedeiras do tipo *Th1*, com características antimicrobianas (ROOK, 2005; KAHNERT *et al.*, 2006; ROOK, 2007; DENARDO *et al.*, 2009). Os nossos resultados mostram que em consequência de níveis elevados de *IL-4* no microambiente cronicamente inflamado, houve uma diminuição na expressão de citocinas e quimiocinas afim de reduzir o recrutamento e a ativação de células com perfil *Th1*. Esse dado também já descrito durante a infecção crônica por *Mycobacterium tuberculosis* (ROOK, 2007) e durante o estado de co-infecção (LA FLAMME *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2005; ROOK, 2005; KAHNERT *et al.*, 2006; ROOK, 2007; KHAN *et al.*, 2008; RAFI *et al.*, 2012).

A apoptose ocorreu nos glomérulos, túbulos e células inflamatórias em todos os animais. Cães sintomáticos mostraram um índice apoptótico em células glomerulares e tubulares mais elevado em relação aos animais controles. A hiper celularidade na glomerulonefrite pode ser associada com a proliferação celular. A infiltração de leucócitos e a ativação de macrófagos intersticiais desempenham um papel central na resposta inflamatória renal (CHEVALIER, 2006). Por conseguinte, a manutenção da hiper celularidade renal na LV canina parece mais provável que seja devido a um recrutamento ativo de células inflamatórias do que pela inibição da apoptose em células mesangiais ou tubulares. A perda descontrolada por apoptose de células renais residentes é prejudicial, uma vez que pode provocar uma redução da massa renal funcional e levar à insuficiência renal. No entanto, a apoptose é considerada essencial para assegurar o volume adequado e recuperação glomerular original e estruturas tubulares quando um processo inflamatório está presente (LI *et al.*, 2004; POLYCARPE *et al.*, 2004; KIM e DANG, 2005). Assim, a apoptose deve ser examinada como um possível mecanismo pelo qual células mesangiais, tubulares e inflamatórias são removidas (ORTIZ *et al.*, 2000)

Danos nos tecidos pode levar à liberação de espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-apoptóticas. Macrófagos intersticiais produzem citocinas e fatores de crescimento que promovem inflamação renal e induzem a apoptose das células epiteliais tubulares renais (MISSER e MELDRUM, 2005; CHEVALIER, 2006). No entanto, o mecanismo de perda de células epiteliais permanece incerto, mas é concebível que a atrofia tubular resulte essencialmente da morte celular por apoptose em condições

patológicas (TIAN e PHILLIPS, 2002; GUH *et al.*, 2003). Thomas *et al.*, (1998) relataram um aumento progressivo da apoptose em células glomerulares, nos túbulos e no interstício renal de ratos, especialmente na área esclerosadas com glomérulos e túbulos atrofiados.

Assim, a apoptose de células renais pode contribuir para a progressão de atrofia tubular e, também, para a fibrose renal crônica. Em nosso estudo, os animais sintomáticos com reação inflamatória mais grave e lesões renais mais intensas apresentaram maior apoptose em células glomerulares, tubulares e inflamatórias. O aumento da apoptose do parênquima, em glomérulos e túbulos, pode refletir danos colaterais relacionados com a inflamação (DUFFIELD *et al.*, 2000; MISSERI *et al.*, 2005). O efeito das espécies reativas de oxigênio ou do fator de necrose tumoral (*TNF- α*) não se limita apenas aos agentes patogênicos, mas também promove a paralização do ciclo celular ou induz a apoptose em células epiteliais e endoteliais (LENDÁ *et al.*, 2003). Muitos tipos de doenças renais são desprovidos de infecção ou necrose de células renais e o microambiente intra-renal é caracterizado pela apoptose de células renais (ANDERS e RYU, 2001).

A resposta inflamatória tem a função de inativar e destruir agentes perigosos particularmente de origem infecciosa, através da produção e liberação de compostos oxidantes, como óxido nítrico e metabólitos de oxigênio. No entanto, os radicais de oxigênio também podem danificar o tecido durante a inflamação. O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de substância oxidante e as defesas antioxidantes do organismo (PEAKE e SUZUKI, 2004). O papel de substâncias oxidantes foi também estudado na patogenia de LV canina e outras doenças (EREL *et al.*, 1997; OLIVEIRA e CECHINNI 2000; BILDIK *et al.*, 2004; HEIDARPOUR *et al.*, 2012.). Quando o aumento do metabolismo oxidativo excede a capacidade antioxidante da célula provoca o estresse oxidativo, desencadeando a apoptose (CENDOROGLO *et al.*, 1999). Nestes casos, o estresse oxidativo pode estar associado com a ativação de caspases (CURTIN *et al.*, 2002). Em nossos resultados, obtivemos uma maior expressão de mRNA de caspase 3, 8 e 9 nos animais infectados com *Leishmania infantum*. O estresse oxidativo foi também correlacionado com uremia (JONHSON-DAVIS *et al.*, 2011), uma condição comum em fase final da leishmaniose visceral (COSTA *et al.*, 2003).

Nossos resultados demonstram que a apoptose ocorreu no parênquima e dentro de focos inflamatórios em cães sintomáticos e assintomáticos. Esteve associada com a

inflamação ativa nos rins de cães sintomáticos. A apoptose dentro dos infiltrados inflamatórios foi maior em cães sintomáticos, intermediário em assintomáticos e menor nos controles. A apoptose é um mecanismo regulado de eliminação de células (KERR, 1993), que participa na evolução das lesões desencadeadas por vários microrganismos, incluindo *Leishmania* (DAS *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2002). Ela participa ativamente na modulação da resposta inflamatória (WEINRAUCH e ZYCHLINSKY, 1999; CARRERO *et al.*, 2004).

A resolução da inflamação é caracterizada por um grande número de células em apoptose nos locais inflamatórios (FADOK *et al.*, 1998; HUYNH *et al.*, 2002; MADERNA e GODSON, 2003; EDA *et al.*, 2004). Por outro lado, tanto as quimiocinas inflamatórias quanto as proteínas pró apoptóticas foram reguladas positivamente nos cães sintomáticos, que também mostraram maior celularidade dentro de focos inflamatórios. Assim, nesse trabalho, *Bax/Bcl2* e *CCL4* tiveram maior expressão nos tecidos renais de cães sintomáticos, em comparação com assintomáticos e foram diretamente associadas com a presença de manifestações clínicas. Tais resultados indicam que o aumento da apoptose nas células inflamatórias não pode ser considerado como uma prova de resolução da inflamação no rim de cães infectados por *Leishmania*, uma vez que não estava associada a nenhuma diminuição na celularidade dos focos inflamatórios. Neutrófilos têm o tempo de vida mais curto entre os leucócitos e quando extravasados morrem por necrose ou apoptose dentro do foco inflamatório (PILLAY *et al.*, 2010). Portanto, esses resultados apontam para um aumento da renovação celular dentro do foco inflamatório, o que envolve um complexo equilíbrio entre o recrutamento celular e apoptose (MILOT e FILEP, 2011), uma vez que, houve um aumento da celularidade inflamatória, do índice apoptótico de células inflamatórias associado a uma elevada expressão de *mRNA* de quimiocinas.

Nossos resultados mostram uma forte correlação positiva entre a expressão de quimiocinas, celularidade e apoptose, o que apoia esta inferência. Neste contexto, ela pode ser interpretada como resultado da senescência de células inflamatórias recrutadas e também agir como um marcador de atividade inflamatória, e não necessariamente como um evento de resolução. Assim, a apoptose não é, sempre e apenas, correlacionada com a resolução da inflamação, quando histomorfometria e avaliação molecular são realizados concomitantemente. Portanto, a apoptose também ocorre na inflamação ativa, equilibrando o recrutamento inflamatório, como consequência da curta vida útil de alguns leucócitos.

Nesse trabalho, a fibrose intersticial e perivascular mais intensa ocorreu em cães sintomáticos. A resposta inflamatória intersticial é caracterizada inicialmente por macrófagos (CHEVALIER, 2006), que remodelam a matriz extracelular pela secreção de metaloproteinases (RONCO e CHATZIANTONIOU, 2008). Estes miofibroblastos são formados pela proliferação de fibroblastos residentes e por um processo complexo pelo qual algumas células epiteliais tubulares adquirem fenótipo mesenquimal (IWANO *et al.*, 2002, GRANDE e LOPEZ-NOVOA, 2009). Após a lesão tecidual, fibroblastos contrácteis diferenciam-se em miofibroblastos secretores que contribuem para a reparação de tecidos, mas que pode prejudicar gravemente a função do órgão quando a produção das proteínas e a contração da matriz extracelular tornam-se excessivas (TOMASEK *et al.*, 2002; HINZ *et al.*, 2007).

Além dos miofibroblastos, os perícitos, células em estreita relação com a membrana basal de pequenos vasos, também foram identificados nas preparações histológicas do presente estudo. Eles são células de origem mesenquimal, estão intimamente envolvidas no desenvolvimento, maturação, estabilização e na remodelação vascular durante a angiogênese e a homeostase. Lin *et al.* (2008) identificou que os perícitos estão intimamente associados com a vascularização normal no córtex e medula renal. No entanto, em resposta a uma lesão, esses perícitos rapidamente migram dos vasos para o espaço intersticial e regulam a produção de colágeno e a expressão de actina de músculo liso- α (α -SMA), aumentando o número de miofibroblastos (HINZ *et al.*, 2001). Assim, os perícitos podem atuar como precursores para miofibroblastos. A lesão vascular e outros fatores vasculares podem desencadear a migração de perícitos e sua diferenciação em miofibroblastos (SHEN *et al.*, 2006). Portanto, nossos resultados servem para reorientar a fibrose renal como uma consequência eventual de mecanismos imunopatológicos, envolvendo muito mais os próprios vasos e o estroma, em detrimento à lesão parenquimatosa.

Células apresentando anoiquia e hipercromasia nuclear, indicando apoptose, e atrofia tubular foram observadas apenas nos túbulos de cães infectados. A apoptose nas células tubulares podem contribuir para a patogenia da fibrose intersticial renal (GUH *et al.* 2003; TIAN *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2004). Macrófagos intersticiais com perfil anti-inflamatório, miofibroblastos e células tubulares renais lesionadas produzem citocinas e fatores de crescimento, como a *IL-13* e *TGF- β* , induzindo a apoptose das células tubulares e o acúmulo de matriz extracelular no

interstício (CHEVALIER, 2006, MISSER e MELDRUM, 2005). Assim, a fibrose intersticial, resultante, ocorre progressivamente.

