

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Departamento de Patologia

**Elementos traço na Leishmaniose visceral canina:
correlações com aspectos clínicos, histopatológicos e
estresse oxidativo**

Carolina Carvalho de Souza

Belo Horizonte
Fevereiro de 2013

Carolina Carvalho de Souza

Elementos traço na Leishmaniose visceral canina: correlações com aspectos clínicos, histopatológicos e estresse oxidativo

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora.

Área de concentração: Patologia Geral

Orientador: Wagner Luiz Tafuri

Co-orientador (a): Silvia Dantas Cangussú

Belo Horizonte

Fevereiro 2013

S729e Souza, Carolina Carvalho de.
Elementos traço na Leishmaniose visceral canina [manuscrito]: correlações com aspectos clínicos, histopatológicos e estresse oxidativo. / Carolina Carvalho de Souza. - - Belo Horizonte: 2013.
150f.: il.
Orientador: Wagner Luiz Tafuri.
Co-Orientadora: Sílvia Dantas Cangussu.
Área de concentração: Patologia Geral.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Leishmaniose Visceral/patologia. 2. Elementos de Resposta Antioxidante. 3. Estresse Oxidativo. 4. Ferro. 5. Cães. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Tafuri, Wagner Luiz. II. Cangussu, Sílvia Dantas. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WC 715

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca J. Baeta Vianna – Campus Saúde UFMG



**FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409-9640
cpg@medicina.ufmg.br



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, composta pelos professores doutores: Wagner Luiz Tafuri, Silvia Dantas Cangussú, Luciano dos Santos Aggum Capettini, Ricardo Gonçalves, Marcia Dalastra Laurenti e Maria Lucia Pedrosa, aprovou a defesa da tese intitulada: **“ELEMENTOS TRAÇO NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: CORRELAÇÕES COM ASPECTOS CLÍNICOS, HISTOPATOLÓGICOS E ESTRESSE OXIDATIVO”**, apresentada pela doutoranda **CAROLINA CARVALHO DE SOUZA** para obtenção do título de doutora em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Geral, da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 22 de fevereiro de 2013.

Prof. Wagner Luiz Tafuri
Orientador

Profa. Silvia Dantas Cangussú
Coorientadora

Prof. Luciano dos Santos Aggum Capettini

Prof. Ricardo Gonçalves

Profa. Márcia Dalastra Laurenti

Profa. Maria Lucia Pedrosa



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409-9640
cpg@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO de **CAROLINA CARVALHO DE SOUZA**, nº de registro 2009655731. Às quatorze horas do dia **22 de janeiro de dois mil e treze**, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de defesa de tese, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG, para julgar o trabalho intitulado: **“ELEMENTOS TRAÇO NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: CORRELAÇÕES COM ASPECTOS CLÍNICOS, HISTOPATOLÓGICOS E ESTRESSE OXIDATIVO”**, requisito final para a obtenção do grau de doutor em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG - Área de Concentração em Patologia Geral. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Wagner Luiz Tafuri, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra à candidata para apresentação do seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Wagner Luiz Tafuri/Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Profa. Sílvia Dantas Cangussú/Coorientadora	Instituição: UFOP	Indicação: <u>aprovada</u>
Prof. Luciano dos Santos Aggum Capettini	Instituição: UFMG	Indicação: <u>aprovada</u>
Prof. Ricardo Gonçalves	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Profa. Márcia Dalastra Laurenti	Instituição: USP	Indicação: <u>aprovada</u>
Profa. Maria Lucia Pedrosa	Instituição: UFOP	Indicação: <u>APROVADO</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2013.

Prof. Wagner Luiz Tafuri Wagner Luiz Tafuri

Profa. Sílvia Dantas Cangussú Silvia Dantas Cangussú

Prof. Luciano dos Santos Aggum Capettini Luciano dos Santos Aggum Capettini

Prof. Ricardo Gonçalves Ricardo Gonçalves

Profa. Márcia Dalastra Laurenti Márcia Dalastra Laurenti

Profa. Maria Lucia Pedrosa Maria Lucia Pedrosa

Profa. Rosa Maria Esteves Arantes (Coordenadora) Rosa Maria Esteves Arantes

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Prof. Marcelo Vidigal Callari
Subcoordenador do Programa de
Pós-Graduação em Patologia
Faculdade de Medicina / UFMG

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela perseverança de cada dia e à todos que auxiliaram neste trabalho, pela atenção, ajuda e dedicação.

Obrigada aos colegas Aldair, Daniel, Igor, Izabela, Marta, Lucélia, Rodrigo e Cezar pela ajuda.

Às estagiárias Nayara e Natália pela dedicação e ajuda dedicadas à mim e ao meu projeto.

À Isabel, minha amiga e sempre ajudante de todas as horas.

À Tatiane, pela ajuda nos inúmeros experimentos.

À Mirna, Vania, Olinda e Gislene, pela ajuda, dedicação e amizade.

À minha coorientadora e amiga Sílvia, pela atenção, paciência, dedicação a mim e ao projeto.

Ao professor Wagner, orientador, pela atenção, paciência e confiança.

Ao professor Marco Antonio (UFOP) pelas dicas para a realização das análises estatísticas.

A todos que de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui: Professor Mayrink, professora Rosa, Danilo, Nely (em memória), Elaine, Sydney.

À Maria Letícia pela amizade.

À minha mãe pela paciência comigo.

A todos, meus sinceros agradecimentos, sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Às agências financiadoras FAPEMIG, pela infraestrutura do laboratório e financiamento do projeto APQ-00068-08.

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado.

EPÍGRAFE

Tudo depende de mim

*Hoje levantei cedo pensando no que tenho
A fazer antes que o relógio marque meia noite.*

É minha função escolher que tipo de dia vou ter hoje.

Posso reclamar por que está chovendo ou agradecer às águas por lavar a poluição.

(...)

Posso reclamar sobre minha saúde ou dar graças a Deus por estar vivo.

Posso me queixar dos meus pais por não terem me dado tudo o que eu queria ou posso ser grato por ter nascido.

(...)

Posso sentir tédio com o trabalho doméstico ou agradecer a Deus.

(...)

Se as coisas não saíram como planejei posso ficar feliz por ter hoje para recomeçar.

O dia está à minha frente esperando para ser o que eu quiser.

E aqui estou eu, o escultor que pode dar forma.

Tudo só depende de mim.

(Charles Chaplin)

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT: Alanina aminotransferase
AMG: Aminoguanidina
AST: Aspartato aminotransferase
C: Cães do grupo controle
CA: Cães Assintomáticos
CAT: Catalase
CCZ: Centro de Controle de Zoonoses de Ribeirão das Neves
CETEA: Comitê de Ética em Experimentação Animal
CR3: receptor 3 do complemento
CS: Cães Sintomáticos
Cu: Cobre
CV: Células Vermelhas
DAB – Diaminobenzidina
DF: Desferal
DMEM: Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DNA: ácido desoxirribonucleico
DTPA: Ácido Dietilenotriaminopentacético
ELISA: Enzyme Linked Imunosorbent Assay
ERMO: Espécies Reativas do Metabolismo do Oxigênio
FA: Fosfatase Alcalina
Fe: Ferro
Fe²⁺ : Íon Ferroso
Fe³⁺: Íon Férrico
gp63 – Glicoproteína de 63 KD (metaloproteinase)
GSH: Glutathiona Reduzida
GSSG: Glutathiona Oxidada
GSH-Px: Glutathiona-peroxidase
HO[•]: Radical Hidroxil

ICP OES: Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente

ICP MS: Espectrometria de Massa por Plasma Acoplado Indutivamente

iNOS: Óxido Nítrico Sintase Induzida

IRE: Elementos Responsivos ao Ferro

IRP: Proteínas Reguladoras de Ferro

IL: Interleucina

ICAM: Molécula de Adesão Intercelular

Ig: Imunoglobulina

INMETRO: Instituto de Metrologia

iNOS: Enzima óxido nítrico sintase induzida

ISO: International Organization for Standardization

L1 - Calprotectina

LC: Leishmaniose Cutânea

LIT1: proteína de membrana transportadora de metal com preferência para Fe^{2+}

LMC: Leishmaniose Mucocutânea

LPG: Lipofosfoglicano

LPO: Lipoperoxidação

LPS: Lipopolissacarídeo Bacteriano LV: Leishmaniose Visceral

LVC: Leishmaniose Visceral Canina

MDA: malonaldeído

Mg: Magnésio

MHC: Complexo Maior de Histocompatibilidade

Min: minuto

Mn: Manganês

NATA: National Association of Testing Authorities

NK: Natural Killer

NO - Óxido Nítrico

O₂: Oxigênio

O⁻²: Ânion Superóxido

OH⁻: Radicais Hidroxil

OIE: Office International des Epizooties

OMS: Organização Mundial de Saúde

PBS - Phosphate Buffered Saline

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

pb: pares de bases

PGE₂: Prostaglandina

pGSH-Px: Glutathione Peroxidase Plasmática ou Extracelular

phGSH-Px: Glutathione Peroxidase Fosfolipídeo

RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta

RNA_m: RNA mensageiro

RNS: Espécies Reativas de Nitrogênio

ROS: Espécies reativas de oxigênio

S: Enxofre

s: segundos

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

Se: Selênio

SMF: Sistema Mononuclear Fagocitário

SOD: Cu-Zn Superóxido-Dismutase

TBA: Ácido Tiobarbitúrico

TBARS: Substâncias que reagem com o TBA (Thiobarbituric acid reactive substances)

TfR: Receptor de Transferrina

TH: Leishmaniose Tegumentar Humana

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

WHO: World Health Organization

Zn: Zinco

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Sequência de comandos no Software KS300 para determinação da deposição de colágeno no parênquima hepático.

FIGURA 2 - Amplificação específica do produto de PCR (fragmentos de 100bp) para *L. infantum chagasi*.

FIGURA 3 – Níveis dos elementos traço em animais controles e infectados com *L. infantum chagasi*.

FIGURA 4 - Atividades das enzimas antioxidantes no sangue ou plasma de animais controles e infectados com *L. infantum chagasi*.

FIGURA 5 - Atividades das enzimas antioxidantes nos tecidos de animais controles e infectados com *L. infantum chagasi*.

FIGURA 6 - Peroxidação Lipídica (LPO) no plasma de animais controle e infectados com *L. infantum chagasi*.

FIGURA 7 - Peroxidação lipídica (LPO) em cultura de macrófago peritoneal de cães do grupo controle suplementadas com 50 uM de

FIGURA 8 - Imagens representativas de cortes histológicos parafinados de fragmentos de fígado de cães naturalmente infectados com *L. infantum chagasi*.

FIGURA 9 - Imagens representativas de cortes histológicos de fragmentos de baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*.

FIGURA 10 - Imagens representativas de cortes histológicos de fragmento de linfonodo cervical de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*.

FIGURA 11 - Análises morfométricas do ferro (Fe) no Fígado **(A)**, Baço **(B)** e Linfonodo Cervical **(C)** de cães infectados com *L. infantum*.

FIGURA 12 - Fragmentos de Fígado de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum chagasi*. Imagens representativas da deposição de ferro tecidual coradas pelo Azul da Prússia.

FIGURA 13 - Análise morfométrica da deposição de colágeno intersticial em cães controles e infectados com *L. infantum chagasi*.