Considerando a importância da compartimentalização na resposta imune na LV canina (Reis *et al.*, 2009), a compreensão do perfil imunológico no rim durante o curso da infecção é um pré-requisito para identificar os mecanismos de resistência ou susceptibilidade. Neste estudo, as expressões de mRNA da *IL-4*, *IL-13* e *TGF-β* foram maiores em sintomáticos que em assintomáticos, enquanto que o da *IL-6* estava super expressa em ambos os grupos infectados. O *TGF-β* é um fator de crescimento chave envolvido na fibrose (LIU, 2004) e está relacionado com a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (FINE e GOLDSTEIN, 1987; SPRUGEL *et al.*, 1987; BATTEGAY *et al.*, 1990; SPORN e ROBERTS, 1993), além de *IL-4*, *IL-6* e *IL-13* (CHIARAMONTE *et al.*, 1999; FALLON *et al.* 2000). A produção destes fatores de crescimento é aumentada no local da fibrose (NATHAN e SPORN, 1991; BORDER e NOBLE, 1994; MARTINET *et al.* 1987). A *IL-6* induz a proliferação de fibroblastos e a produção de colágeno (DUNCAN, e BERMAN, 1991; GREENWEL *et al.*, 1995), bem como a síntese de inibidor tecidual da metaloproteinase-1 (LOTZ e GUERNE, 1991). Por outro lado, a *IL-4* inibe a ativação de macrófagos, suprime a expressão de *TNF-α* e *IL-6*, e pode induzir funções anti-inflamatórias dos macrófagos na inflamação crônica e fibrose (GORDON e MARTINEZ, 2010; BISWAS e MANTOVANI, 2010; MURRAY e WYNN, 2011). A *IL-13* é um mediador indispensável da fibrose (CHIARAMONTE *et al.* 1999. FALLON *et al.*, 2000). *IL-13* e *TGF-β* podem ambos se ligarem a fibroblastos e estimularem a deposição de colágeno (CHIARAMONTE *et al.*, 1999, ORIENTE *et al.* 2000, CHIARAMONTE *et al.*, 2001). Assim, em algumas circunstâncias, a *IL-13* e o *TGF-β*, podem atuar conjuntamente ou isoladamente nas células alvo e ativar a fibroplasia (LEE *et al.*, 2001).

As expressões de *IL-13* e *TGF-β* estavam reguladas positivamente em cães sintomáticos, estando claramente associadas à fibrose renal intensa, suportada por achados morfológicos e morfométricos. A razão *TNF-α* /*TGF-β* foi regulada negativamente em cães sintomáticos, caracterizando uma resposta Th2. Já nos assintomáticos foi regulada positivamente. A *IL-13* é indutora e ativadora de *TGF-β* (LEE *et al.*, 2001), explicando a remodelação da matriz e a fibrose que acompanha a polarização de citocinas do tipo *Th-2* em infecções crônicas (ZHU *et al.*, 1999; BLEASE *et al.*, 2001; HASEGAWA *et al.*, 1997; CHIARAMONTE, *et al.*, 1999;

FALLON et al 2000). Nossos resultados sugerem que a fibrose renal é mediada por *IL-13* e é também estritamente dependente de *TGF-β*. Assim, a clivagem e ativação de *TGF-β* pode ser inadequada, se citocinas de *Th2*, como a *IL-4*, estão implicadas na remodelação tecidual (ELIAS *et al.*, 2003; MONTESANO *et al.*, 1999). A *IL-4* e a *IL-13* podem induzir a diferenciação de fibroblastos e fibrócitos residentes em miofibroblastos em uma variedade de tecidos (MATTEY *et al.*, 1997; SALMON-EHR *et al.*, 1996, DOUCET *et al.*, 1998; HASHIMOTO *et al.*, 2001; SAITO *et al.*, 2003). Por outro lado, diferenças sutis nos mecanismos que controlam a fibrose podem ocorrer em tecidos diferentes. Os nossos estudos enfocaram a fibrose renal, então, é possível que vias distintas sejam responsáveis pela fibroplasia em outros órgãos.

A relação entre *TGF-β* e *IL-13*, na fibrose renal da LV canina ainda não tinha sido investigada. Considerando que muitas terapias anti-fibróticas estão embasadas na inibição de *TGF-β* (GAMBARO *et al.*, 2001; CHEN e WAHL, 1999; GIRI *et al.*, 1993), é ainda importante determinar se a indução de colágeno mediada por *IL-13* ocorre em ação conjunta com o *TGF-β* ou se a *IL-13* pode apresentar sozinha uma atividade profibrótica direta. Tais respostas são importantes em doenças como a LV, onde respostas do tipo *Th2* persistem, porque elas podem ter grande impacto tanto na concepção quanto no benefício a longo prazo das futuras intervenções clínicas baseadas em interromper a via de sinalização do *TGF-β*.

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados confirmam que:

- ✓ A inflamação renal na LV não está associada com a presença de infecção tecidual, uma vez que formas amastigotas de *Leishmania* não foram detectados nestas lesões;
- ✓ Existe uma associação entre a intensidade da lesão inflamatória renal com as manifestações clínicas;
- ✓ A *IL-4* é uma molécula importante envolvida na lesão renal em cães sintomáticos com LV;
- ✓ A apoptose ocorre em células epiteliais tubulares renais, glomerulares e inflamatórias na leishmaniose visceral canina.
- ✓ A apoptose não está sempre e apenas correlacionada com a resolução da inflamação. Pode também ocorrer na inflamação ainda ativa, contrabalanceando o recrutamento inflamatório, como consequência da curta vida útil de alguns leucócitos.
- ✓ A fibrose renal é consequência de mecanismos imunopatológicos e parece localizar-se mais perivascular e intertubular do que periglomerular.
- ✓ Apesar das lesões parenquimatosas renais, envolvendo proteinúria e formação de cilindros hialinos com atrofia tubular, a reação do estroma parece ser mais evidente do que a do epitélio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; MURPHY, K.M.; SHER. A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v. 383, p. 787, 1996.

ABRANCHES, P.; CAMPINO, L.; SANTOS GOMES, G. M. Leishmaniose canina: novos conceitos de epidemiologia, imunopatologia e seus reflexos no controle da leishmaniose visceral humana. **Acta Médica Portuguesa**, v. 11, p. 871-75, 1998.

AFONSO, L.; BORGES, V.M.; CRUZ, H.; RIBEIRO-GOMES, F.L.; DOSREIS, G.A.; DUTRA, N.A.; CLARÊNCIO, J.; OLIVEIRA, C.I.; BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M.; BRODSKYN, C.I. Interactions with apoptotic but not necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **Journal of Leukocytes Biology**, v.8, p.389-96, 2008.

AGA, E.; KATSCHINSKI, D.M.; VAN ZANDBERGEN, G.; LAUFS, H.; HANSEN, B.; MULLER, K.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophils granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **Journal of Immunology**, v.169, p. 898-05, 2002.

AKARID, K.; ARNOULT, D.; MICRO-POLIANSKI, J.; SIF, J.; ESTAQUIER, J.; AMEISEN, J.C. *Leishmania major*-mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c. **Journal of Leukocytes Biology**, v.76, p.95-103, 2004.

ALBANIS, E., SAFADI, R., FRIEDMAN, S. L. Treatment of hepatic fibrosis: almost there. **Current Gastroenterology Review**. 5, 48, 2003.

ALMEIDA, M.A.O.; JESUS, E.E.V.; SOUSA-ATTA, M.L.B.; ALVES, L.C.; BERNE, M.E.A.; ATTA, A.M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 227-232, 2005.

ALVES, C.F.; DE AMORIM, I.F.; MOURA, E.P.; RIBEIRO, R.R.; MICHALICK, M.S.; MICHALICK, M.S.; KALAPOTHAKIS, E.; BRUNA-ROMERO, O.; TAFURI,

W.L.; TEIXEIRA, M.M.; MELO, M.N. Expression of IFN-gamma, *TNF-alpha*, *IL-10* and *TGF-beta* in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, p.349–358, 2009.

AMEISEN, J.C. Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. **Cell Death and Differentiation**, v.2, p. 285-300, 2002.

ANDERS, H.J.; RYU, M. Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. **Kidney International**, v. 80, p.915–925, 2011.

ANDREEVA, E.R.; PUGACH, I.M.; GORDON, D.; OREKHOV, A.N. Continuous sub-endothelial network formed by pericyte-like cells in human vascular bed. **Tissue Cell**. v. 30, p. 127–135, 1998.

ANTONIAZI, S.; PRICE, H.P.; KROPF, P.; FREUDENBERG, M.A.; GALANOS, C.; SMITH, D.F.; MÜLLER, I. Chemokine gene expression in toll-like receptor-competent and -deficient mice infected with *Leishmania major*. **Infective Immunology**, v.72, p. 5168–5174, 2004.

ARANY, I.; FAISAL, A.; NAGAMINE, Y.; SAFIRSTEIN, R.L. p66shc inhibits pro-survival epidermal growth factor receptor/ERK signaling during severe oxidative stress in mouse renal proximal tubule cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.283, p.6110-6117, 2008.

ARORA, S.; HERNANDEZ, Y.; ERB-DOWNWARD, J.R.; MCDONALD, R.A.; TOEWS, G.B.; HUFFNAGLE, G.B. Role of *IFN-gamma* in regulating *Th2* immunity and the development of alternatively activated macrophages during allergic bronchopulmonary mycosis. **Journal of Immunology**, v.174, p.6346–6356, 2005.

ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, v.14, p.523-32, 1996.

ATTISANO, L.; WRANA, J.L. Signal transduction by members of the transforming growth factor-beta superfamily, **Cytokine and Growth Factor Review.**, v.7, p.327–339, 1996.

BADARÓ, R.; JONES, T. C.; LOURENÇO, R.; CERF, B. J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON JR, W. D. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Journal of Infected Diseases**, v. 154, p. 639-49, 1986.

BANETH, G.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine Leishmaniasis — new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v.24, p.324–330, 2008.

BATTEGAY, E. J.; RAINES, E. W.; SEIFERT, R. A.; BOWEN-POPE, D. F.; ROSS, R. *TGF- β* induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. **Cell**, v.63, p.515–524, 1990.

BENIGNI, A.; REMUZZI, G. How renal cytokines and growth factors contribute to renal disease progression, **American Journal Kidney Diseases**, v.37 (Suppl 2), p.S21–S24, 2001.

BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M. Canine Leishmaniasis: Identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.55, p. 273-77, 1996.

BETTINI, S.; GRANDONI, L. Canine leishmaniasis in the mediterranean area and its implications for human leishmaniasis. **Insect Science and its Application**, v.7, p. 241, 1986.

BIEDERMANN, T.; ZIMMERMANN, S.; HIMMELRICH, H.; GUMY, A.; EGETER, O.; SAKRAUSKI, A.K.; SEEGMÜLLER, I.; VOIGT, H.; LAUNOIS, P.; LEVINE, A.D.; WAGNER, H.; HEEG, K.; LOUIS, J.A.; RÖCKEN, M. *IL-4* instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice- **Nature Immunology**, v.2, p.1054 – 1060, 2001.