FIGURA 14 - Imagens representativas da marcação das fibras reticulares pela prata Amoniacal de Gomori em cães infectados com *L. infantum chagasi*.

FIGURA 15 - Análise morfométrica da expressão da iNOS em tecidos de cães controles e infectados com *Leishmania infantum*.

FIGURA 16 - Fragmentos parafinados de fígado de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*.

FIGURA 17 - Quantificação de Óxido Nítrico (NO) sérico em cães controles e infectados com *Leishmania infantum*.

FIGURA 18 - Detecção de Óxido Nítrico (NO) e peroxidação lipídica (LPO) em cultura de células (macrófagos de cães não infectados)

FIGURA 19 - Quantificação da calprotectina no fígado **(A)**; baço **(B)** e linfonodo cervical **(C)** em cães infectados com *Leishmania infantum*.

** .

FIGURA 20 - Fragmentos parafinados de fígado de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. Imagens representativas da imunohistoquímica para calprotectina no fígado **(A, B)**; baço **(C, D)** e linfonodo cervical **(E, F)** de cães naturalmente infectados e controle. (

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Anticorpos primários utilizados.

TABELA 2 – Avaliação histopatológica e parasitológica dos fígados de cães controles e infectados com *Leishmania infantum*.

TABELA 3 - Avaliação histopatológica e parasitológica dos baços de cães controles e infectados com *Leishmania infantum*.

TABELA 4 - Avaliações histopatológica e parasitológica do linfonodo cervical de cães controles e infectados com *Leishmania infantum*.

TABELA 5 - Correlação entre a intensidade das alterações histopatológicas e as enzimas antioxidantes do tecido ou deposição de ferro (Fe), produção de Óxido Nítrico (NO) e peroxidação lipídica (LPO) em animais infectados com *Leishmania infantum*.

TABELA 6 - Valores de TIBC; Transferrina e índice de saturação da Transferrina (%)

TABELA 7 - Correlação entre Óxido Nítrico (NO) e óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e a deposição de ferro (Fe) e prata nos animais infectados com *Leishmania infantum*.

RESUMO

Cães são os principais reservatórios domésticos da leishmaniose visceral humana, sendo também vítimas da infecção. Elementos traço, como cobre (Cu), ferro (Ferro), zinco (Zn) e selênio (Se) são encontrados em baixas concentrações no organismo dos mamíferos e atuam na maturação e função de linfócitos T e B, no desenvolvimento da imunidade inata, além de participarem de atividades antioxidantes, evitando o dano tecidual. Na resposta infecciosa frente aos parasitos do gênero *Leishmania*, macrófagos são considerados as principais células microbicidas efetoras, pois sintetizam substâncias microbicidas como espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico e que também podem promover dano tecidual. Os ERMOS são capazes de provocar lipoperoxidação. Para se proteger contra tais danos, os hospedeiros vertebrados têm amplo sistema antioxidante que compreende sequestro de metais via proteínas ou via antioxidantes não enzimáticos tais como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione-peroxidase (GSH-Px), nas quais participa o Fe, Cu, Zn e Se. O objetivo desse trabalho foi investigar as alterações dos elementos traço e suas relações com aspectos clínicos, histopatológicos e o estresse oxidativo na leishmaniose visceral canina. Trinta cães sem raça definida, adultos, de ambos os sexos, naturalmente infectados com *L. infantum*, oriundos do centro de zoonoses de Ribeirão das Neves, MG, com diagnósticos sorológicos (RIFI, ELISA) e parasitológicos (histológico, imunohistoquímico) e PCR positivos foram divididos de acordo com aspectos em: 19 cães sintomáticos e 11 assintomáticos. Outros nove cães também sem raça definida, de ambos os sexos, adultos, com testes sorológicos e parasitológicos negativos para *Leishmania* foram obtidos do município de Carandaí, MG (área não endêmica). Todos os animais foram eutanasiados com dose letal de Thiopental sódico® com sedação prévia, sendo obtidos sangue e fragmentos de fígado, baço e linfonodos cervicais. Foram avaliados no soro os elementos traço e NO, no plasma a LPO; no sangue e tecidos (fígado, baço e linfonodos cervicais), a atividade da CAT, SOD e GSH-Px, além da deposição de Fe, a fibrilopiose (fibrose) e a expressão de iNOS e da calprotectina pela imuno-histoquímica. Em todos os animais infectados observou-se uma diminuição sérica de Se, Zn e Fe e um aumento do Cu paralelamente à elevação de LPO plasmática e níveis mais baixos de CAT e GSH-Px no sangue. Em contrapartida encontrou-se elevada atividade da SOD nos animais infectados, principalmente nos sintomáticos. Nos diversos órgãos e principalmente nos tecidos dos cães sintomáticos observamos (1) baixa atividade das enzimas antioxidantes; (2) lesões intensas e frequentes, em geral caracterizadas por processo inflamatório crônico e difuso, congestão com deposição de hemossiderina e carga parasitária elevada; (3) elevada deposição de Fe tecidual associada à congestão; (4) aumento da fibrilopiose; (5) diminuição da expressão da iNOS e da produção de NO; (6) maior número de macrófagos expressando Calprotectina (L1). Correlações positivas foram encontradas entre a maior deposição de ferro e a inflamação ou fibrose e a LPO e deposição de hemossiderina, bem como negativa entre o Fe e iNOS e NO.) Em conjunto, esses dados sugerem que os aspectos clínicos traduzidos por lesões acentuadas, maior carga parasitária e menor produção de NO em cães naturalmente infectados com *L. infantum chagasi*, estão diretamente relacionados com o desbalanço dos elementos traço, principalmente do Fe e a exudação de macrófagos imaturos.

ABSTRACT

Dogs are the main domestic reservoirs acting as sources of parasites for transmission and infection of human visceral leishmaniasis. Trace elements, like copper (Cu), iron (Fe), zinc (Zn) and selenium (Se) are found at low levels in the body of mammals and participate in some immunological process as maturation as function of T and B lymphocytes, innate immunity development and acting as anti-oxidants, preventing tissue damage. The immune response against *Leishmania* parasites is especially triggered by macrophages, as these cells can produce microbicidal substances such as, reactive molecular oxygen species (ROS) and nitric oxide that can kill the parasite and promote lipoperoxidation. Vertebrate hosts have an anti-oxidant system as catalase, superóxido dismutase and glutathione-peroxidase, dependent of Fe, Cu, Zn and Se. The aim of this work was to investigate possible alterations in trace elements and correlate these alterations with clinical and histopathological aspects and oxidative stress in visceral canine leishmaniasis. To answer these questions we studied 30 mongrel adult dogs, males and females, naturally infected with *L. infantum* from control of zoonosis center in the city of Ribeirão das Neves, MG. Their positivity for the disease was assayed by serological (RIFI, ELISA) and parasitological diagnostic (histology, immunohistochemistry) and PCR. After testing positive, animals were divided in 2 groups based on clinical features: 19 dogs were symptomatic and 11 were asymptomatic. Control animals were obtained from a nonendemic geographical area, Carandaí, MG and tested negative for *Leishmania* in all assays mentioned above. All the animals were sedated, then euthanized with a lethal dose of Thiopental sodium®. Samples of blood and fragments of liver, spleen, and cervical lymph node were obtained. The trace elements and NO were tested in the serum, the LPO in the plasma, the activity of anti-oxidant enzymes CAT, SOD and GSH-PX were measured in the blood and tissues. We also did some histochemical stainings to detect iron deposition and to visualize fibrotic areas. Finally, we did immunohistochemistry for iNOS and immature macrophage detection (calprotectin). When we analyzed trace elements, we observed a reduction in the serum levels of Se, Zn and Fe and an increase in Cu levels. At the same time there was an increase in plasma levels of LPO and a decrease in the blood levels of the enzymes CAT and GSH-Px. In spite of these results, we detected a higher activity of SOD enzyme in infected animals, especially the symptomatic ones. Regarding the organs and tissues of symptomatic animals, we found a decrease in the activity of anti-oxidant enzymes and innumerable macroscopic lesions: as a consequence of an intense, diffuse and chronic inflammatory process as (1) congestion and deposition of hemosiderin with a high parasitic load; (2) congestion associated with high levels of iron deposition ;(3) increase in fibrilopoiesis; (4) decrease in the levels of iNOS and NO (5) high number of L1 positive macrophages. We found some positive correlations between iron deposition and degree of inflammation/fibroses and LPO and hemosiderin deposition. However there is a negative correlation between iron deposition and iNOS and NO. Together, these data suggest that the clinical status marked by injuries, higher parasite burden and lower NO production in dogs naturally infected with *L. infantum chagasi*, are directly related to the imbalance of trace elements, especially Fe, oxidative stress and exudation of immature macrophages.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	VII
EPIGRAFE	ERRO!
INDICADOR NÃO DEFINIDO.II		
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	XII
LISTA DE TABELAS	XIII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
1- INTRODUÇÃO	- 18 -
1.1 - AS LEISHMANIOSES	- 18 -
1.2 ASPECTOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC)	- 21 -
1.3 DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DA LVC	- 22 -
1.4 ELEMENTOS TRAÇO E RESPOSTA IMUNE	- 24 -
1.4.1 COBRE.....		24
1.4.2 ZINCO.....		25
1.4.3 SELÊNIO.....		27
1.4.4 FERRO.....		29
1.5 LEISHMANIOSES E ELEMENTOS TRAÇO	- 31 -
1.6 LVC – IMUNIDADE E DEFESAS ANTIOXIDANTES	- 34 -
1.7 O FE IMPLICADO NA INJURIA TECIDUAL E SUSCETIBILIDADE	- 37 -
-		
1.8 LVC – ERMO E LESÕES TECIDUAIS	- 38 -
-		
1.9 JUSTIFICATIVA	- 39 -
2- OBJETIVO	- 41 -
3 METODOLOGIA	- 42 -
3.1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....		42
3.2 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	42
3.3 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL	43
3.3.1 COLETA DE SORO, PLASMA E FRAGMENTOS DE ÓRGÃOS	43
3.3.2 EXAMES PARASITOLÓGICOS.....		44
3.3.2.1 ESFREGAÇO POR EXTENSÃO.....		44
3.3.2.2 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO PELA PCR.....		44
A. -EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDOS.....		44
B - PCR CONVENCIONAL.....		45
3.3.3 - DETECÇÃO SOROLÓGICA DOS ELEMENTOS TRAÇO.....		47
3.3.4 - MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SOD, CAT E GSH-Px.....		47
3.3.4.1 - ATIVIDADE DA CATALASE.....		48
3.3.4.2 - ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).....		48
3.3.4.3 - ATIVIDADE DA GSH-Px (KIT CAYMAN).....		48
3.3.5 – CULTURA DE CÉLULAS	49
3.3.6.- DOSAGEM DE NITRITO SÉRICO COMO MEDIDA INDIRETA DA PRODUÇÃO DE NO (MÉTODO DE GRIESS).....		49
3.3.7 - DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO) PELA MEDIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS TIOBARBITÚRICAS ÁCIDO-REATIVAS (TBARS).....		50
3.3.8 - AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS ÓRGÃOS - HEMATOXILINA & EOSINA (H&E).....		51