BILDIK, A.; KARGIN, F.; SEYREK, K.; PASA, S.; OZENSOY, S. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidant status in dogs with visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v.77, p.63-66, 2004.

BISWAS, S.K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nature Immunology**, v.11, p.889–896, 2010.

BITTENCOURT, A. L.; BARRAL-NETTO, M. Leishmaniasis. In: Doerr W, Seifert G. **Tropical Pathology** (2nd edn). Springer, Berlin Heidelberg. New York. p. 597-651, 1995.

BLEASE, K.; JAKUBZICK, C.; WESTWICK, J.; LUKACS, N.; KUNKEL, S.L.; HOGABOAM, C.M. Therapeutic effect of *IL-13* immunoneutralization during chronic experimental fungal asthma. **Journal of Immunology**, v.166, p.5219, 2001.

BORDER, W. A.; NOBLE, N. A. Transforming growth factor b in tissue fibrosis. **The New England Journal of Medicine**, v.331, p.1286–1292, 1994.

BORDER, W.A.; NOBLE, N.A. TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy. **Kidney International**, v.51, p.1388–1396, 1997.

BOUCHER, A., DROZ, D., ADAFER, E., NOËL, L.H. Characterization of mononuclear cell subsets in renal cellular interstitial infiltrates. **Kidney International** v.29, p.1043-1049, 1986.

BOURDOISEAU, G.; MARCHAL, T.; MAGNOL, J.P. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin in lymph nodes. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.9, p. 439-40, 1997.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, p.59, 2013.

(http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf)

BROMLEY, S.K.; MEMPEL, T.R.; LUSTER, A.D. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. **Nature Immunology**, v.9, p.970–980, 2008

BRYDEN, S.L.; WHITE, S.D.; DUNSTON, S.M.; BURROWS, A.K.; OLIVRY, T. Clinical, histopathological and immunological characteristics of exfoliative cutaneous lupus erythematosus in 25 German short-haired pointers. **Veterinary Dermatology**, v. 16, p.239-52, 2005.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEW, C.T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v.55, p.611-622, 2009.

BYRNE, A.; REEN, D.J. Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. **Journal of Immunology**, v. 168, p. 1968-1977, 2002.

CABRAL, M.; O'GRADY, J.; ALEXANDER, J. Demonstration of leishmania specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. **Parasite Immunology**, v. 14, p. 531-38, 1992.

CAMARGO, B.M.H.; MORAES, J.R.E.; CARVALHO, M.B.; FERRARO, G.C.; BORGES, V.P. Alterações morfológicas e funcionais dos rins de cães com insuficiência renal crônica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.781-787, 2006.

CAMPINO, C.; ABRANCHES, P. Cutaneous leishmaniasis. Unusual disease in Portugal? **Acta Medica Portuguesa**, v. 15, p. 387-390, 2002.

CAPELLI, G.; BALDELLI, R.; FERROGLIO, E.; GENCHI, C.; GRANDONI, L.; GRAMICCIA, M.; MAROLI, M.; MONTARINO, M.; PIETROBELLI, M.; ROSSI, L.;

RUGGIERO, M. Monitoring of canine leishmaniasis in Northern Italy: an update from a scientific network. **Parasitology**, v.46, p.193-197, 2004.

CARMEN, J. C.; SINAI, A. P. Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites. **Molecular Microbiology**, v.64, n.4, p.904-16, 2007.

CARRERO, J. A.; CALDERON, B.; UNANUE, E. R. Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduce resistances to *Listeria* infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 200, p. 535-40, 2004.

CAZULLO, J.J.; STOKA, V.; TURK, V. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoa parasite *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.378, p. 1-10, 1997.

CENDOROGLO, M.; JABER, B.L.; BALAKRISHNAN, V.S.; PERIANAYAGAM, M.; KING, A.J.; PEREIRA, B.J. Neutrophil apoptosis and dysfunction in uremia. **Journal of American Society of Nephrology**, v.10, p.93-100, 1999.

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.

CHAN, S.H.; PERUSSIA, B.; GUPTA, J.W.; KOBAYASHI, M.; POSPÍSIL, M. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. **Journal of Experimental Medicine**, v.173, p.869–879, 1991.

CHEEVER, A.W.; WILLIAMS, M.E.; WYNN, T.A.; FINKELMAN, F.D.; SEDER, R.A.; COX, T.M.; HIENY, S.; CASPAR, P.; SHER, A. Anti-*IL-4* treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of *T* cells and non-*B*, non-*T* cells expressing *Th2* cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. **Journal of Immunology**, v.153, p.753–759, 1994.

CHEN, C.C.; LOUIE, S.; MCCORMICK, B.; WALKER, W.A.; SHI, H.N. Concurrent infection with an intestinal helminth parasite impairs host resistance to enteric

Citrobacter rodentium and enhances *Citrobacter*-induced colitis in mice. **Infection and Immunity**, v.73, p.5468–5481, 2005.

CHEN, L.; WATANABE T.; WATANABE, W.; SENDO, F. Neutrophil depletion exacerbates experimental Chagas disease in BALB/c, but protect C57BL/6 mice through modulating the *Th1/Th2* dichotomy in different directions. **European Journal of Immunology**, v. 31, p. 265-75, 2001.

CHEN, W.; WAHL, S.M. Manipulation of *TGF- β* to control autoimmune and chronic inflammatory diseases. **Microbes and Infection**, v.1, p.1367, 1999.

CHEVALIER, R.L. Pathogenesis of renal injury in obstructive uropathies. **Current Opinion in Pediatrics**, v.18, p.153-160, 2006.

CHIARAMONTE, M.G.; DONALDSON, D.D.; CHEEVER, A.W.; WYNN, T.A. An *IL-13* inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. **Journal of Clinical Investigation**, v.104, p.777, 1999.

CHIARAMONTE, M.G., CHEEVER, A.W., MALLEY, J.D., DONALDSON, D.D., WYNN, T.A. Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. **Hepatology**, v.34, p.273, 2001.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine Leishmaniasis: Clinical and Diagnostic Aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.26, p.359-367, 2003.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LURA, P.D.; GRADONI, L.; AMBROSIO, L.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHIO. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. The **Veterinary Record**, v.141, p. 539-43, 1997.

COCHRAN, W. G.; COX, G. M: **Experimental Designs**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1957, 611p.

COHEN, P.L.; CARICCHIO, R.; ABRAHAM, V. Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase. **Journal of Experimental Medicine**, v. 196, p. 135-40, 2002.

CONCEICAO-SILVA, F.; HAHNE, M.; SCHROTER, M.; LOUIS, J.; TSCHOPP, J. The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional *Fas* (*APO-1*, *CD95*) pathway of cytotoxicity. **European Journal of Immunology**, v. 28, n.1, p. 237-45, 1998.

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

COSMA, C.L.; SHERMAN, D.R.; RAMAKRISHNAN, L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. **The Annual Review of Microbiology**, v.57, p.641–676, 2003.

COSTA, F.A.L.; GOTO, H.; SALDANHA, L.C.B.; SILVA, S.M.M.S.; SINHORINI, I.L.; SILVA, T.C.; GUERRA, J.L. Histopathology Patterns of Nephropathy in Naturally Acquired Canine Visceral Leishmaniasis. **Veterinary Pathology**, v.40, p.677-84, 2003.

COSTA, F.A.L.; GUERRA, J.L.; SILVA, S.M.M.S.; KLEIN, R.P.; MENDONÇA, I.L.; GOTO, H. *CD4+* T cells participate in the nephropathy in canine visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p.1455-1458, 2000.

COSTA, F.A.L.; PRIANTI, M.G.; SILVA, T.C.; SILVA, S.M.; GUERRA, J.L.; GOTO, H. T cells, adhesion molecules and modulation of apoptosis in visceral leishmaniasis glomerulonephritis. **BMC Infected Diseases**, v.10, p.112-124, 2010.

COUSER, W.G.; JOHNSON, R.J. Mechanisms of progressive renal disease in glomerulonephritis: the ultrastructure of human tubulo-interstitial fibrosis. **American Journal of Kidney Diseases**, v.23, p.193–198, 1994.

CROCKER, J.; BOLDY, D.A.R.; EGAN, J. How should we count *AgNORs*? Proposals for a standardized approach. **Journal of Pathology**, v.158, p.185-188, 1989.

CUNHA, A.M.; CHAGA, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania infantum*, n. sp. Nota Prévia. **O Hospital (Rio de Janeiro)**, v. 11, p. 3-9, 1937.

CURTIN, J.F.; DONOVAN M.; COTTER T.G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **Journal of Immunology Methods**, v.265, p.49-72, 2002.

CVETANOVIC, M.; UCKER, D.S. Innate immune discrimination of apoptotic cells: repression of proinflammatory macrophage transcription is coupled directly to specific recognition. **Journal of Immunology**, v. 172, p. 880-889, 2002.

DAS, M.; MUKHERJEE, S. B.; SHAHA, C. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **The Journal of Cell Science**, v.114, (Pt 13), p.2461-69, 2001.

DEANNE, L.M.; DEANNE, M.P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. **O Hospital**, v.47, p.75-87, 1955.

DEBRABANT, A.; LEE, N.; BERTHOLET, S.; DUNCAN, R.; NAKHASI, H.L. Programmed cell death in trypanosomatids: a way to maximize their biological fitness? **Trends in Parasitology**, v. 33, p. 257-67, 2003.

DEL PUERTO, H.L., MARTINS AS, MORO L, MILSTED A, ALVES F, BRAZ GF, VASCONCELOS AC: *Caspase-3/-8/-9*, *Bax* and *Bcl-2* expression in the cerebellum, lymph nodes and leukocytes of dogs naturally infected with canine distemper virus. **Genetics and Molecular Research**, v.9, p.151-161, 2010.

DENARDO, D.G.; BARRETO, J.B.; ANDREU, P.; VASQUEZ, L.; TAWFIK, D.; KOLHATKAR, N.; COUSSENS, L.M. *CD4 (+) T* cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. **Cancer Cell**. v.16, p.91–102, 2009.

DENEROLLE, P. Leishmaniose canina: difficultés du diagnostic et du traitement (125 cas). **Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie**, v. 31, p. 137-45, 1996.

DIAS, M. I. R. Anestesia com indução do tiopental de sódio e manutenção pelo halotano em cão. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinária**, v. 95, n. 534, p. 71-80, 2000.

DIETZE, R.; BARROS, G.B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of elimination seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, p. 1240-1242, 1997.

DOS-SANTOS, W.L.C.; DAVID, J.; BADARÓ, R.; DE-FREITAS, L.A.R. Association between skin parasitism and granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 94, p. 84-94, 2004.

DOUCET, C.; BROUTY-BOYE, D.; POTTIN-CLEMENCEAU, C.; CANONICA, G.W.; JASMIN, C.; AZZARONE, B. Interleukin (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma. **Journal of Clinical Investigation**, v.101, p.2129–2139, 1998.

DUARTE, M.I.S. Patologia das principais doenças tropicais no Brasil. Leishmaniose visceral (calazar). In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 1215-75.

DUFFIELD, J.S.; ERWIG, L.P.; WEI, X.; LIEW, F.Y.; REES, A.J.; SAVILL, J.S. Activated macrophages direct apoptosis and suppress mitosis of mesangial cells. **Journal of Immunology**, v.164, p.2110–2119, 2000.

DUNCAN, M. R.; BERMAN, B. Stimulation of collagen and glycosaminoglycan production in cultured human adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin 6. **Journal of Investigative Dermatology**, v.97, p.686–692, 1991.

DUTRA, M.; MARTINELLI, R.; CARVALHO, E. M.; RODRIGUES, L. E.; BRITO, E.; ROCHA, H. Renal involvement in visceral leishmaniasis. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 6, n. 1, p. 22-27, 1985.

EDA, S.; YAMANAKA, M.; BEPPU, M. Carbohydrate-mediated phagocytic recognition of early apoptotic cells undergoing transient capping of CD43 glycoprotein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 5967-74, 2004.

EDDY, A.A. Molecular basis of renal fibrosis. **Pediatric Nephrology**, v.15, p.290–301, 2001.

EL NAHAS, A.M. Plasticity of kidney cells: role in kidney remodelling and scarring. **Kidney International**, v.64, p.1553–63, 2003.

ELIAS, J. A.; LEE, C.G.; ZHENG, T; MA, B.; HOMER,R.J.; ZHU Z. New insights into the pathogenesis of asthma. **Journal of Clinical Investigation**, v.111, p.291, 2003.

EREL, D.; KOCYIGIT, A.; AVCI, S.; AKTEPE, N.; BULUT, V. Oxidative stress and antioxidative status of plasma and erythrocytes in patients with malaria. **Clinical Biochemistry**, v.30, p.631-639, 1997.

EVANS D.A.; REBÊLO, M.E. Leishmaniose viscerocutânea no cão doméstico: estudo laboratorial e clínico. Lisboa: **Instituto de Protecção da Produção Agro-Alimentar/Centro Nacional de Protecção e Controle Zoo-Sanitário**, 1996. 67 p.

FADOK, V.A.; BRATTON, D.L.; KONOWAL, A. Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vivo* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving *TGF-beta*, *PGE2*, and *PAF*. **Journal of Clinical Investigation**, v.101, p. 890-898, 1998.

FADOK, V.A.; DE CATHELINEAU, A.; DALEKE, D.L.; HENSON, P.M.; BRATTON, D.L. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 1071-7, 2001.

FALLON, P.; RICHARDSON, G.; MCKENZIE, E.J.G.J.; MCKENZIE, A.N. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for *IL-4* and *IL-13*: *IL-13* is a profibrotic agent. **Journal of Immunology**, v.164, p.2585, 2000.

FAN, M.J.; NG, Y.Y.; HILL, P.A. Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial myofibroblast transdifferentiation in vitro. **Kidney International**, v.56, p.1455–1467, 1999.

FELDMANN, G.; HAOUZI, D.; MOREAU, A.; DURAND-SCHNEIDER, A.M.; BRINGUIER, A.; BERSON, A.; MANSOURI, A.; FAU, D.; PESSAYRE, D. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrane rupture in *Fas*-mediated hepatic apoptosis in mice. **Hepatology**, v.31, p.674-83, 2000.

FERRER, L.; FONDEVILLA, D.; RABANAL, R.; RAMIS, A. Detection of *T* lymphocytes in canine tissues embedded in paraffin wax by means of antibody to *CD3* antigen. **Journal of Comparative Pathology**, v.106, p. 311-14, 1992.

FERRER, L.; RABANAL, R.; FONDEVILLA, D.; RAMOS, J.A.; DOMINGO, M. Skin lesions in canine leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 29, p. 381-88, 1988.

FINE, A.; GOLDSTEIN, R. H. The effect of transforming growth factor-b on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry**, v.262, p.3897–3902, 1987

FINNEY, D.J. **Statistics for biologists**. London: Chapman and Hall. 1980. 220p.

FREITAS BALANCO, J. M.; MOREIRA, M. E.; BONOMO, A.; BOZZA, P. T.; AMARANTE-MENDES, G.; PIRMEZ, C.; BARCINSKI, M. A. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. **Current Biology**, v.11, p.1870-73, 2001.

GAIPL, U.S.; KUENKELE, S.; VOLL, R.E. Complement binding is an early feature of necrotic and a rather late event during apoptotic cell death. **Cell Death and Differentiation**, v.8, p. 327-334, 2001.

GAMBARELLI, F.; FONTES, M.; DUMON, H.; QUILICI, M. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: Development

of s visceral leishmaniasis Polymerase Chain Reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.49, p.364-69, 1993.

GAMBARO, G.; WEIGERT, C.; CEOL, M.; SCHLEICHER, E.D. Inhibition of transforming growth factor- β 1 gene overexpression as a strategy to prevent fibrosis. **Contributions to Nephrology**, v.131, p.107, 2001.

GAO, Y.K.; HERNDON, J.M.; ZHANG, H.; GRIFFITH T.S.; FERGUSON, T.A. Anti-inflammatory effects of CD95 ligand (*Fas-L*)-induced apoptosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 188, p. 887-96, 1998.

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S.A. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **Journal of Cell Biology**, v.119, p.493-501, 1992.

GINEL, P.J.; MOZOS, E.; FERNADÉZ, A.; MARTINEZ, A.; MOLLEDA, J.M. Canine pemphigus foliaceus associated with leishmaniosis. The **Veterinary Record**, v.133, p.526-27, 1993.

GIRI, S.N., HYDE, D.M.; HOLLINGER, M.A. Effect of antibody to transforming growth factor β on bleomycin induced accumulation of lung collagen in mice. **Thorax**, v.48, p.959, 1993.

GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CARNEIRO, C.M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; REIS, A.B. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) infantum* burden in dermal inflammatory foci. **Journal of Comparative Pathology**, v.135, p.100-07, 2006.

GLANVILLE, A.R.; SCOTT, A.I.; MORTON, J.M.; ABOYOUN, C.L.; PLIT, M.L.; CARTER, I.W.; MALOUF, M.A. Intravenous ribavirin is a safe and cost-effective treatment for respiratory syncytial virus infection after lung transplantation. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v.24, p. 2114–2119, 2005.

GORDON, S.; MARTINEZ, F.O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, v.32, p.593–604, 2010.

GRADONI, L. **The diagnosis of canine leishmaniasis, moving towards a solution.** In: Killick-Kendrick R, (ED), Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain, pp 7-14, 2002.

GRANDE, M.T.; LOPEZ-NOVOA, J.M. Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy. **Nature Review Nephrology**, v.5, p.319-328, 2009.

GREENWEL, P.; IRABURU, M. J.; REYES-ROMERO, M.; MERAZ-CRUZ, N.; CASADO, E.; SOLIS-HERRUZO, J. A.; ROJKIND, M. Induction of an acute phase response in rats stimulates the expression of a11 procollagen (I) Messenger ribonucleic acid in their livers. **Laboratory Investigation**, v.72, p. 83–91, 1995.

GUH, J.Y.; CHUANG, T.D.; CHEN, H.C.; HUNG, W.C.; LAI, Y.H.; SHIN, S.J.; CHUANG, L.Y. β -hydroxybutyrate-induced growth inhibition and collagen production in HK-2 cells are dependent on *TGF- β* and *Smad3*. **Kidney International**, v.64, p.2041–2051, 2003.

HARRINGTON, L.E.; MANGAN, P.R.; WEAVER, C.T. Expanding the effector *CD4* T-cell repertoire: the *Th17* lineage. **Current Opinion in Immunology**, v.18, p.349–356, 2006.

HASEGAWA, M.; FUJIMOTO, M.; KIKUCHI, K.; TAKEHARA, K. Elevated serum levels of interleukin 4 (*IL-4*), *IL-10*, and *IL-13* in patients with systemic sclerosis. **Journal of Rheumatology**, v. 24, p.328, 1997.

HASHIMOTO, S.; GON. Y.; TAKESHITA, I.; MARUOKA, S.; HORIE, T. *IL-4* and *IL-13* induce myofibroblastic phenotype of human lung fibroblasts through *c-Jun NH2*-terminal kinase-dependent pathway. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.107, p.1001–1008. 2001.

HEIDARPOUR, M.; SOLTANI, S.; MOHRI, M.; KHOSHNEGAH, J. Canine visceral leishmaniasis: relationships between oxidative stress, liver and kidney variables, trace elements, and clinical status. **Parasitology Research**, v.111, p.1491-1496, 2012.

HELLER, N.M.; QI, X.; JUNTILA, I.S.; SHIREY, K.A.; VOGEL, S.N.; PAUL, W.E.; KEEGAN, A.D. Type I *IL-4Rs* selectively activate *IRS-2* to induce target gene expression in macrophages. **Science Signal**, v.1, p. ra17, 2008.

HINZ, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. **Journal of Investigative Dermatology**, v.127, p.526–537, 2007.

HINZ, B., CELETTA, G., TOMASEK, J.J., GABBIANI, G., CHAPONNIER, C. Alphasmooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. **Molecular Biology of the Cell**, v.12, p.2730 –2741, 2001.

HOGABOAM, C.M.; BLEASE, K.; MEHRAD, B.; STEINHAUSER, M.L.; STANDIFORD, T.J.; KUNKEL, S.L.; LUKACS, N.W. Chronic airway hyperreactivity, goblet cell hyperplasia, and peribronchial fibrosis during allergic airway disease induced by *Aspergillus fumigatus*, **American Journal of Pathology**, v.156, p.723–732, 2000.

HOLZERMULLER, P.; CAVALEYRA, M.; MOREAUX, J.; KOVACIC, R.; VINCEDEAU, P.; PAPIEROK, G.; LEMERSRE, J.L. Lymphocytes of dogs immunized with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce *IFN gamma* resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.1006, p. 247-57, 2005.

HUANG, F. P.; XU, D.; ESFANDIARI, E. O.; SANDS, W.; WEI, X. Q.; LIEW, F. Y. Mice defective in Fas are highly susceptible to *Leishmania major* infection despite elevated IL-12 synthesis, strong Th1 responses, and enhanced nitric oxide production. **Journal of Immunology**, v.160, n. 9, p. 4143-47, 1998.

HUANG, H.; MA, C.; YANG, M.; TANG, C.; WANG, H. Adrenomedullin impairs the profibrotic effects of transforming growth factorbeta1 through recruiting Smad6 protein in human renal tubular cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v.15, p.117-124, 2005.