3.3.9 TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE PARASITOS NOS ÓRGÃOS E EXPRESSÃO INOS E DE CALPROTECTINA (L1).....	52
3.3.10. – AVALIAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DE FERRO TECIDUAL.....	53
3.3.11- ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	53
3.3.12 – AVALIAÇÃO DA FIBROSE TECIDUAL POR PRATA AMONIACAL DE GOMORI.....	54
3.3.13 - ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA MARCAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA PARA, L1, INOS E HISTOQUÍMICA PARA FERRO E PRATA TECIDUAL.....	55
3.3.14 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
4 RESULTADOS	- 57 -
4.1 ANÁLISE SOROLÓGICA E PARASITOLÓGICA.....	57
4.2- ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE ELEMENTOS TRAÇO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	58
4.3 - PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO) – MENSURADA COMO TBARS.....	61
4.4 ASPECTOS HISTOLÓGICOS E PARASITOLÓGICOS.....	62
4.4.1. FÍGADO.....	62
4.4.2 - ALTERAÇÕES ESPLÊNICAS.....	67
4.4.3 - ALTERAÇÕES NO LINFONODO CERVICAL.....	72
4.5 DEPOSIÇÃO TECIDUAL DE FE	77
4.6 ANÁLISE DO TIBIC, TRANSFERRINA E ÍNDICE DA SATURAÇÃO DA TRANSFERRINA.....	81
4.7 ALTERAÇÕES DA MATRIZ EXTRACELULAR	81
4.8 EXPRESSÃO E ATIVIDADE DA INOS.....	85
4.9 CARACTERIZAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DA CALPROTECTINA.....	90
..	
5. DISCUSSÃO	94
6 CONCLUSÕES	109
7-REFERÊNCIAS	110
ANEXO 1 - CETEA	135

1- INTRODUÇÃO

1.1 - As Leishmanioses

As leishmanioses caracterizam-se por um grupo de doenças causadas por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. São endêmicas em 88 países (21 do Novo Mundo e 66 do Velho Mundo). Constituem um grave problema de Saúde Pública, com prevalência global estimada em 14 milhões de casos e incidência anual de 1,5-2,0 milhões de casos, sendo 1,0 a 1,5 milhões de leishmaniose cutânea (LC) e 500 mil casos de leishmaniose visceral (LV) (Desjeux 1996; WHO/OMS 2011). Destes, cerca de 90% estão concentrados em países do subcontinente indiano (Índia, Bangladesh e Nepal), além de Sudão e Brasil (Alvar et al. 2004; Desjeux 2004; WHO/OMS 2011). Dentre os indivíduos acometidos, cerca de 50.000 evoluem para o óbito, o que torna a LV a segunda doença mais grave causada por um protozoário, número menor somente que os apresentados pela malária. A LV é a forma grave e sistêmica, sendo fatal quando não tratada, com estimativa de 50 mil mortes anuais (WHO/OMS 2011). Cerca de um terço da população mundial reside em áreas endêmicas da doença (Alvar et al. 2012).

De acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida, com os hospedeiros invertebrados e com os reservatórios, a LV pode apresentar caráter antroponótico em alguns países ou regiões, como na Índia, Nepal, Sudão, Kênia e nordeste da China, onde o homem é o reservatório do parasito; ou zoonótico, como nos países europeus, nas Américas Central e do Sul, inclusive no Brasil, onde os principais reservatórios do parasito são membros da Família Canidae, em especial o cão doméstico (*Canis familiaris*) (WHO/OMS 2011). Estudos pioneiros realizados por Chagas et al (1937, 1938), na região norte do Brasil, evidenciaram a existência de cães naturalmente parasitados em paralelo com a infecção humana. Todavia, a leishmaniose canina no Brasil só teve relevância quando foi estudada em uma área de grande endemicidade: o nordeste brasileiro. De fato, no Ceará, Deane & Deane (1955) e Deane (1956), em estudo comparativo entre a infecção humana e canina, encontraram protozoários do

gênero *Leishmania* na pele de 16,3% dos indivíduos e em 77,6% dos cães naturalmente infectados. Além disso, Deane (1956) verificou que a infecção experimental de flebotomíneos era mais frequente e intensa quando os insetos se alimentavam em cães (75%) do que em pacientes humanos (28,5%). Estas observações, bem como as de outros trabalhos que investigaram a doença canina em outras áreas endêmicas de LV humana no Brasil (Brener 1957; Alencar 1959; Iversson et al. 1983; Marzochi et al. 1985) mostram o cão como a principal fonte de infecção para os flebotomíneos.

Assim, no Brasil, bem como no mundo, esses animais são considerados alvos estratégicos para medidas de controle da doença (Alvar et al. 2004; Baneth et al. 2008; Moreno & Alvar 2002). Atualmente, a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) está em expansão e urbanização devido aos problemas sócio-econômicos agravados nos últimos anos e que forçam o êxodo rural. Tem como determinante epidemiológico a movimentação de pessoas e animais domésticos de áreas endêmicas para áreas onde o inseto transmissor já se encontrava adaptado. Esse fator associa-se à falha no controle do inseto e à presença do reservatório doméstico - o cão. (Michalick et al. 1993; Tesh 1995). Os tratamentos atualmente empregados em cães causam apenas uma remissão temporária dos sintomas, mas não a cura parasitológica (Nieto et al. 2003).

A infecção canina, geralmente, precede o aparecimento de casos humanos e é ainda mais prevalente que a LV humana. No âmbito doméstico, a maioria dos cães com sorologia reagente não apresenta sinais clínicos, entretanto, podem, como reservatórios, infectar os flebotomíneos (Moreno & Alvar 2002; Silva et al. 2005). No ambiente silvestre, os principais reservatórios são também canídeos, destacando-se as raposas *Cerdocyon thous* e *Lycalopex vetulus* (Voltarelli et al. 2009). No novo Mundo, gambás *Didelphis marsupialis* (Corredor et al. 1989; Zulueta et al. 1999) e ratos *Rattus rattus* (Zulueta et al. 1999) foram encontrados naturalmente infectados com *L. chagasi*, sendo também incriminados como reservatórios silvestres da LV. Portanto, a presença peridomiciliar de animais domésticos e sinantrópicos possui grande importância na manutenção do inseto vetor *Lutzomyia longipalpis* (Desjeux 2004).

A *Leishmania (Leishmania) donovani* constitui o agente etiológico da LV na Índia, Paquistão, China Oriental, Bangladesh, Nepal, Sudão e Quênia; a *L. (L.) infantum* na região do Mediterrâneo e *L. (L.) chagasi* no Novo Mundo (Guerin et al. 2002). As duas últimas espécies são consideradas coespecíficas dentro do complexo *L. donovani* de acordo com estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares (Maurício et al. 2000). No Brasil, a LV é transmitida pela picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e gênero *Lutzomyia*, cujo principal vetor é *Lutzomyia longipalpis*. A *L. infantum* é um parasito digenético cujo ciclo biológico se inicia no momento em que fêmeas do vetor realizam o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado. Nesse momento, pode ocorrer a ingestão de formas amastigotas do parasito, existentes no citoplasma de células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), principalmente macrófagos presentes na derme, juntamente com componentes do repasto sanguíneo. Uma vez no intestino médio do flebótomo, essas formas amastigotas se diferenciam nas chamadas promastigotas procíclicas que são móveis, capazes de se aderir ao epitélio do tubo digestivo e se multiplicar por divisão binária (Alexander et al. 2007). Essas formas possuem uma camada de moléculas de lipofosfoglicanos (LPG) em sua superfície. Durante a metaciclogênese, extensa modificação estrutural envolvendo o tamanho e a expressão de LPG, transforma essas formas em promastigotas metacíclicas infectantes. A expressão de grande quantidade de LPG na superfície do parasito, bem como de outros glicoconjugados como a metaloprotease de 63 KD- (gp63), é capaz de protegê-lo da ação das enzimas hidrolíticas no trato digestório do vetor e de produtos de defesa produzidos por células dos hospedeiros vertebrados como espécies reativas de oxigênio (ERMOS) (Killick-Kendrick 1990; Alexander et al. 1999; Cunningham 2002).

Em nova alimentação, as formas promastigotas metacíclicas infectantes são depositadas na derme do próximo hospedeiro, junto à saliva do inseto, sendo internalizadas por macrófagos, processo mediado por receptores (Cunningham 2002; de Almeida 2003). As formas promastigotas se diferenciam em amastigotas nos fagolisossomas. Dentro das células do SMF, as amastigotas multiplicam-se por divisão binária até rompimento da célula hospedeira, com posterior infecção de novas células.

Ao realizar nova hematofagia, o flebotomíneo ingere os macrófagos infectados, perpetuando, assim, o ciclo biológico.

1.2 Aspectos Clínicos e Histopatológicos da Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

Os sinais clínicos da LVC são inespecíficos, de grande espectro e bem similares aos do homem, resultantes das complexas interações parasito-hospedeiro envolvendo: espécie dos parasitos do gênero *Leishmania*, resposta imune e aspectos genéticos do hospedeiro (Alvar et al. 2004). Segundo Barbiéri (2006), a infecção sintomática está associada com a crescente produção de anticorpos e imunorregulação negativa da resposta celular com a decrescente produção de interleucina IL-2, interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Assim, os animais sensíveis à LVC estabelecem resposta imune predominantemente humoral caracterizada por hipergamaglobulinemia policlonal, ineficiente para a eliminação do parasito.

Os sinais clínicos mais comumente observados na LVC são as alterações dermatológicas como onicogribose, descamação (alopecia), dermatite esfoliativa e úlceras (principalmente no focinho e orelha) e as linfadenopatias. Outros sinais concomitantes são: a hepatoesplenomegalia, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, melena ou hematoquesia, edema das patas, vômito, além da emaciação muscular. Pode ocorrer febre irregular por longos períodos, anemia, perda progressiva de peso e na fase final da infecção ocorrem em geral paraparesia, caquexia, inanição e óbito do animal (Abranches et al. 1991; Brener 1957; Deane & Deane 1955; Genaro 1993; Marzochi et al. 1985; Slappendel & Greene 1990, Solano-Gallego et al. 2009).

Os órgãos acometidos na LVC em geral apresentam uma reação inflamatória crônica caracterizada por infiltrado celular predominantemente constituído por plasmócitos, macrófagos e linfócitos (plasma histiolinfocitário). Os macrófagos por sua vez podem se diferenciar em células epitelióides formando arranjos especiais denominados granulomas epitelióides. São descritas lesões acometendo órgãos como fígado, baço, linfonodos, pulmões, medula óssea, rins, intestinos, tegumento e vasos (Tryphonas et al. 1977; Anosa & Idowu 1983; Keenan et al. 1984; Ferrer et al. 1988,

1991; Genaro 1993; Tafuri et al. 1996,2001; Silva et al. 2002; Solano-Gallego et al. 2004; Lima et al. 2004;). A medula óssea encontra-se hiperplásica, podendo ou não conter parasitos (Keenan et al. 1984).