HUYNH, M.L.; FADOK, V.A.; HENSON, P.M. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta 1 secretion and the resolution of inflammation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, p. 41-50, 2002.

ISHIKAWA, H.; HISAEDA, H.; TANIGUCHE, M.; NAKAYAMA, T.; SAKAI, T.; MAEKAWA, Y.; NAKANO, Y.; ZHANG, M.; ZHANG, T.; NISHITANI, M.; TAKASHIMA, M.; HIMENO, K. *CD4(+) v(alpha) 14 NKT* cells play a crucial role in an early stage of protective immunity against infection with *Leishmania major*. **International Immunology**, v.12, p.1267-74, 2000.

IWANO, M.; NEILSON, E.G. Mechanism of tubulointerstitial fibrosis. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v.13, p.279–84, 2004.

IWANO, M.; PLIETH, D.; DANOFF, T.M.; XUE, C.; OKADA, H.; NEILSON, E.G. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. **Journal of Clinical Investigation**, v.110, p.341-350, 2002.

Jl, J.; SUN, J.; SOONG, L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, v.71, p.4278-4288, 2003.

JOHNSON-DAVIS, K.L.; FERNELIUS, C.; ELIASON, N.B.; WILSON, A.; BEDDHU, S.; ROBERTS, W.L. Blood enzymes and oxidative stress in chronic kidney disease: a cross sectional study. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v.41, p.331-339, 2011.

KAHNERT, A.; SEILER, P.; STEIN, M.; BANDERMANN, S.; HAHNKE, K.; MOLLENKOPF, H.; KAUFMANN, S.H. Alternative activation deprives macrophages of a coordinated defense program to Mycobacterium tuberculosis. **European Journal of Immunology**, v. 36, p.631–647, 2006.

KAMIR, D.; ZIEROW, S.; LENG, L.; CHO, Y.; DIAZ, H.; GRIFFITH, J.; MCDONALD, C.; MERK, M.; MITCHELL, R.A.; TRENT, J.; CHEN, Y.; KWONG Y.K.; XIONG, H.; VERMEIRE, J.; CAPPELLO, M.; MCMAHON-PRATT, D.; WALKER, J.; BERNHAGEN, J.; LOLIS, E.; BUCALA, R. A. *Leishmania* ortholog of

macrophages migration inhibitory factor modulates host macrophage responses. **Journal of Immunology**, v.180, p.8250-61, 2008.

KATZMAN, S.D.; FOWELL, D.J. Pathogen-imposed skewing of mouse chemokine and cytokine expression at the infected tissue site. **Journal of Clinical Investigation**, v.118, p.801–811, 2008.

KEENAN, C.M.; HENDRIKS, L.D.; LEIGJTNER, L.; JOHNSON, A.J. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. **Veterinary Pathology**, v.21, p.74-79, 1984.

KEMP, M.; THEARDER, T.G.; KHARAZMI, A. The contrasting roles of *CD4+* *T* cells in intracellular infections in humans: leishmaniasis as an example. **Immunology Today**, v.17, n.1, p. 13-16, 1996.

KERR, J. F. R.; SEARLE, J. A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal cell carcinomas that contain numerous mitotic figure. **Journal of Pathology**, v.107, p. 41-44, 1972.

KERR, J.F.R. Definition of apoptosis and overview of its incidence. In: LAVIN, M., WATTERS, D. **Programmed cell death: the cellular and molecular biology of apoptosis**. Switzerland: Harwood Academic Publishers, p. 1-15, 1993.

KHAN, I.A.; HAKAK, R.; EBERLE, K.; SAYLES, P.; WEISS, L.M.; URBAN, J.F. JR. Co-infection with *Heligmosomoides polygyrus* fails to establish *CD8+* *T*-cell immunity against *Toxoplasma gondii*. **Infect Immunology**, v.76, p.1305–1313, 2008.

KILLICK-KENDRICK, R. Some epidemiological consequence of evolutionary fit between leishmaniae and their phlebotomine vectors. **Bulletin of the Exotic Pathology Society**, v. 78, p. 747-755, 1985.

KIM, J.W.; DANG, C.V. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. **Trends in Biochemical Sciences**, v.30, p.142-150, 2005.

KIM, S.; ELKON, K.B.; MA, X. Transcriptional suppression of inteleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. **Immunity**, v. 21, p. 643-653, 2004.

KITANI, A.; FUSS, I.; NAKAMURA, K.; KUMAKI, F.; USUI, T.; STROBER, W. Transforming growth factor (*TGF*)- β 1-producing regulatory T cells induce smad mediated interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of *TGF*- β 1-mediated fibrosis. **Journal of Experimental Medicine**, v.198, p.1179, 2003.

KLEINER, D.E. The liver biopsy in chronic hepatitis C: a view from the other side of the microscope, **Seminars in Liver Disease**, v.25, p.52–64, 2005.

KNIGHT, R.A. The archaeology of apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v.9, p.1-2, 2002.

KOBAYASHI, M.; FITZ, L.; RYAN, M.; HEWICK, R.M.; CLARK, S.C. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (*NKSF*), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. **Journal of Immunology**, v.170, p.827–845, 1989.

KONTOS, V.J.; KOUTINAS, A.F. Old world canine leishmaniasis. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**, v.15, p.949-959, 1993.

KRYSKOS, D.V.; DENECKER, G.; FESTJENS, N. Macrophages use different internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells. **Cell Death and Differentiation**, v.18, p. 781-795, 2006.

LA FLAMME, A.C.; SCOTT, P.; PEARCE, E.J. Schistosomiasis delays lesion resolution during *Leishmania major* infection by impairing parasite killing by macrophages. **Parasite Immunology**, v.24, p.339–345, 2002.

LAINSON, R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v.B321, p.389-404, 1988.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; LILLICK-KENDRICK, R. (Ed). **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. London: Academic Press. 1987. 120 p.

LANZARO, G. C.; WARBURG, A. Genetic variability in phlebotomine sandflies: possible implications for leishmaniasis epidemiology. **Parasitology Today**, v. 11, n. 4, p.151-54, 1995.

LASKAY, T.; DIEFENBACH, A.; ROLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania* major infection. **European Journal Immunology**, v.25, p.2220-27, 1995.

LAUFS, H.; MULLER, K.; FLEISCHER, J.; REILING, N.; JAHNKE, N.; JENSENIUS, J.C. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophils granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infections and Immunology**, v. 70, p. 826-35, 2002.

LEE, C. G.; HOMER, R. J.; ZHU, Z.; LANONE, S.; WANG,X.; KOTELIANSKY, V.; SHIPLEY, J. M.; GOTWALS, P.; NOBLE, P.; CHEN, Q. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor β (1). **Journal of Experimental Medicine**, v.194, p.809, 2001.

LEE, N.; BERTHOLET, S.; DEBRABANT, A. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. **Cell Death and Differentiation**, v. 9, p. 53-64, 2002.

LEE, N.; GANNAVARAM, S.; SELVAPANDIYAN A.; DEBRABAND, A. Characterization of metacaspases with trypsin-like activity their putative role in programmed cell death in the protozoan parasite *Leishmania*. **Eukaryotic Cell**, v.6, p.1745-1757, 2007.

LEMO DE SOUSA, V.; ASCENSÃO, J. S; SAMPAIO, P.T.V; RODRIGUES de FREITAS, L.A. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological response in CBA mice. **Microbes Infections**, v.2, n.15, p.1807-15, 2000.

LEND, D.M.; KIKAWADA, E.; STANLEY, E.R.; KELLEY, V.R. Reduced macrophage recruitment, proliferation, and activation in colony-stimulating factor-1-deficient mice results in decreased tubular apoptosis during renal inflammation. **Journal of Immunology**, v.170, p.3254–3262, 2003.

LETTERIO, J. J. Murine models define the role of *TGF- β* as a master regulator of immune cell function. **Cytokine Growth Factor Review**, v.11, p.81, 2000.

LETTERIO, J.J.; ROBERTS, A.B. Regulation of immune responses by *TGF-beta*, **The Annual Review of Immunology**, v.16, p.137–161, 1998.

LI, B.; LI, X.M.; ZHANG, C.Y.; WANG, X.; CAI, S.Q. Injury in renal proximal tubular epithelial cells induced by aristololactam I. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v.29, p.78-83, 2004.

LI, M.; CARPIO, D.F; ZHENG, Y.; BRUZZO, P.; SINGH V.; OUAAZ, F.; MEDZHITOV, R.M.; BEG, A.A. An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. **Journal of Immunology**, v. 166, p. 7128-7135, 2001.

LIEW, F.Y. Regulation of cell-mediated immunity in leishmaniasis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.155, p. 53-64, 1997.

LIMA, G.M.; VALLOCHI, A.L.; SILVA, U.R.; BEVILACQUA, E.M.; KIFFER, M.M.; ABRAHAMSOHN, I.A. The role of polymorphonuclear neutrophils leucocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. **Immunology Letters**, v.64, p. 145-151, 1998.

LIN, S.L.; KISSELEVA, T.; BRENNER, D.A.; DUFFIELD, J.S. Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. **American Journal of Pathology**, v.173, p.1617–1627, 2008.

LINDOSO, J. A.; COTRIM, P. C.; GOTO, H. Apoptosis of *Leishmania (Leishmania) infantum* amastigotes in hamsters infected with visceral leishmaniasis. **International Journal of Parasitology**, v.34, n.1, p.1-4, 2004.

LIU, Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. **Journal of American Society of Nephrology**, v.15, p.1–12, 2004.

LOKE, P.; NAIR, M.G.; PARKINSON, J.; GUILIANO, D.; BLAXTER, M.; ALLEN, J.E. *IL-4* dependent alternatively activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. **BMC Immunology**, v.3, p.7, 2002.

LOPES, R.; LUCENA, R.; NOVALEZ, M. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. **Zentralbl Veterinarmed B**, v.43, p.460-447, 1996.

LOTZ, M., GUERNE, P. A. Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1/erythroid potentiating activity (*TIMP-1/ EPA*). **The Journal of Biological Chemistry**. v.266, p.2017–2020, 1991.

LUNA, L. G. **Manual of histopathologic staining methods of the Armed Force Institute of Pathology**. 3rd ed. New York: Mc Graw-Hill, 1968, 258 p.

MACIANTI, F.; POLI, A.; BIONDA, A. Analysis of renal immune-deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results. **Parasitology**. v. 31, 213-230, 1989.

MADERNA, P.; GODSON, C. Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1639, p. 141-51, 2003.

MANCINE, M.; NICHOLSON, D.W.; ROY, S.; THORNBERRY, N.A.; PETERSON, E.P.; CASCIOLA-ROSEN, L.A.; ROSEN, A. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. **The Journal of Cell Biology**., v.140, p.1485-1495, 1998.