O crescimento dos linfonodos é atribuído ao aumento do número e do tamanho dos folículos linfóides e a marcante hiperplasia e hipertrofia dos macrófagos da região medular do órgão (Lima et al. 2004). Os parasitos podem provocar lesões hepáticas induzindo alterações na morfologia dos hepatócitos e conseqüentemente no metabolismo do órgão (Alvar et al. 2004; Solano-Gallego et al. 2009). Alterações no baço são variáveis. Os parasitos induzem uma desorganização na estrutura celular do órgão, com a hiperplasia da polpa branca e polpa vermelha que determinam esplenomegalia em graus variados, formação de granulomas e atrofia de folículos linfóides (Alvar et al. 2004; Santana et al. 2008). A esplenomegalia parece ser associada, também, ao aumento da celularidade do órgão, em especial no número de monócitos e macrófagos, associado com alterações na estrutura da microvasculatura e aumento do número das fibras reticulares (Santana et al. 2008). Baneth et al. (2008) relatam que esta alteração está presente em cerca de 10 a 53% dos casos.

1.3 Diagnóstico e classificação clínica da LVC

Um diagnóstico acurado de LVC geralmente é multilaboratorial, e só é possível de ser estabelecido após proceder a cuidadoso exame físico, testes sorológicos, exames parasitológicos, além dos laboratoriais de rotina, como hemograma, provas bioquímicas e urinálise (Alvar et al. 2004; Solano-Gallego et al. 2009). Dentre os testes sorológicos destacam-se a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), que em diferentes estudos demonstra sensibilidade variando de 83% a 100%, e especificidade, dependendo da região geográfica em que o teste é aplicado, entre 74% a 100% (Almeida et al. 2005; da Silva et al. 2006) e “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ELISA), cuja sensibilidade oscila entre 97% a 100% e especificidade de 88% a 100%, quando são usados antígenos brutos (Rosario et al. 2005). Para Gradoni (2002) a RIFI é considerada padrão ouro para o diagnóstico sorológico da LVC, pois além de ser o teste mais utilizado por pesquisadores europeus

nos últimos anos, é também a técnica recomendada pelo “Office International Epizooties” (OIE).

Os exames parasitológicos são fundamentados na demonstração de formas amastigotas de *Leishmania* em material biológico obtido por esfregaços de aspirados de medula óssea, baço e linfonodos, por aposição de fragmentos de pele ou de outros tecidos, e indiretamente, pelo isolamento dos parasitos presentes nestes materiais, em meio de cultura (Alvar et al. 2004; Barrouin-Melo et al. 2006; Gradoni 2002).

O exame histopatológico de fragmentos da pele e linfonodos pode ser usado como método de diagnóstico, mas deve-se ter em mente que o infiltrado inflamatório encontrado não é específico e que o diagnóstico de positividade será estabelecido mediante encontro das formas amastigotas (Alvar et al. 2004). As técnicas de imuno-histoquímica pode melhorar a visualização do parasito, pois anticorpos específicos marcados detectam com maior sensibilidade e especificidade as formas amastigotas nos tecidos (Tafari et al. 2004; Baneth & Aroch 2008; Maia & Campino 2008).

O diagnóstico molecular realizado, sobretudo pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), é baseado na amplificação de uma sequência conhecida de oligonucleotídeos específicos do patógeno. Este teste é altamente sensível e específico para *Leishmania*, e sua sensibilidade está diretamente relacionada ao alvo, e conseqüentemente ao número de cópias de DNA (ácido desoxirribonucleico) amplificado. A grande vantagem de sua utilização no diagnóstico da LVC é a possibilidade do uso de grande variedade de materiais clínicos, como sangue, aspirados de medula ou linfonodos, biópsias de pele, urina, dentre outros (Maia & Campino 2008; Miró et al. 2008). Recentemente, tem sido proposto o uso da PCR em amostras coletadas na conjuntiva de cães, com auxílio de *swab*. Esta técnica, além de apresentar alta sensibilidade e especificidade, é ainda de abordagem não invasiva, o que possibilita seu uso em inquéritos epidemiológicos, devido a simplicidade para coleta das amostras no campo (Ferreira et al. 2008; Gramiccia et al. 2010; Strauss-Ayali et al. 2004).

1.4 Elementos Traço e Resposta Imune

Os elementos considerados como traço são os que apresentam concentrações da ordem de $0,01 - 100 \mu\text{g/g}^{-1}$ (Cornelis 1985). Cerca de 24 elementos foram classificados como essenciais para a vida e muitos foram considerados como participantes de diversas patologias (Andrasi et al. 1995). Esses elementos participam de muitos processos biológicos e atividades enzimáticas antioxidantes as quase tem a função de desfazer as “espécies reativas do metabolismo do oxigênio” (ERMOs) evitando o dano tecidual (Miller 1985; Chandra 1997; Scrimshaw & SanGiovanni 1997; Erickso et al. 2000; Catherine et al. 2002). Além disso, os elementos traço apresentam uma relação importante no desenvolvimento da imunidade inata e adaptativa, atuando na produção, maturação e função de células como macrófagos, células “natural killer” (NK), neutrófilos, células B e T (Erickson et al. 2000; Ibs & Rink 2003). Essas células requerem suplementação adequada de alguns elementos traço para expressão, preservação da estrutura, função de metaloproteínas e produção de energia (como ferro (Fe) nos citocromos a, b e c, NADH e succinato desidrogenase) (Erickson et al. 2000; Linder 2001).

A redistribuição dos elementos traço foi relacionada à diminuição de resistência às doenças e às falhas na resposta imune ou das funções leucocitárias. Desta forma, o estado nutricional foi considerado determinante da resposta imune (Chandra 1997; Scrimshaw & San Giovanni 1997; Erickson et al. 2000; Field et al. 2002; Faryadi et al. 2003; Weyenbergh et al. 2004). Infecções agudas e crônicas podem alterar o metabolismo e níveis dos elementos traço, através do sequestro hepático de Fe e Zn e aumento de ceruloplasmina, que, por sua vez, aumenta o Cobre sérico, modificando os níveis destes elementos no soro (Miller 1985). Neste trabalho investigamos o papel do cobre (Cu), zinco (Zn); selenio (Se) e ferro (Fe), elementos que iremos descrever a seguir:

1.4.1 Cobre

Cofator essencial de enzimas que participam do processo de óxido redução, como citocromo c oxidase, superóxido desmutase, catecol oxidase, dopamina-b-

monoxigenase, dentre outras. (Fuentealba & Aburto 2003). Em geral o cobre encontra-se complexado a proteínas, peptídeos, aminoácidos e outras substâncias orgânicas, sendo necessário às atividades estruturais e catalíticas das metaloenzimas que o contêm (Linder et al. 2001; Alexandrova et al. 2003). Cerca de 70% do cobre absorvido encontra-se ligado a ceruloplasmina ou ferroxidase (glicoproteína de fase aguda), enzima capaz de ligar 6 a 7 átomos de cobre em 3 sítios quimicamente distintos e transportá-lo para o fígado, possuindo também a função de oxidação do Fe^{2+} em íon férrico (Fe^{3+}) possibilitando seu transporte plasmático pela transferrina (Linder et al. 2001; Bonham et al. 2002). Alguns defeitos metabólicos como Síndrome de Menkes e Doença de Wilson, gravidez e inflamação, influenciam no metabolismo do cobre (Miller 1985; Percival 1998; Bonham et al. 2002; Fuentealba & Aburto 2003).

A deficiência de cobre é frequentemente resultado de uma dieta inadequada, síndromes de má absorção, condições que predispõe uma grande perda do elemento ou que aumentam a sua necessidade (Percival 1998).

Já o aumento da concentração sérica deste elemento é relatado em resposta ao estresse, inflamação e infecção, na doença de Parkinson, diabetes mellitus e em condições envolvendo obstrução do fluxo da bile (Percival 1998; Bonham et al. 2002, Fuentealba & Aburto 2003). Esse aumento de Cu pode ser prejudicial ao organismo sendo associado a danos oxidativos nos tecidos através da formação de ROS (Huang et al. 2001).

Alterações dos níveis séricos de cobre têm sido relatadas durante o processo inflamatório (Klassing et al. 1987; El-Khoyl et al. 1990; Mastousek et al. 1993; Kocyigit et al. 1998; Faryadi & Moheballi 2003), assim como uma relação com o aumento da síntese da ceruloplasmina como estratégia de defesa do organismo induzidas por substâncias liberadas por macrófagos ativados, como IL-1, TNF- α e IL-6 (Percival 1998; Bonham et al. 2002).

1.4.2 Zinco

O Zn é um elemento essencial amplamente encontrado na natureza, sendo, após o Fe, o segundo mais abundante no corpo. Possui três grandes papéis biológicos no

corpo: catalítico, estrutural e regulador. É cofator de mais de 300 enzimas, como anidrase carbônica, fosfatase alcalina (FA) e superóxido dismutase (SOD), atuando como componente catalítico ou como constituinte estrutural (Chandra et al. 1984; Shankar & Prasad 1998; Rink e Haase 2006; Stefanidou et al. 2006; Yanagisawa & Yakugaku 2008). O Zn tem papel fundamental no metabolismo dos ácidos nucleicos e de proteínas e, por consequência, nos processos de multiplicação celular uma vez que fatores de transcrição e replicação são Zn dependentes. Além disso, a estabilidade do RNA mensageiro (RNA_m) é influenciada pelo Zn (Shankar & Prasad 1998; Stefanidou et al. 2006; Yanagisawa & Yakugaku 2008). Durante períodos de gravidez, amamentação e crescimento há um maior requerimento deste elemento, uma vez que ele é necessário à proliferação das células, sendo fundamental ao desenvolvimento e manutenção dos sistemas com alta proliferação celular como a pele, sistema imune e reprodutor (Chandra et al. 1984; Shankar & Prasad 1998). Apresenta ainda, participação na biossíntese e manutenção da integridade do tecido conjuntivo (Yanagisawa & Yakugaku 2008).

Boa parte do zinco contido na dieta é absorvida no duodeno, sendo, então, mobilizado no fígado por uma proteína carreadora específica, denominada metalotioneína que regula a homeostase do Zn e sua disponibilidade (Chandra et al. 1984; Rink & Haase 2006). O zinco, não é estocado em nenhum órgão. Ele constitui um "pool" móvel, comandado pela metalotioneína que o mobiliza para um tecido ou órgão de maior demanda (Shankar & Prasad 1998).

Durante a deficiência de zinco ocorre diminuição da quantidade de neutrófilos, células NK e macrófagos, bem como do recrutamento, da capacidade fagocítica e citotóxica destas células (Shankar & Prasad 1998; Rink & Haase 2006; Yanagisawa & Yakugaku 2008). O papel essencial deste elemento na imunidade relaciona-se ao desenvolvimento de células T, visto que sua deficiência leva a uma atrofia tímica, por ser cofator da timulina, hormônio secretado pelas células epiteliais do timo que induz a diferenciação de células T imaturas. Este elemento também modula secreção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico e induz proliferação de células T CD8⁺ em combinação com IL-2 (Shankar & Prasad 1998), anergia, redução da resposta linfoproliferativa à mitógenos. Estas mudanças são reversíveis após

suplementação de zinco, sendo também um importante adjuvante em vacinas (Shankar & Prasad 1998; Yanagisawa & Yakugaku 2008). Em relação à produção de citocinas, este elemento traço está relacionado à manutenção do equilíbrio entre as células T “*helper*” (Th1 e Th2), induzindo a produção de IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ , além de aumentar a expressão de receptores de alta afinidade para IL-2 nas células mononucleares do sangue periférico (Shankar & Prasad 1998).

Vários autores sugerem que a hipozincemia encontrada entre indivíduos infectados por *Leishmania* ou com qualquer outro processo inflamatório, seja resultado de uma redistribuição sérica de Zn no organismo, assim como no caso do Cu e Fe, induzido principalmente por citocinas como IL-1, IL-6 e glicocorticóides, ativando a síntese hepática de metalotioneína (Rofe et al. 1996; Mocchegiani et al. 1995, 2000).

1.4.3 Selênio

O selênio é um elemento traço que, a partir da década de 50 e após avaliação de suas diversas funções, foi reconhecido como essencial ao organismo humano. Cerca de 30 selenoproteínas foram identificadas, mas apenas 12 foram caracterizadas. É caracterizado por sua versátil capacidade de oxiredução, sendo tal característica fundamental para sua atuação no centro ativo da enzima glutationa-peroxidase, responsável pela eliminação de peróxidos. O selênio se encontra incorporado em proteínas na forma dos aminoácidos L-selenocisteína e L-selenometionina, em tecidos animais (Turner & Finch 1991; Kiremidjian-Schumacher & Roy 1998; Mckenzie et al. 1998; Combs 2001).

O nível de selênio nos produtos agrícolas varia proporcionalmente ao teor do elemento no solo onde são cultivados e são refletidos nos níveis séricos deste elemento na população (Combs 2001). Os alimentos contêm formas orgânicas de selênio como a selenometionina e a selenocisteína, mas muitos experimentos que utilizam suplementação têm usado formas inorgânicas como selenito, embora as orgânicas sejam melhor biodisponibilizadas no organismo. Entretanto o selenito reage rapidamente com a glutationa peroxidase presente nos eritrócitos para formar as

selenoglutationas, ou seja, ativando a enzima que possui atividades anticarcinogênicas e induz apoptose de células tumorais humanas (Mckenzie et al. 1998; Combs 2001).

A primeira selenoenzima identificada foi a glutathiona peroxidase, sendo provavelmente a principal enzima na proteção contra danos oxidativos (Thomson et al. 1977; Turner & Finch 1991). A glutathiona peroxidase inibe enzimas inflamatórias, como a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e a proteína C kinase, e atua na síntese de metabólitos do ácido araquidônico, na síntese de lipoxinas, prostaglandinas e leucotrienos, reduzindo os lipoperóxidos, cujo acúmulo prejudica a síntese de prostaciclina e promove um aumento de tromboxana, que leva a uma maior agregação plaquetária nas doenças cardiovasculares (Mackenzie et al. 1998). A ação antioxidante da glutathiona peroxidase é responsável pela redução dos danos no DNA provocados pelos radicais livres, e pela modulação de enzimas que atuam na degradação de xenobióticos envolvidos no metabolismo carcinogênico, reduzindo o impacto de substâncias carcinógenas exógenas provenientes da dieta e prevenindo a degeneração do tecido e a ocorrência de doenças cardiovasculares. Na deficiência do elemento selênio há diminuição na atividade da glutathiona peroxidase. (Kiremidjian-Schumacher & Roy 1998).

Outro papel do selênio é atuar na regulação da expressão de receptor para IL-2 de alta afinidade nas células T, na proliferação e na citotoxicidade destas células (Roy et al. 1994; Mackenzie et al. 1998). De fato, uma diminuição da imunidade celular relativa à idade pode ser parcialmente revertida com suplementação de selênio aumentando a resposta para IL-2 (Roy et al. 1994). Experimentos com suplementação de selênio demonstram um aumento da atividade de células NK, macrófagos e células T citotóxicas, em camundongos e humanos (Mackenzie et al. 1998). O selênio regula positivamente a apoptose em células tumorais *in vitro*, aumenta a atividade fagocitária dos macrófagos e protege o DNA de danos oxidativos; além de ter ação anti-angiogênica e anti-aterogênica (Fleming et al. 2001). (Turner & Finch 1991; Kiremidjian-Schumacher & Roy 1998). Kocyigit et al. (1999a) observaram diminuição sérica de selênio associada a menor atividade da glutathiona peroxidase em indivíduos com leishmaniose cutânea, comparados com indivíduos saudáveis.

1.4.4. Ferro

O ferro é um mineral vital para a homeostase celular e o mais abundante no corpo humano (Grotto 2008). Grande parte do ferro do organismo está dentro das células ligado à hemoglobina (70%), mioglobina (4%), enzimas contendo ferro (<1%) ou na forma de estoque, como ferritina (proteína citoplasmática solúvel de estocagem do ferro) e hemossiderina (corresponde à forma degradada da ferritina, permitindo que o ferro forme agregado) (25%). Uma pequena fração pode ser encontrada no plasma (0,1%) ligado à transferrina (Bricks et al. 1994). O fígado e o baço são os principais órgãos de estoque de ferro, contendo cerca de 60% de ferritina, que é diariamente utilizada quando há necessidade de suprir demanda das células mediante uma ingestão insuficiente deste elemento (Andrews 2005). O ferro utilizado é obtido da dieta e da reciclagem de hemácias senescentes e é regulado pela necessidade do organismo (Bricks et al. 1994; Beard 2001; Grotto 2008).

Um suprimento adequado de ferro é necessário para muitos processos biológicos, tais como reações de transferência de elétrons, regulação gênica, ligação e transporte de oxigênio, regulação do crescimento e diferenciação celular (Beard 2001). Entretanto seu excesso pode provocar danos teciduais e favorecer o crescimento intracelular de patógenos (Bricks et al. 1994; Cardier et al. 1995). A homeostase do ferro envolve regulação da sua absorção, distribuição pela transferrina ou pela lactoferrina, estocagem em ferritina, incorporação em proteínas e regulação da sua liberação pelos transportadores para outras células ou órgãos (Bricks 1994; Beard 2001; Grotto 2008).

O ferro é distribuído em 3 compartimentos dentro da célula: de transporte (Fe^{+2} livre); funcional e de estocagem (Andrews 2005). Sendo essencial ao organismo e ao mesmo tempo apresentando uma toxicidade potencial às células, faz-se necessário um esquema regulador sofisticado e complexo, a fim de suprir a demanda celular e impedir um acúmulo deletério deste elemento (Bricks et al. 1994; Beard 2001; Grotto 2008). Para evitar excesso de ferro livre ou falta dele dentro da célula a homeostase do ferro é regulada por dois mecanismos principais: um deles intracelular, de acordo com a quantidade de ferro que a célula dispõe, e o outro sistêmico, onde o hormônio hepcidina

tem papel crucial promovendo uma comunicação entre os locais de absorção, utilização e estoque no organismo, uma vez que este não possui mecanismo específico para eliminar o excesso de ferro (Grotto 2008, 2010).

Na regulação intracelular do ferro participam proteínas reguladoras (IRP-1 e IRP-2) juntamente com estruturas em forma de alças presentes nas regiões não codificadoras do RNA_m, conhecidas como elementos responsivos ao ferro (IRE) IRE são sequências de RNA_m constituídas de 30 nucleotídeos altamente conservados. Estão localizados na região não codificadora 5' do RNA_m da ferritina, do primeiro precursor da hemoglobina, da aconitase mitocondrial (do ciclo de Krebs) e da ferroportina ou ainda na região não codificadora 3', local onde várias cópias de IRE estão presentes no RNA_m do receptor da transferrina (Grotto 2008, 2010).

Quando os IREs estão localizados na extremidade 3', a ligação com as IRPs protege o RNA_m da degradação e prossegue a síntese proteica. A ligação da IRP com o IRE localizado na extremidade 5' inibe a tradução do RNA_m em proteína, diminuindo sua síntese (Weiss et al 1999, Weiss 2005) A afinidade da IRP ao IRE depende da quantidade de ferro dentro da célula. (Bricks 1994; Grotto 2008, 2010). Na deficiência do Fe o complexo IRP-IRE bloqueia a extremidade 5' e seus produtos, enquanto sua ligação na extremidade 3' resulta no aumento da expressão do receptor de transferrina (TfR) (prolongando a vida do RNA_m). Ao contrário, o aumento de Fe intracelular reduz a afinidade de IRP e IRE, não havendo repressão à tradução da extremidade 5' e à limitação da produção da transferrina (Weiss et al 1999; Weiss 2002, 2005; Grotto 2008, 2010).

O ferro é importante para vários mecanismos de resposta imunológica, como a produção de intermediários reativos de oxigênio, NO e a capacidade citotóxica dos fagócitos (Alford et al. 1991; Bricks 1994; Cunningham-Rundles et al. 2000). Sua deficiência aumenta a suscetibilidade às infecções através da atrofia do timo, e reduz a reação de hipersensibilidade tardia (Omara & Blakley 1994; Bricks 1994), além de diminuir a atividade das células NK, diminuir a produção de IL-1, IL-2, IFN- γ e TNF- α (Omara & Blakley 1994), diminuir o número de linfócitos T e de sua blastogênese e mitogênese (Kuvibidila et al. 1999). Porém, não afeta a produção de neutrófilos, altera apenas sua atividade por reduzir a atividade da mieloperoxidase (Spear & Sherman

1992; Bricks 1994; Beard 2001). A biodisponibilidade do ferro e seu transporte para o interior das células influencia sua diferenciação via receptor de transferrina, sendo este um possível mecanismo que explica um dos efeitos da deficiência de ferro no sistema imunológico (Beard 2001). A imunidade humoral parece ser menos afetada pela deficiência de ferro que a imunidade celular, já que, em indivíduos com carência de ferro ocorre preservação da produção de anticorpos em resposta a imunização com vários antígenos (Hallquist et al. 1992).

Citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-10, em especial IL-1, IL-6 e IFN- γ) influenciam o movimento do ferro no organismo através das IRPs, reduzindo seu *pool* intracelular disponível ao diminuir o receptor de transferrina na superfície da célula, aumentando os estoques de ferritina e ativando os sistemas de síntese de NO, isto leva à diminuição sérica do ferro e aumento da resposta Th1 (Murray et al. 1978; Kochanowski & Sherman 1985; Hallquist et al. 1992; Brock & Mulero 2000; Grotto 2008). Por outro lado, o aumento de ferro livre pode modular a resposta imunológica para o tipo Th2 ao inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos, além de reduzir a expressão do complexo maior de histocompatibilidade do tipo II (MHC-II) e a expressão de molécula de adesão intercelular (ICAM) (Weiss et al. 1994, 1999; Weiss 2002, 2005). Como consequência, macrófagos perdem sua capacidade microbicida, em parte devido redução da produção de NO, que por sua vez como “*feedback*” de regulação pode atuar no complexo das IRPs e diminuir o ferro livre e sua atuação (Weiss et al. 1999; Weiss 2005). Pelo exposto acima, o efeito do ferro livre sobre a atividade do IFN gama afeta o balanço das respostas Th1/Th2, condição não favorável nas neoplasias e infecções, resultando em processos crônicos.