MANETTI, R.; PARRONCHI, P.; GIUDIZI, M.G.; PICCINNI, M.P.; MAGGI, E.; TRINCHIERI, G.; ROMAGNANI, S. Natural killer cell stimulatory factor (*IL-12*) induces T helper type 1 (*Th1*)-specific immune responses and inhibits the development of *IL-4*-producing *Th* cells. **Journal of Experimental Medicine**, v.177, p.1199–1204, 1993.

MARGARITO, J. M.; GINEL, P.J.; MOLLEDA, J. M.; MORENO, P.; NOVALES, M.; LÓPEZ, R. Haemangiosarcoma associated with Leishmaniosis in three dogs. **The Veterinary Record**, v. 134, p. 66-67, 1994.

MARTINET, Y.; ROM, W.N.; GROTENDORST, G.R.; MARTIN, G.R.; CRYSTAL, R.G. Exaggerated spontaneous release of platelet-derived growth factor by alveolar

macrophages from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. **The New England Journal of Medicine**, v.317, p.202–209, 1987.

MATHEW, A.; MACLEAN, J.A.; DEHAAN, E.; TAGER, A.M.; GREEN, F.H.; LUSTER, A.D. Signal transducer and activator of transcription of controls chemokine production and T helper cell type 2 cell trafficking in allergic pulmonary inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, v.193, p.1087–1096, 2001.

MATHIAS, R.; COSTA, F. A. L.; GOTO, H. Detection of immunoglobulin in the lung and in the liver during visceral leishmaniasis in hamsters. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, n.4, p. 539-543, 2001.

MATTE, C.; OLIVIER, M. *Leishmania*- Induced Cellular Recruitment during the Early Inflammatory Response: Modulation of Proinflammatory Mediators. **Journal of Infected Diseases**, v.185, p.673-681, 2002.

MATTEY, D.L.; DAWES, P.T.; NIXON, N.B.; SLATER, H. Transforming growth factor beta 1 and interleukin 4 induced alpha smooth muscle actin expression and myofibroblast-like differentiation in human synovial fibroblasts *in vitro*: modulation by basic fibroblast growth factor, **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.56, p.426–431, 1997.

MAURICIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. The strange case of *L. infantum*. **Parasitology Today**, v.16, p.188-189, 2000.

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

McCluskey, R.T.; Bhan, A.K. Cell-mediated mechanism in renal diseases. **Kidney International**, v.11, p.S6-12, 1982.

MEAGHER, L.C.; SAVILL, J.S.; BAKER, A.; FULLER, R.W.; HASLETT, C. Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B2. **Journal of Leukocyte Biology**, v.52, p.269–73. 1992.

MEGYESI, J.; SAFIRSTEIN, R.L.; PRICE, P.M. Induction of *p21WAF1/CIP1/SDI1* in kidney tubule cells affects the course of cisplatin-induced acute renal failure. **Journal of Clinical Investigation**, v.101, p.777–782, 1997.

MEGYESI, J.; ANDRADE, L.; VIEIRA, J.; SAFIRSTEIN, R.L.; PRICE, P.M. Positive effect of the induction of *p21WAF1/CIP1* on the course of ischemic acute renal failure. **Kidney International**, v.60, p.2164–2172, 2001.

MELO, F.A.; MOURA, E.P.; RIBEIRO, R.R.; ALVES, C.F.; CALIARI, M.V.; TAFURI, W.L.; CALABRESE, K.; TAFURI, W.L., 2009. Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum*. **International Journal of Experimental Pathology**, v.90, p.538-548.

MENÉ P.; AMORE, A. Apoptosis: potential role in renal disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.13, p.1936-1943, 1998.

MENEGHIN, A.; HOGABOAM, C.M. Infectious disease, the innate immune response, and fibrosis, **Journal of Clinical Investigation**, v.117, p.530–538, 2007.

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

MEOTTI, F.C.; JAMENSON, G.N.L.; TURNER, R.; HARWOOD, D.T.; STOCKWELL, S.; REES, M. D.; THOMAS, S. R.; KETTLE, A.J. Urate as a physiological substrate for myeloperoxidase: implications for hyperuricemia and inflammation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.286, p.12901-12911, 2011.

MEVORACH, D.; MASCARENHAS, J.O.; GERSHOV, D.; ELKON, K.B. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, v. 188, p. 2313-2320, 1998.

MIKEL, U.V. **Advanced laboratory methods in histology and pathology**. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, p. 230-32, 1994.

MILOT, E., FILEP, J.G., 2011. Regulation of Neutrophil Survival/Apoptosis by Mcl-1. **ScientificWorld Journal** 11, 1948-1962.

MISSERI, R.; MELDRUM, D.R.; DINARELLO, C.A.; DAGHER, P.; HILE, K.L.; RINK, R.C.; MELDRUM, K.K. *TNF*-alpha mediates obstruction-induced renal tubular cell apoptosis and pro apoptotic signaling. **American Journal of Physiology and Renal Physiology**, v.288, p.F406–F411, 2005.

MISSERI, R.; MELDRUM, K.K. Mediators of fibrosis and apoptosis in obstructive uropathies. **Current Urology Reports**, v.6, p.140-145, 2005.

MONTESANO, M.A.; COLLEY, D.G.; ELOI-SANTOS, S.; FREEMAN JR., G.L.; SECOR, W.E. Neonatal idiotype exposure alters subsequent cytokine, pathology, and survival patterns in experimental *Schistosoma mansoni* infections. **Journal of Experimental Medicine**, 189:637, 1999.

MOORE, K.J.; LABRECQUE, S.; MATLASHEWSKI, G. Alteration of *Leishmania donovani* infection levels by selective impairment of macrophages signal transduction. **Journal of Immunology**, v.150, p.4457-65, 1993.

MORO, L.; VASCONCELOS, A.C.; SANTOS, F.G.A.; ALVES, C.M.; NUNES, J.E.S.; SAMPAIO, I.B.M. Determination of the minimal representative number of microscopic fields to quantify apoptosis in canine lymph nodes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.408-10, 2004.

MOTTRAM, J.C.; HELMS, M.J.; COOMBS, G.H.; SAJID, M. Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa. **Trends in Parasitology**, v.9, p. 182-187, 2003.

MOTTRAM, J.C.; SOUSA, A.E.; HUTCHISON, J.E.; CARTER, R.; FRAME, M.J.; COOMBS, G.H. Evidence from disruptions of the imcpb gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 6008-6013, 1996.

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.3, p.131-138, 2003.

MÜLLER, K.; VAN ZANDBERGEN, G.; HANSEN, B.; LAUFS, H.; HANSEN, B.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 190, p.73-76, 2001.

MURPHY, K.M.; REINER, S.L. The lineage decisions of helper T cells. **Nature. Immunology Review**, v.2, p.933–944, 2002.

MURRAY, H.W.; STERN, J.J.; WELTE, K.; RUBIN, B.Y.; CARRIERO, S.M.; NATHAN, C.F. Experimental visceral leishmaniasis: production of interleukin 2 and interferon-gama, tissue immune reaction, and response to treatment with interleukin 2 and interferon-gama. **Journal of Immunology**, v.138, p. 2290-97, 1987.

MURRAY, P.J.; WYNN, T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature. Immunology Review**, v.11, p.723–737, 2011.

NANDAN, D.; LO, R.; REINER, N.E. Activation of phosphotyrosine phosphatase activity attenuates mitogen-activated protein kinase signaling and inhibits *c-FOS* and nitric oxide synthase expression in macrophages infected with *Leishmania donovani*. **Infection and Immunity**, v.67, p.4055-63, 1999.

NATHAN, C.; SPORN, M. Cytokines in context. **The Journal of Cell Biology**, v.13, p.981–986, 1991.

NEILSON, E.G.; MCCAFFERTY, E.; FELDMAN, A. Spontaneous interstitial nephritis in kdkd mice. An experimental model of autoimmune renal disease. **Journal of Immunology**, v.133, p.2560-2565, 1984.

NIEMER, Z.; STEIN, H.; NORONHA, I. *PDGF* and *TGF-beta* contribute to the natural course of human *IgA* glomerulonephritis. **Kidney International**, v.48, p.150, 1995.

NOEL, W.; RAES, G.; HASSANZADEHGHASSABEH, G.; DE BAETSELIER, P.; BESCHIN, A. Alternatively activated macrophages during parasite infections, **Trends in Parasitology**, v.20, p.126–133, 2004.

OLIVEIRA, F.J.; CECCHINI, R.J. Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania (L.) infantum*. **Parasitology**, v.86, p.1067-1072, 2000.

OLSEN, T.S.; WASSEF, N.F.; OLSEN, H.S.; HANSEN, H.E. Ultrastructure of the kidney in acute interstitial nephritis. **Ultrastructural Pathology**, v.10, p.1-16., 1986.

ORTIZ, A.; JUSTO, P.; CATALÁN, M.P. Apoptotic cell death in renal injury: the rationale for intervention. **Current Drug Targets-Immune, Endocrine and Metabolic Disorders**. v.2, p.181-192, 2002

ORTIZ, A.; LORZ, C.; CATALÁN, M.P. Role and regulation of apoptotic cell death in the kidney. **Y2K Update Front Bioscience**, v.5, p.735-749, 2000.

OUELLETTE, A.J.; MALT, R.A.; SUKHATME, V.P.; BONVENTRE, J.V. Expression of two 'immediate early' genes, *Egr-1* and *cfos*, in response to renal ischemia and during renal hypertrophy. **Journal of Clinical Investigation**, v.85, p.766–771, 1990.

PATEL, T. Apoptosis in hepatic pathophysiology. **Clinical Liver Diseases**, v.4, p.295-317, 2000.

PATEL, T.; GORES, G.J. Apoptosis in liver transplantation: a mechanism contributing to immune modulation, preservation injury, neoplasia, and viral disease. **Liver Transplant Surgery**, v.4, p.42-50, 1998.

PATEL. T.; GORES, G. Apoptosis and hepatobiliary disease. **Hepatology**, v.21 p.1725-41, 1995.

PAUL, W.E.; ZHU, J. How are T(h)2-type immune responses initiated and amplified? **Nature. Immunology Review**, v.10, p.225–235, 2010.

PEAKE J., SUZUKI K. Neutrophil activation, antioxidant supplements and exercise-induced oxidative stress. **Exercise Immunology Review**, v.10, p.129–141, 2004.

PESSAYRE, D.; HAOUZI, D.; FAU, D.; ROBIN, M.A.; MANSOURI, A.; BERSON, A. Withdrawal of life support, altruistic suicide, fratricidal killing and euthanasia by lymphocytes: different forms of drug-induced hepatic apoptosis. **Journal of Hepatology**, v.31, p.760-70, 1999.

PETERS, H., NOBLE, N.A., BORDER, W.A. Transforming growth factor-beta in human glomerular injury. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v.6, p.389–393, 1997.