1.5 Leishmanioses e elementos traço

Vários trabalhos descrevem o papel dos elementos traço e as leishmanioses considerando diversos fatores como, estado nutricional do hospedeiro vertebrado, gravidade da doença, resposta imune e a resposta ao tratamento com antimoniatos em humanos (Dye & Williams 1993; Kocyigit et al. 1998a, 1998b, 1999a, 1999b; Anstead et al. 2001; Faryadi et al. 2003; Nieto et al. 2003; Weyenbergh et al. 2004). Por exemplo, Weyenbergh et al. (2004) demonstraram deficiência de Zn em pacientes com LV, LC, e

leishmaniose mucocutânea (LMC), além de correlação positiva da resposta imune humoral entre os grupos de pacientes, sendo LV>LC>LMC. Além disso, estes autores demonstraram que o aumento dos níveis de Cu pode aumentar a suscetibilidade à infecção devido à diminuição da produção de IFN- γ . Klassing et al. (1987, 1988) demonstraram uma relação do aumento de Cu com o aumento da IL-1 e a indução da ceruloplasmina durante processos inflamatórios e infecciosos, como observado na leishmaniose cutânea (Faryadi & Mohebalı 2003; Kocyigit et al. 1998) e na leishmaniose tegumentar com modelo murino de resistência e suscetibilidade (Amini et al. 2009). Interessante Kocyigit et al. (1998) e Van Weyenbergh et al. (2004) observaram que após tratamento convencional, os níveis séricos de cobre voltaram a níveis semelhantes aos de indivíduos saudáveis.

Sabe-se que a deficiência de Zn diminui a produção e maturação de monócitos; a maturação de linfócitos e atividade tímica; diminui a resposta Th1 com redução dos níveis de IL-1 β , IL-12, TNF- α e IFN- γ (Chandra 1997; Erickson et al. 2000; Field et al. 2002; Weyenbergh et al. 2004). A relação inversa Cu/Zn promove uma diminuição da secreção de IFN- γ e está associada a uma baixa atividade celular e elevada resposta humoral na LV experimental (Weyenbergh et al. 2004). Amini et al. (2009) sugeriram que a relação Cu/Zn poderia ser marcador útil na patofisiologia da leishmaniose.

Níveis aumentados de interleucinas plasmáticas como interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6), tal como ocorrem na inflamação e também no exercício intenso, estimulam o fígado a aumentar a captação do Zn do plasma para a síntese de metalotioneína (e possivelmente de superóxido dismutase e outras zinco-proteínas), necessária aos mecanismos de resposta aguda (Shankar & Prasad 1998; Rink & Haase 2006; Stefanidou et al. 2006; Yanagisawa & Yakugaku 2008). Já a deficiência de Fe inibe a produção de superóxidos pelos leucócitos, promove diminuição da multiplicação de linfócitos T e da produção de interleucina 2 (IL-2) (Chandra 1997; Field et al. 2002).

Durante os processos inflamatórios e infecciosos, como na LC, os níveis séricos de Fe encontram-se diminuídos quando comparados ao grupo controle (Kocyigit et al. 1998; Faryadi & Mohebalı 2003). Como muitos patógenos (fungos, bactérias e protozoários) necessitam do ferro para replicação e desenvolvimento, uma estratégia de defesa do organismo seria a redistribuição desse elemento, tornando-o indisponível aos

parasitos. Estas mudanças são induzidas por citocinas como IL-1, TNF- α e IL-6 liberadas por macrófagos ativados (Klassing 1988; Brock & Mulero 2000; Kocygit et al. 1998b). Ao contrário, em experimentos com camundongos, Bisti et al (2000) observaram que o excesso de Fe modula a infecção por *L. major*, resultando em uma menor multiplicação do parasito, com uma redução de IL-4, IL-6 e IL-10 e aumento de IFN - γ e iNOS.

Outro elemento relacionado à funcionalidade do sistema imune é o Se cuja deficiência diminui o número de linfócito T e a atividade da GSH-Px (Kocygit et al. 1999a; Field et al. 2002). Kocygit et al. (1999) observaram uma diminuição sérica de Se associada a uma menor atividade da GSH-Px em indivíduos com LC, na Turquia, quando comparados com indivíduos saudáveis.

Chandra (1997) em revisão relatou que a fagocitose é afetada na desnutrição devido à diminuição da concentração e atividade da maioria dos componentes do complemento, tais como C3, C5, fator B e da atividade hemolítica total. Huang et al. (2001), em cultura celular, demonstraram que o Cu é essencial no processo de diferenciação de monócitos, contribuindo para a competência do sistema de defesa do hospedeiro e está relacionado à expressão de marcadores de maturação como Mac-1 (CD11b), ICAM (CD54) e LPS-R (CD14). Além disso, Anstead et al. (2001) observaram uma relação entre a desnutrição e a diminuição da atividade de iNOS no baço e fígado de camundongos infectados com *L. donovani*, causada por uma falha na barreira dos linfonodos após a infecção, com excessiva produção de prostaglandina (PGE₂) e de baixos níveis de IL-10 e NO.

Pasad et al. (2003) não encontraram diferenças nos níveis de Zn e Cu em pelo de cães com LVC, mas observaram diminuição dos níveis de Zn e Fe, e aumento de Cu no soro destes animais. Lal et al. (2012), ao compararem pacientes em fase aguda e crônica de LV, observaram diminuição de Zn e aumento de magnésio (Mg) e Cu na fase crônica, mas nenhuma diferença entre grupos quando analisado o Fe e o Cálcio. Estes autores sugeriram suplementação de Zn na prevenção da cronicidade da LV.

1.6 LVC – imunidade e defesas antioxidantes

As linhas de defesa implementadas pela resposta imune do hospedeiro vertebrado para eliminar os parasitos intracelulares do gênero *Leishmania* tem sido extensivamente estudadas (Mastousek et al.1993). Em leishmaniose, a resposta imune protetora do hospedeiro é a adaptativa e não a resposta humoral. Essa é considerada ineficaz para o processo de cura da infecção. Assim, o mecanismo mais eficiente da resposta celular é a produção de linfócitos T CD4 (Th1) produtores de (IFN- γ), interleucina (IL)-2, fator de necrose tumoral (TNF)- α , ativadores de linfócitos T CD8 e macrófagos, enquanto que o subtipo Th2 secreta IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 resultando na hipergamaglobulinemia policlonal e susceptibilidade (Mosmann et al. 1986; Fiorentino et al. 1989).

Na LVC, segundo Pinelli et al. (1994), a infecção sintomática está associada com uma imunorregulação negativa da resposta celular periférica, associada a decrescente produção de IL-2, INF- γ e TNF- α com ineficiente eliminação do parasito. Desta forma, cães com sintomatologia clássica da doença visceral tendem a desenvolver resposta imune predominantemente humoral caracterizada por hipergamaglobulinemia policlonal, enquanto que os resistentes apresentam expressiva resposta celular, como a potencialização da fagocitose mediada por citocinas tipo Th1. Esta potencialização induz a expressão da enzima iNOS nos macrófagos, e subsequente produção de óxido nítrico (NO), ambos essenciais para o controle da replicação do parasito. (Sisto et al. 2001; Zafra et al. 2008; Cangussú et al. 2009; Silva Araujo et al. 2009; Reis et al 2009; Tomokane et al. 2010).

Além da produção de NO, os macrófagos ativados geram espécies reativas de oxigênio (ERMOs) processo caracterizado por um aumento rápido no consumo de oxigênio com produção de ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e íons hidroxila OH^- (Crichton et al. 2002). A formação do O_2^- é catalisada pelo complexo NADPH oxidase (NOX). O ânion superóxido é pouco reativo, quando gerado intracelularmente, ele exerce sua toxicidade inibindo enzimas bacterianas que contém agregados de [Fe-S]. Simultaneamente o Fe^{2+} é liberado e pode converter o H_2O_2 em OH^- pela Reação de Fenton (Weiss et al. 1999).

Apesar da ampla utilização da terminologia ROS, esse não é um termo ideal para designar todos os agentes reativos de oxigênio, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada como exemplo do H_2O_2 (Ferreira & Matsubara 1997). Os ERMOS são moléculas tóxicas como O_2^- peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxil (OH^\cdot) e existem também espécies reativas de nitrogênio (RNS), incluindo o NO (Mauel et al. 1991; Ferreira & Matsubara 1997; Bogdan et al. 2000; Sisto et al. 2001). Esses são capazes de degradar várias biomoléculas como proteínas, DNA e lipídeos poliinsaturados de membrana, tendo por isso efeitos citotóxicos também nas células dos hospedeiros se não controlados ou produzidos em excesso resultando na lipoperoxidação (LPO) e desorganização celular (Haidaris & Bonventre 1982; Ferreira & Matsubara 1997; Biswas et al. 1997; Serarslan et al. 2005; Zafra et al. 2008).

A LPO pode ser determinada por métodos químicos, sendo o teste do ácido tiobarbitúrico (TBA) o mais utilizado e considerado um bom indicador. A formação do malonaldeído (MDA) ocorre através da decomposição de hidroperóxidos, produtos primários da oxidação lipídica. Existem, além do MDA, outras substâncias que reagem com o TBA, sendo estas chamadas genericamente de TBARS (Assure et al. 1994; Ferreira & Matsubara 1997). O dano ou alterações resultantes dos ERMOS são: apoptose, necrose, isquemia e fibrose.

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação dos ERMOS e assim como nossas células tem mecanismos de defesa. O parasito *Leishmania* pode inibir a produção ou atuação de ERMOS e replicar dentro dos fagócitos através da atuação de suas proteínas de superfície como o LPG, gp63 e SOD-Fe (Cunningham 2002; Paltrinieri et al. 2010).

Para proteger contra os danos oxidativos é essencial o equilíbrio entre agentes oxidoredutores (como os ERMOS) e o sistema de defesa antioxidante. Para tal os organismos aeróbicos desenvolveram uma variedade de defesas antioxidantes (Erickson et al. 2000; Field et al. 2002), como: (a) o transporte, utilização e estocagem do ferro e o cobre sempre ligados a proteínas específicas (transferrina, ferritina e ceruloplasmina), as quais previnem ou minimizam as reações de oxidação catalisadas por estes minerais quando presentes na forma livre (Ferreira & Matsubara 1997; Huang et al. 2001). Estes íons são muito ativos e participam da reação de Fenton que resulta

na formação de um potente radical oxidante hidroxila (OH^\cdot) a partir do H_2O_2 . (Ferreira & Matsubara 1997; Davies 2000); (b) sistema antioxidante não enzimático como a vitamina C, vitamina E, selênio, flavonoides, β caroteno e a glutathiona (Ferreira & Matsubara 1997; Davies 2000) e; c) um sistema antioxidante enzimático descrito a seguir:

- (1) Cu-Zn Superóxido-Dismutase (SOD) - Metaloenzima, na qual o zinco (Zn) participa da estabilização da proteína e o cobre (Cu) tem papel na atividade catalítica convertendo ERMO em H_2O_2 e O_2 . Existem basicamente dois tipos de SOD (citoplasmática e extracelular – dependente de Cu e Zn, e a mitocondrial – dependente de manganês (Mn) (Ferreira & Matsubara 1997).
- (2) Catalase (CAT)- Hemoproteína citoplasmática, dependente de NADPH e Fe. Catalisa a conversão de H_2O_2 a H_2O e O_2 (Kocygit et al. 1998a; Britti et al. 2008). Na maioria das células de mamíferos (sangue; medula óssea; mucosas, rim e fígado).
- (3) Glutathiona-peroxidase (GSH-Px) - duas classes distintas desta enzima são conhecidas, a GSH-Px selênio-dependente e a GSH-Px selênio-independente, cada uma possuindo maior especificidade por um determinado substrato (Arthur 2000a). GSH-Px selênio-dependente contém quatro átomos de selênio, atua no final do sistema antioxidante após a SOD, catalisando a conversão de H_2O_2 a H_2O pela conversão de glutathiona oxidada (GSSG) em glutathiona reduzida (GSH). Sua atividade esta relacionada aos níveis de selênio (Se) (Kocygit et al. 1998a; Britti et al. 2008). Junto com a CAT são os principais “varredores” de ERMOS. Embora a GSH-Px tenha ação citosólica, *in vitro* foi capaz de reduzir hidroperóxidos de membrana e em modelo experimental de hemocromatose observou-se uma redução de 36% na atividade da GSH-Px em fígado de ratos (Ferreira & Matsubara 1997). O segundo tipo, a enzima GSH-Px selênio-independente, está apta a reduzir qualquer hidroperóxido orgânico, exceto o H_2O_2 (Arthur 2000), e em

substituição à selenocisteína, possui um resíduo de tirosina no sítio catalítico. Esta classe de enzimas selênio-independentes corresponde às glutathione S-transferases (Arthur 2000).

1.7 O Fe implicado na injúria tecidual e suscetibilidade

Em processos inflamatórios agudos, crônicos ou neoplasias é observada uma captação do ferro sérico para os tecidos, em especial para o fígado (Bricks 1994; Weiss et al. 1999; Soubasis et al. 2006; Grotto 2008). Essa condição é mediada por citocinas Th1 e Th2 que mantêm a homeostase do Fe através da regulação do complexo IRP/IRE (Weiss et al. 1994, 1999, 2001; Weiss 2002, 2005). Para tal, citocinas pró-inflamatórias em especial IFN- γ , IL-6 e IL-1 e proteínas de fase aguda (fibrinogênio, haptoglobulina, ceruloplasmina) atuam inibindo a eritropoiese e diminuindo a disponibilidade do Fe para os microrganismos através da diminuição da absorção intestinal (síntese da hepcidina); retenção de Fe pelos macrófagos (digerem a hemoglobina de eritrócitos); síntese de ferritina (aumento do estoque intracelular de Fe) e diminuição da expressão do TfR (Bricks 1994; Weiss 2002, 2005).

Uma importante célula participante deste processo são os macrófagos, orquestrando a resposta inflamatória e regulando a homeostase do Fe através da fagocitose de eritrócitos senescentes (Crichton et al. 2002; Grotto 2008). Macrófagos do baço e da medula óssea e, em menor extensão, células de Kúpffer no fígado reconhecem modificações bioquímicas na membrana da hemácia sinalizando para o processo de fagocitose seguido da degradação dos componentes da hemácia (Grotto 2008). Normalmente o ferro fica estocado nas células reticuloendoteliais desses órgãos, nas formas de ferritina e hemossiderina. (Grotto 2008, 2010). A eritrocaterese e o estresse oxidativo têm sido implicados na patogenia da leishmaniose somada a um quadro de anemia hemolítica na LVC (Biswas et al. 1997; De Luna et al. 2000; Bildik et al. 2004; Britti et al. 2008); LV experimental (Sen et al. 2004); na LC (Vural et al. 2004; Ozbilge et al. 2005; Serarslan et al. 2005; Kocyigit et al., 2003, 2005) na LV (Samanta et al. 2012)

Em processos crônicos o acúmulo elevado de ferro tecidual pode gerar danos teciduais pela LPO (Arthur 1996; Alexander et al. 2007) uma vez que aumento de Fe

gera OH^- pela reação de Fenton e Haber-Weiss (Arthur 1996; Huynh et al. 2008; Alexander et al. 2007). O dano tecidual causado pelo aumento de Fe foi associado à síntese anormal de colágeno (Gualdi et al., 1994; Pietrangelo et al. 1994; Pantopoulos & Hentze 1995; Arthur et al. 1996; Casaril et al. 2000; Dai & Churg 2001; Özgüner & Sayin 2002; Ramm et al. 2005; Alexander et al. 2007) a um processo inflamatório mais intenso (Bricks 1994; Weiss et al. 1999; Tsukamoto et al. 1999; Fritsche et al. 2001; Soubasis et al. 2006) e a uma diminuição da expressão e atividade da iNOS (Weiss et al. 1994; Pantopoulos & Hentze 1995; Recalcati et al. 1998, Weiss et al. 1999; Fritsche et al. 2001; Alexander et al. 2007; Hill et al. 2010). Além disso, uma conexão entre NO e IRP foi demonstrada por Weiss et al. (1994) que mostraram que o aumento de ferro intracelular conduz a uma diminuição da atividade da iNOS, enquanto a depleção (quelar) do Fe intracelular aumenta a atividade da enzima. (Bricks 1994; Weiss et al. 1999; Tsukamoto et al. 1999; Fritsche et al. 2001; Soubasis et al. 2006).

1.8 LVC – ERMO e lesões teciduais

Na LVC alterações teciduais são observadas nos vários órgãos acometidos e associada a um processo inflamatório crônico no fígado, baço, linfonodos, pele, rim, pulmão, intestino nas diferentes formas clínicas (Tryphonas et al. 1977; Anosa & Idowu 1983; Ferrer et al. 1988, 1991; Genaro 1993; Tafuri et al. 1996, 2001; Silva et al. 2002; Lima et al. 2004; Solano-Gallego et al. 2004).

Na infecção experimental de hamster com *L. chagasi* a produção de ERMOs foi relacionada com a injúria das células hepáticas. Oliveira & Cecchini (2000) observaram altos níveis de MDA e correlação significativa com a infecção, sugerindo que o mecanismo do dano hepático era o estresse oxidativo e LPO. Sen et al. (2001) também demonstraram o estresse oxidativo como possível causa no modelo experimental de *L. chagasi*.

Recentemente Heidarpour et al. (2012) demonstraram na LVC que animais sintomáticos apresentaram estresse oxidativo mais intenso que os assintomáticos e que a LPO pode estar relacionada ao dano hepático e renal.

Os ERMOs também foram implicados na injúria das células vermelhas (CV) resultando no aumento da eritrocaterese na LVC (Biswas et al. 1997; de Luna et al.

2000; Bildik et al. 2004; Britti et al. 2008; Samanta et al. 2012), LV experimental (Sen et al. 2004); na LC (Vural et al. 2004; Ozbilge et al. 2005; Serarslan et al. 2005; Kocyigit et al. 2003, 2005) devido a diminuição da vida das hemácias associada à alteração da fluidez da membrana (de Luna et al. 2000). De acordo com Paltrinieri et al. (2010) o aumento de ERMOS depende mais do processo inflamatório crônico do que da presença do parasito *Leishmania*.

1.9 Justificativa

Diversos estudos têm demonstrado a natureza multifatorial dos mecanismos envolvidos no estabelecimento das diferentes formas clínicas da LVC tais como o tipo de cepa e sua virulência, inerentes ao parasito (Baneth et al. 2008; Solano-Gallego et al. 2009). No âmbito do hospedeiro vertebrado, o estado nutricional e o padrão de resposta imune têm sido apontados como os principais fatores determinantes das diferentes formas clínicas e da eficácia terapêutica (Kocyigit et al. 1998a, 1998b, 1999a, 1999b; Anstead et al. 2001; Faryadi et al. 2003; Nieto et al. 2003; Weyenbergh et al. 2004; Baneth et al. 2008; Solano-Gallego et al. 2009). Entretanto, além da resposta imune, não está ainda bem elucidado como outros fatores poderiam influenciar na LVC (Baneth et al. 2008; Solano-Gallego et al. 2009).

Embora estudos na Leishmaniose Tegumentar Humana (TH) (Kocyigit et al. 1998a, 1998b, 1999a, 1999b; Faryadi et al. 2003; Araujo et al. 2008; Mishra et al. 2010; Lal et al. 2012) e em modelos experimentais da TH e LV (Oliveira & Cecchini 2000; Anstead et al. 2001; Sen et al. 2001; Weyenbergh et al. 2004) relacionarem o estado nutricional, a presença de elementos traço e a gravidade da doença, muito pouco foi enfatizado neste contexto sobre a LV e principalmente a LVC (Pasa et al. 2003; Nieto et al. 2003; Adamama-Moraitou et al. 2005; Heidarpour et al. 2012). Assim, apesar da aceitação geral de que a nutrição é um determinante na resposta imune, são poucos os dados sobre o papel dos elementos traço na LVC e sua relação com aspectos clínicos, patológicos, imunológicos bem como com o sistema oxidante/antioxidante. Este estudo teve a proposta de contribuir com o entendimento da relação existente entre estes fatores e a LVC buscando responder as seguintes perguntas:

Existe relação entre os níveis séricos de elementos traço e o estresse oxidativo associada às diferentes formas clínicas da LVC?

Os elementos traço estariam implicados na suscetibilidade e aspectos histopatológico da LVC?

2- OBJETIVO

2.1- Objetivo geral

Investigar as alterações dos elementos traço e a relação desses com aspectos clínicos, histopatológicos e o estresse oxidativo na LVC.

2.2- Objetivos específicos

- Analisar clinicamente os animais classificando-os em assintomáticos e sintomáticos.
- Analisar as alterações histopatológicas no fígado, baço, linfonodos (cervical e poplíteo) e pele dos animais infectados.
- Determinar a carga parasitária no fígado, baço, linfonodos (cervical e poplíteo) e pele.
- Determinar os níveis séricos de Cu, Zn, Fe e Se dos cães.
- Avaliar a deposição de Fe tecidual no fígado, baço, linfonodo cervical.
- Avaliar a atividade das enzimas: GSH-Px, CAT e SOD no sangue, fígado, baço e linfonodo cervical e da iNOS, via produção de NO.
- Avaliar a deposição de matriz extracelular (colágeno) nos diferentes órgãos.
- Quantificar a expressão da, iNOS e Calprotectina nos diferentes órgãos.
- Avaliar *in vitro* a atuação do Fe, Desferal (DF) sobre a ativação da iNOS.
- Avaliar a Lipoperoxidação no plasma e em cultura
- Correlacionar os dados dos elementos traço com aspectos clínicos e histopatológicos e o estresse oxidativo.

3 METODOLOGIA

3.1 Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA - número de protocolo N° 213/07).

3.2 Animais e Delineamento experimental

Para este estudo foram utilizados 39 cães sem raça e idade definidas mantidos no canil experimental do Instituto de Ciências Biológicas (ICB).

Trinta cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Ribeirão das Neves (CCZ), Região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, sendo esses previamente diagnosticados com leishmaniose visceral pelos testes de (RIFI - Kit Biomanguinhos[®]) padrão ouro diluição 1:40 e ELISA - Kit Biomanguinhos[®]) (densidade ótica 100; diluição 1:400) destinados a eutanásia. E nove animais não reativos na RIFI e ELISA provenientes do controle de zoonoses da região não endêmica de Carandaí, MG.

Os cães foram mantidos em quarentena (40 dias) com água e ração (Nero Refeição, Total Alimentos, Brazil) *ad libitum*. Os animais foram tratados contra helmintos intestinais (Helfine cães[®], 133 Agener União, Brasil), ectoparasitos (Frontiline Top Spot[®], Merial, Brasil) e vacinados contra raiva (Defensor[®], Pfizer Saúde Animal, Brasil) e outras doenças infecciosas (Vanguard HTLP 5/CV-L[®], Pfizer Saúde Animal, Brasil). Contenção, anestesia e todos os procedimentos realizados nos animais estavam de acordo com o Instituto de proteção animal.