PETERS, N.C.; EGEN, J.G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; SACKS, D. In vivo imaging revealed an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, p. 970-974, 2008.

PETERSON, J.C. Blood pressure control, proteinuria, and the progression of renal disease. The modification of diet in renal disease study. **Annals of Internal Medicine**, v.123, p.724–762, 1995.

PIACENZA, L. *L-arginine*-dependent suppression of apoptosis in *Trypanosoma cruzi*: contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 7301-7306, 2001.

PIARROUX, P.; AZAIEZ, R.; LOSSI, A.M.; REYNIER, P.; MUSCATELLI, F.; PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune response in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v.62, p.229-35, 1994.

PILLAY, J.; DEN BRABER, I.; VRISEKOOOP, N.; KWAST, L.M.; DE BOER, R.J.; BORGHANS, J.A.; TESSELAAR, K.; KOENDERMAN, L. *In vivo* labeling with $2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. **Blood**, v.116, p.625-627, 2010.

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

PLATT, N.; DA SILVA, R.P.; GORDON, S. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. **Trends in Cell Biology**, v. 8, p. 365-372, 1998.

PLOTON, D., MENAGER, M., JEANNESSON, P. Improvement in the staining and the visualization of the argyrophilic proteins of nucleolar organizer regions at the optical level. **Histochemical Journal**, v.18, p.5-14, 1986.

POLYCARPE, E.; ARNOULD, L.; SCHMITT, E.; DUVILLARD, L.; FERRANT, E.; ISAMBERT, N.; DUVILLARD, C.; BELTRAMO, J.L.; CHEVET, D.; CHAUFFERT, B. Low urine osmolality as a determinant of cisplatin-induced nephrotoxicity. **International Journal of Cancer**, v.111, p.131–137, 2004.

POTIAN, J.A.; RAFI, W.; BHATT, K.; MCBRIDE, A.; GAUSE, W.C.; SALGAME, P. Preexisting helminth infection induces inhibition of innate pulmonary anti-tuberculosis defense by engaging the *IL-4* receptor pathway. **Journal of Experimental Medicine**, v.208, p.1863–1874, 2011.

POZIO, E.; GRANDONI, L.; BETTINI; GRAMICCIA, M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): IV. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). **Acta Tropica**, v. 38, p. 383-93, 1981.

PRAGA, M., MORALES, E. Renal damage associated with proteinuria. **Kidney International**, v.82, p.S42-46, 2002.

PRAL, E.M.; MOITINHO, M.L.; BALANCO, J.M.; TEXEIRA, V.R.; MILDER, R.V.; ALFIERI, S.C. Growth phase and medium pH modulate the expression of proteinase activities and the development of megasomes in axenically cultivated *Leishmania (L.) amazonensis* amastigote-like organisms. **Journal of Parasitology**, v.89, p.35-43, 2003.

PRESTON, G.A.; LYON, T.T.; YIN, Y.; LANG, J.E.; SOLOMON, G.; ANNAB, L.; SRINIVASAN, D.G.; ALCORTA, D.A.; BARRETT, J.C. Induction of apoptosis by c-fos protein. **Molecular and Cellular Biology**, v.16, p.211-18, 1996.

QI, W.; TWIGG, S.; CHEN, X.; POLHILL, T.S.; PORONNIK, P.; GILBERT, R.E. Integrated actions of transforming growth factor- β 1 and connective tissue growth factor in renal fibrosis. **American Journal of Physiology and Renal Physiology**, v.288, p.F800–F809, 2005.

RACOOSIN, E.L.; BEVERLEY, S.M. *Leishmania major*: Promastigotes Induce Expression of a Subset of Chemokine Genes in Murine Macrophages. **Experimental Parasitology**, v.85, p.283–295, 1997.

RAFI, W.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; ELLNER, J.J.; SALGAME, P. ‘Coinfection-helminthes and tuberculosis. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v.7, p.239–244, 2012.

RAMESH, G.; REEVES, W.B. *TNFR2*-mediated apoptosis and necrosis in cisplatin-induced acute renal failure. **American Journal of Renal Physiology**, v.285, p.F610-F618, 2003.

RAMOS-VARA, J.A.; BRIONES, V.; SEGALÉS, J.; VILA-FRANCA, M.; SORDE, A.; MILLER, M.A. Concurrent infection with *Streptococcus equisimiles* and *Leishmania* in a dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.**, v. 6, p.371-15, 1994.

RANO, T.A.; TIMKEY, T.; PETERSON, E.P.; ROTONDA, J.; NICHOLSON, D.W.; BECKER, J.W.; CHAPMAN, K.T.; THORNBERRY, N.A. A combinatorial approach for determining protease specificities: applications to interleukin-1 β converting enzyme (ICE). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 4, p.149-155, 1997.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W.L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Systemic and Compartmentalized Immune Responses in Canine Visceral Leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.128, p.87-95, 2009.

REITHINGER, R.; DAVIES, C.R. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, p. 530-541, 1999.

REN, Y.; STUART, L.; LINDBERG, F.P. Nonphlogistic clearance of late apoptosis neutrophils by macrophages: efficient phagocytosis independent of β 2 integrins. **Journal of Immunology**, v. 166, p. 4743-4750, 2001.

RIBEIRO-GOMES, F.L.; OTERO, N.A.; GOMES, N.A.; MONIZ DE SOUSA, M.C.A.; FINKELSTEIN, L.C.; ARNHOLDT, A.C.; CALISH, V.L.; COUTINHO, S.G.; LOPES, M.F.; DOS-REIS, G.A.: Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **Journal of Immunology**, v.172, p.454-62, 2005.

RIOUX, J.A.; LANOTTE, G.; SERRES, E.; PRATLONG, F.; BASTIEN, P.; PARIERES, J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Annales de parasitologie humaine et comparee**, v. 65, p. 111-125, 1990.

RITTER, U.; KORNER, H. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.24, p.295–301, 2002.

ROBERTS, A. B.; SPORN, M. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor- β (*TGF- β*). **Growth Factors**, v.8, p.1–9, 1993.

RONCO, P.; CHATZIANTONIOU, C. Matrix metalloproteinases and matrix receptors in progression and reversal of kidney disease: therapeutic perspectives. **Kidney International**, v.74, p.873–878., 2008.

ROOK, G.A. *Th2* cytokines in susceptibility to tuberculosis. **Current Molecular Medicine**, v.7, p.327–337, 2007.

ROOK, G.A.; DHEDA, K.; ZUMLA, A. Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. **Nature. Review Immunology**, v.5, p.661–667, 2005.

ROUSSEAU, D.; DERMATINO, S.; FERRUA, B.; MICHIELS, J.F.; ANJUÈRE, F.RU, Y., EYDEN, B. The ultrastructure of human tubulo-interstitial fibrosis. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v.35, p.147–160, 2003.

RUHLAND, A.; LEAL, N.; KIMA, P.E. *Leishmania* promastigotes activate *P13k/Akt* signalling to confer host cell resistance of apoptosis. **Cell Microbiology**, v.9, p.84-96, 2001.

SAFIRSTEIN, R.; PRICE, P.M.; SAGGI, S.J.; HARRIS, R.C. Changes in gene expression after temporary renal ischemia. **Kidney International**, v.37, p.1515–1521, 1990.

SAITO, H.; OKAZAKI, I.; SUGAWARA, K.; YAMAMOTO, H.; TAKIZAWA, B. Potential action of *IL-4* and *IL-13* as fibrogenic factors on lung fibroblasts in vitro, **International Archives of Allergy and Immunology**, v.132, p.168–176, 2003.

SALMON-EHR, V.; SERPIER, H.; NAWROCKI, B.; GILLERY, P.; CLAVEL, C.; KALIS, B.; BIREMBAUT, P.; MAQUART, F.X. Expression of interleukin-4 in scleroderma skin specimens and scleroderma fibroblast cultures. Potential role in fibrosis, **Archives of Dermatological Research**, v.132, p.802–806, 1996.

SARTORI, A.; OLIVEIRA, A. V.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; ROSSI, M. A.; CAMPOS-NETO, A. Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azar. **Parasite Immunology**, v.9, n. 1, p. 93-103, 1987.

SAS Institute Inc. **SAS/STAT User's guide**. Version 8, Cary, 1999, NC: SAS Institute Inc.

SAVILL, J. Apoptosis and the kidney. **Journal of American Society of Nephrology**, v.5, p.12-21, 1994.

SAVILL, J.; DRANSFIELD, I.; GREGORY, C.; HASLETT, C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. **Nature. Immunology Review**, v. 2, p. 965-975, 2002.

SAVILL, J.S.; WYLLIE, A.H.; HENSON, J.E. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. **Journal of Clinical Investigation**, v.83, p.865–75, 1989.

SCHAAF, B.; WIEGHORST, A.; ARIES, S.P.; DALHOFF, K.; BRAUN, J. Neutrophil inflammation and activation in bronchiectasis: comparison with pneumonia and idiopathic pulmonary fibrosis. **Respiration**, v.67, p.52–59; 2000.

SCHIEPPATI, A.; REMUZZI, G. Proteinuria and its consequences in renal disease. **Acta Paediatrica**, v.92, p.9–13, 2003.

SCHNAPER, H.W.; HAYASHIDA, T. *TGF*-beta signal transduction and mesangial cell fibrogenesis. **American Journal of Physiology and Renal Physiology**, v.3284, p.F243–F252, 2003.

SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; COFFMAN, R.L.; PEARCE, E.; SHER, A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **Journal of Experimental Medicine**, v.168, p.1675-1684, 1988.

SHAHA, C. Apoptosis in *Leishmania* species and its relevance to disease pathogenesis. **The Indian Journal of Medical Research**, v.3, p. 233-244, 2006.

SHARMA, K., ZIYADEH, F.N. The emerging role of transforming growth factor- β in kidney disease. **American Journal of Physiology**, v. 266, p.F829–F842, 1994.

SHEN, W.L.; GAO, P.J.; CHE, Z.Q.; JI K.D.; YIN, M.; YAN, C.; BERK, B.C.; ZHU, D.L. *NAD(P)H* oxidase-derived reactive oxygen species regulate angiotensin- II induced adventitial fibroblast phenotypic differentiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.339, p.337–343, 2006.

SHIRATSUCHI, A.; WATANABE, I.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; NAKANISHI, Y. Inhibition effect of toll-like receptor 4 on fusion between phagosomes and endosomes/lysosomes in macrophages. **Journal of Immunology**, v. 172, p. 2039-2047, 2004.

SILVA, L.C., CASTRO, R.S., FIGUEIREDO, M.M., MICHALICK, M.S.M., TAFURI, W.L., TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease. **International Journal of Experimental Pathology**, v.94, p.133-143, 2013.

SLAPPENDEL, R. J. Canine Leishmaniosis. **Veterinary Quarterly**, v.10, p.101-07, 1988.

Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.560–563, 2001.

SOLANO-GALLENO, L.; FERNANDES-BELLON, H.; MORELL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum* infected dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v.130, p.7-12, 2004.

SOLANO-GALLENO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infections in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.560-63, 2001.

SPRUGEL, K. H., MCPHERSON, J. M., CLOWES, A.W., ROSS, R. Effects of growth factors in vivo. I. Cell ingrowth into porous subcutaneous chamber. **American Journal of Pathology**, v.129, p.601–613, 1987.

STAGER, S.; ALEXANDER, J.; CARTER, K.C.; BROMBACHER, F.; KAYE, P.M. Both interleukin-4 (*IL-4*) and *IL-4* receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. **Infection and Immunity**, v.71, p.4804–4807, 2003.

STANLEY, A.C.; ENGWERDA, C.R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and Cell Biology**, v.85, p.138–147, 2007.

STEIN, M.; KESHAV, S.; HARRIS, N.; GORDON, S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. **Journal of Experimental Medicine**, v.176, p.287–292, 1992.

SUNDRUD, M.S.; GRILL, S.M.; NI, D.; NAGATA, K.; ALKAN, S.S.; SUBRAMANIAM, A.; UNUTMAZ, D. Genetic reprogramming of primary human T cells reveals functional plasticity in *Th* cell differentiation. **Journal of Immunology**, v.171, p.3542–3549, 2003.

TACCHINI-COTTIER, F.; ZWEIFEL, C.; BELKAID, Y.; MUKANKUNDIYE, C.; VASEL, M.; LAUNOIS, P.; MILON, G.; LOUIS, J. A. An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4⁺ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. **Journal of Immunology**, v.165, p.26-28, 2000.

TAFURI, W.L.; de OLIVEIRA, M.B.; MELO, M.N. Canine visceral leishmaniasis histopathologic pictures one case reported from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 96, p.203-12, 2001.

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

TARANTINO, C.; ROSSI, G. Kramer, L.H.; PERUCCI, S.; CRIGOLI, G.; MACCHIONI, G. *Leishmania infantum* e *Neospora caninum* simultaneous skin infections in young dog in Italy. **Veterinary Parasitology**, v.102, p.77-83, 2001.

THOMAS, G.L.; YANG, B.; WAGNER, B.E.; SAVILL, J.; EL NAHAS, A.M. Cellular apoptosis and proliferation in experimental renal fibrosis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.13, p.2216–2226, 1998.

THOMPSON CB. Apoptosis. In: Paul WE, Editor. **Fundamental Immunology**. 4. Ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. p.813-29.

TIAN, Y.C.; PHILLIPS, A.O. Interaction between the transforming growth factor-beta Type II Receptor/Smad pathway and beta-Catenin during transforming growth Factor-beta1-mediated adherens junction disassembly. **American Journal of Pathology**, v.160, p.1619-1628, 2002.

TISHER, C.C., BRENNER, B.M. **Renal pathology with clinical and functional correlations**. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1994, 978p.

TOMASEK, J.J.; GABBIANI, G.; HINZ, B.; CHAPONNIER, C.; BROWN, R.A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.3, p.349–363, 2002.

TRAVI, B.L.; TABARES, C.J.; CADENA, H.; FERROO, C.; OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationships between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, p. 119-124, 2001.

UEDA, N., SHAH, S.V. Tubular cell damage in acute renal failure-apoptosis, necrosis or both. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.15, p.318–323, 2000.

URBAN, J.F. JR.; NOBEN-TRAUTH, N.; SCHOPF, L.; MADDEN, K.B.; FINKELMAN, F.D. Cutting edge: *IL-4* receptor expression by non-bone marrow-derived cells is required to expel gastrointestinal nematode parasites. **Journal of Immunology**, v.167, p. 6078–6081, 2001.

UREN, A.G.; O'ROURKE, K.; ARAVIND, L.A.; PISABARRO M.T.; SESHAGIRI S.; KOONIN, E.V.; DIXIT, V.M. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspases-like protein, one of which plays a key role in MALT lymphoma. **Molecular and Cellular Biology**, v.6, p. 961-967, 2000.

VAN ZANDBERGEN, G.; BOLLINGER, A., WENZEL, A. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.103, p.13837–42, 2006.

VAN ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M.; MUELLER, A.; DANNENBERG, S.; GEBERT, A.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **Journal of Immunology**, v.173, n.11, p.6521-25, 2004.

VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Apoptosis driven infection. **Autoimmunity**, v.40, n.4, p.349-52, 2007.

VAUX, D.L.; HAECKER, G., STRASSER, A. An evolutionary perspective on apoptosis. **Cell**, v.76, p. 777-779, 1994.

VELDHOEN, M., HOCKING, R.J., ATKINS, C.J., LOCKSLEY, R.M., STOCKINGER, B. *TGF* beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of *IL-17*-producing T cells. **Immunity**, v.24, p.179–189, 2006.

VENUPRASAD, K.; BANERJEE, P. P.; CHATTOPADHYAY, S.; SHARMA, S.; PAL, S.; PARAB, P. B.; MITRA, D.; SAHA, B. Human neutrophil-expressed CD28 interacts

with macrophage B7 to induce phosphatidylinositol 3-kinase-dependent IFN- α secretion and restriction of *Leishmania* growth. **Journal of Immunology**, v.169, p.920-25, 2002.

VERÇOSA, B.L.A.; BORGES, A.C.J.; MENDES, F.J.M.; COSTA, M.L.S.; BRAGA, N.P.; MELO, M.N.; MENDONÇA, I.L.; COSTA, F.A.L.; VASCONCELOS A.C. Inflammatory response, parasite load and AgNOR expression in ear skin of symptomatic and asymptomatic *L. infantum* infected dogs. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.17, p.308-317, 2010.

VERÇOSA, B.L.A.; SILVA, S.M.M.S.; MENDONÇA, I. L.; LEMOS, C.M.; CARVALHO, S.M.; GOTO, H.; COSTA, F.A.L. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Veterinary Research**, vol.4, n.45, p.1-4, 2008.

VERMA, N.K.; DEY, C.S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, p. 3010-5, 2004.

VOEHRINGER, D., REESE, T.A., HUANG, X., SHINKAI, K., LOCKSLEY, R.M. Type 2 immunity is controlled by IL-4/IL-13 expression in hematopoietic non-eosinophil cells of the innate immune system. **Journal of Experimental Medicine**, v.203, p.1435–1446, 2006.

VOEHRINGER, D., SHINKAI, K., LOCKSLEY, R.M., 2004. Type 2 immunity reflects orchestrated recruitment of cells committed to *IL-4* production. **Immunity**, v.20, p.267–277.

WANDERLEY, J.L.M.; SILVA, L.H.P.; DEOLINDO, P.; SONG, L.; BORGES, V.M.; PRATES, D.B.; SOUSA, A.P.A.; BARRAL, A.; FREITAS BALANCO, J.M.; NASCIMENTO, M.T.C.; SARAIVA, E.M.; BARCINSKI, M.A. Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis. **PLoS ONE**, n.4,p.1-4, 2009.

WARDLE, N. Glomerulosclerosis: the final pathway is clarified, but can we deal with the triggers? **Nephron**, v.73, p.1–7, 1996.

WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. **The Annual Review of Microbiology**, v.53, p. 155-87, 1999.

WELBURN, S.C.; MAUDLIN, I. Control of *Trypanosoma brucei brucei* infections in tsetse, *Glossina morsitans*. **Medical and Veterinary Entomology**, v.11, n.3, p.286-89, 1997.

WILCOCKS, C.; MANSON-BAHR, P.E. Kala-azar. In: WILCOCKS, C.; MANSON-BAHR, Ed.s. **Tropical Diseases**. Baltimore, Baillière Tindall., 1972. p. 120-33.

WITZGALL, R.; BROWN, D.; SCHWARZ, C.; BONVENTRE, J.V. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogeneous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. **Journal of Clinical Investigation**, v.93, p.2175–2188, 1994.

WONG, V.Y.; KELLER, P.M.; NUTTALL, M.E. Role of caspases in human renal proximal tubular epithelial cell apoptosis. **European Journal of Pharmacology**, v.433, p.135-140, 2001.

WUNDERLIN, E.; POSPISCHIL, A. Peroxidase- antiperoxidase labeling of *Leishmania* amastigotes in formalin fixed and paraffin embedded tissue sections. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, v.105, p.302-04, 1992.

XAVIER, S.C.; ANDRADE, H.M.; HADAD, S.J.; CHIARELLI, I.M.; LIMA, W.G.; MICHALICK, M.S.M.; TAFURI, W.L.; TAFURI, W.L. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detecting *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Veterinary Research**, v.2, p.17-21, 2006.

XIAO, Y.Q.; MALCOLM, K.; WORTHEN, G.S. Cross-talk between ERK and p38 MARK mediates selective suppression of pro-inflammatory cytokines by transforming factor-beta. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 14884-14893, 2002.

YAMAMOTO, T.; NOBLE, N.A.; COHEN, A.; NAST, C.C.; HISHIDA, A.; GOLD, L.I.; BORDER, W.A. Expression of transforming growth factor-beta isoforms in human glomerular diseases. **Kidney International**, v.49, p.461–469, 1996.

YANG, B.; JOHNSON, T.S.; THOMAS, G.L.; WATSON, P.F.; WAGNER, B.; NAHAS, A.M. Apoptosis and *Caspase-3* in experimental anti-glomerular basement membrane nephritis. **Journal of American Society of Nephrology**, v.12, p.485–495, 2001.

ZEISBERG, M., STRUTZ, F., & MULLER, G. A. Role of fibroblast activation in inducing interstitial fibrosis. **Journal of Nephrology**, v.13 (Suppl 3), p.S111–S120, 2000.

ZEISBERG, M.; STRUTZ, F.; MULLER, G.A. Renal fibrosis: an update. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v.10, p.315–20, 2000.

ZHANG, X.L., SELBI, W., DE LA MOTTE, C., HASCALL, V., PHILLIPS, A. Renal proximal tubular epithelial cell transforming growth factor beta1 generation and monocyte binding. **American Journal of Pathology**, v.165, p.763-773, 2004.

ZHU, Z.; HOMER, R.J.; WANG, Z.; CHEN, Q.; GEBA, G. P.; WANG, J.; ZHANG, Y.; ELIAS, J. A. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. **Journal of Clinical Investigation**, v.103, p.779, 1999.

ZWART, B.; CIURANA, C.; RENSINK, I.; MANOE, R.; HACK, C.E.; AARDEN, L.A. Complement activation by apoptotic cells occurs predominantly via IgM and is limited to late apoptosis (secondary necrotic) cells. **Autoimmunity**, v.37, p. 95-102, 2004.