Ao final da quarentena exames sorológicos foram repetidos assim como os exames parasitológicos (esfregaço de medula óssea e fragmento de pele (5 mm “punch”) para visualização do parasito confirmaram a reatividade dos 30 cães infectados e a não reatividade dos 9 cães do grupo controle para *Leishmania infantum*, nestes animais procedeu-se também a PCR convencional de baço para confirmação da negatividade. Os animais foram então avaliados clinicamente quanto a: 1- condições

corporais (perda de peso, caquexia e anemia); 2- linfadenopatias; 3- sintomas dermatológicos (alopecia, dermatite esfoliativa, úlcera, onicogribose e ceratoconjuntivite). Os animais sorológica e parasitologicamente positivos foram classificados através de sorologia, parasitologia e aspectos clínicos de acordo com (Manciante et al.,1998; de Amorin, et al. 2010). em : 11 cães assintomáticos (CA) com exame parasitológico e sorológico positivos e sem sinais clínicos ao exame físico) e 19 cães sintomáticos (CS) com exames parasitológico e sorológico positivos e com pelo menos um sinal clínico. Os cães negativos na sorologia e parasitologia para *Leishmania infantum* foram classificados como controle (C) (n = 9). Todos os animais apresentaram exame sorológico negativo para *Ehrlichia* e *Babesia*.

Após esta avaliação e classificação procedeu-se a necropsia dos animais.

3.3 Coleta e processamento do material

3.3.1 Coleta de sangue, plasma e fragmentos de órgãos,

Para a coleta dos materiais propostos pelo estudo todos os animais foram anestesiados com associação de 1,0 mg/Kg de Cloridrato de Xilazina (2%) (Anesedan[®], Vetbrands, Brasil) e 10mg/Kg de Cloridrato de Cetamina (10%) (Ketamina Agener[®], Agener União, Brasil), por via intramuscular. Dez minutos (min) após a indução anestésica foi administrado, quando necessário, 0,5mg/Kg de diazepam (ampolas de 10 mg/2 mL) (Diazepam[®], União Química, Farmacêutica Nacional S/A, Brasil) por via endovenosa.

O Sangue periférico foi coletado para separação de soro e plasma. Amostras de sangue, plasma e soro foram estocados em temperaturas de -20 e -80°C. O soro foi usado para as dosagens de elementos traço, NO e sorologia (RIFI e ELISA - laboratório de sorologia do Departamento de Parasitologia (ICB/UFMG). O plasma foi usado para a detecção da atividade da GSH-Px, TBARs. E o sangue total para detecção da atividade da GSH-Px; SOD e CAT.

Durante a necropsia, fígado, baço, pele e o linfonodo cervical foram analisados macroscopicamente levando-se em consideração critérios como tamanho, peso e

presença de lesões. Em seguida, fragmentos dos órgãos foram coletados e fixados em solução de formol a 10% tamponado, para inclusão em parafina. Outros fragmentos foram criopreservados, embebidos à fresco em Tissue Tek (OCT- Division Miles Lab. Inc. Naperville Illinois) ou congelados à temperatura de -80°C para a dosagem da atividade das enzimas SOD, CAT e GSH-Px.

3.3.2. - Exames Parasitológicos

3.3.2.1. Esfregaço por extensão

Os esfregaços por extensão da medula óssea foram secados ao ar e fixados com álcool metílico (Álcool Metílico PA, LabSynth Produtos para Laboratórios, Brasil) por 5 minutos (min), e corados em solução de Giemsa (Renylab Quim Farm Ltda, Brasil), utilizando o corante diluído na proporção 1:20 em água destilada, por 20 a 60 min, consoante com a intensidade de coloração desejada. Após coloração, os esfregaços foram observados em microscópio óptico (Olympus CBA, Olympus Optical Co., Japão) para a identificação de formas amastigotas dos parasito (Lipowitz & Blue 1998; Raskin & Beldner 1998).

3.3.2.2.- Diagnóstico molecular

A. Extração de DNA de tecidos

As extrações de DNA das amostras de baço foram realizadas segundo Xavier et al. (2006) e Silva et al., (2009) e posterior kit “DNeasy Blood & Tissue Kit®” (Quiagen Inc., EUA) de acordo com as instruções do fabricante, com modificações. Fragmentos dos tecidos emblocados em parafina foram retirados e processados para a retirada da parafina e posterior do xilol. Para tal realizou-se banhos de xilol associado à homogeneização e centrifugação a 14.000 g, 1 min a temperatura ambiente com lavagem e troca do xilol por 3x, posterior 3 banhos de etanol e centrifugação. Após a amostra foi incubada em estufa 37°C por 40 min para evaporar o etanol. A essa mistura

foram adicionados 20µL de proteinase K (DNeasy Kit®), 100µL de Phosphate Buffered Saline (PBS) (pH 7.2) e incubada em banho maria a 56 °C overnight até a completa lise dos tecidos. Após, foram adicionados 200µL de tampão AL (DNeasy Kit®) e as amostras submetidas à agitação com auxílio de aparelho vórtex (Certomat MV, B. Braun Biotech International, EUA) a 20.000 g por 15 segundos (s) e colocados em incubação a 56°C por 10 min. Após nova agitação com aparelho vórtex a 20.000 g por 15 s, foram acrescentados 200 µL de etanol absoluto (Merck, Alemanha) e as amostras foram novamente agitadas no aparelho vórtex. As amostras foram então transferidas individualmente para coluna DNeasy Mini Spin (DNeasy Kit®) acoplada a um tubo coletor (DNeasy Kit®). As colunas foram centrifugadas a 6.000 g por 1 min, o tubo coletor descartado, e logo as amostras foram transferidas para um novo tubo coletor. Foram adicionados 500 µL do tampão AW1 (DNeasy Kit®), centrifugado a 6.000 g por 1 min e o tubo coletor descartado. As colunas foram transferidas para novos tubos coletores e em cada uma foram adicionados 500 µL do tampão AW2 (DNeasy Kit®), seguido de centrifugação a 20.000 g por 3 min para secagem da coluna. O tubo coletor foi descartado e a coluna transferida para tubo de microcentrífuga autoclavado de 2 mL, seguido de adição de 50 µL de tampão AE (DNeasy Kit®) diretamente na membrana da coluna. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 2 min e centrifugadas a 6.000 g por 1 min. A coluna foi descartada e a concentração de DNA do produto obtido na extração determinada utilizando um espectrofotômetro (Epoch Micro-Volume Spectrophotometer System, BioTek Instruments, Inc., EUA), e então, ajustada para 5ng/µL. O produto de extração foi armazenado a -20°C para posterior análise.

B - PCR convencional

A amplificação do DNA pela PCR convencional foi realizada utilizando o par de iniciadores direto: 5' TGT CGC TTG CAGACC AGA TG 3', e reverso: 5'GCA TCG CAG GTG TGA GCA C 3', descritos por Bretagne et al. (2001), que amplificam um fragmento de 90 pb do gene da DNA polimerase de *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) (acesso no GenBank: AF009147). Para a amplificação, 1,5µL do produto da extração de DNA foram adicionados a uma mistura contendo 1,5µL de iniciador direto

(10 pmol/ μ L); 1,5 μ L de iniciador reverso (10 pmol/ μ L); 7,5 μ L de “Go Taq[®] Green Master Mix” (Kit Go Taq[®] Green Master Mix, Promega, EUA); 3 μ L de H₂O deionizada “nuclease free”. Como controles da reação foram utilizados amostra de cão sabidamente negativo, amostra de cão com diagnóstico positivo para *L. infantum chagasi*, DNA de *L. chagasi*, cepa MOHM/BR/1967/BH46 obtida de formas promastigotas de cultura e mantida no Laboratório de Biologia de Leishmania. A amplificação foi realizada a partir do passo inicial de desnaturação por 3 min a 95°C; seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 60 s, anelamento por 60 s a 51°C, extensão a 72°C por 30 s; e por último, a extensão final a 72°C por 2 min.

Os produtos amplificados pela PCR foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 5% (Sigma Aldrich, EUA) não desnaturante em TBE (89 mM TRIS-Borato, 2 mM EDTA, em pH 8.0) (Sambrook et al. 1982). Foram aplicados 4 μ L do produto amplificado por canaleta, a uma tensão de 100 V, por aproximadamente 40 min. Após a eletroforese, os fragmentos amplificados foram visualizados por coloração pelo nitrato de prata (Synth, Brasil) (Santos et al. 1993). As amostras consideradas positivas apresentaram bandas de 90 pb quando comparadas a um marcador de peso molecular aplicado em uma canaleta do gel (100 bp DNA Ladder, Promega, EUA). O gel foi fixado à temperatura ambiente por 5 min em solução contendo 10% de etanol absoluto (v/v) e 0,5% de ácido acético (v/v) (Merck, Alemanha), seguida de incubação por 5 min em 150 mL de solução contendo 0,7% de nitrato de prata (p/v) (Synth, Brasil), e de nova incubação com solução reveladora contendo 3% de NaOH (p/v) (Merck, Alemanha) e 0,1% de formaldeído 37% (v/v) (Merck, Alemanha), por 10 min ou até o aparecimento das bandas, sempre sob agitação suave (Orbit Shaker[®], Lab-Line, EUA) (Sambrook et al. 1982). Posteriormente, o gel foi transferido para a solução fixadora e documentado por fotografia para análise. A contaminação da reação por amplicons foi evitada pelo uso de diferentes ambientes para o processamento das amostras, além dos processos rotineiros de descontaminação das áreas de trabalho.

3.3.3 - Detecção sorológica dos elementos traço

O soro foi diluído com 0,05% de Triton X-100 em 0,01% HNO₃. Fe, Zn e Cu foram mensurados por espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP OES). Se foi mensurado por espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP MS). Todos os métodos foram validados de acordo com recomendações internacionais e nacionais do Instituto de metrologia (INMETRO 2010), International Organization for Standardization (ISO 1999), e National Association of Testing Authorities (NATA 1997). Os parâmetros adotados foram: seletividade, faixa linear, limite de detecção e quantificação, precisão e acurácia com um intervalo de confiança de 95%. Recuperação foi mais de 100% e a acurácia foi determinada pelas matérias de referencia analisados da Seronorm L1 201405. A qualidade dos resultados foi dada pela análise do material de referencia bem como ferramentas estatísticas como media e recuperação. Todas as análises foram realizadas no laboratório de metais traço do CETEC em área limpa de acordo com o ISO 5 e 7.

3.3.4 - Métodos para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px

Para as dosagens da atividade da CAT, SOD e GSH-Px, 100 mg tecidos (sangue, fígado, baço e linfonodo cervical) e 100 microlitros de sangue foram triturados (Euro Turrax T10 IKA LABORTECHNIK) e centrifugados por 15 min a 10.000 g 4°C e o sobrenadante coletado e utilizado para as dosagens.

A determinação da concentração de proteínas das amostras foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951) que consiste na adição de 20 µL do homogeneizado da amostra mais 2,5 mL da mistura de Na₂CO₃ (2%), CuSO₄ (1%) e tartarato duplo de sódio (2%) nas proporções de 1:2:3 mais 180 µL de água destilada por 10 min. Posteriormente adiciona-se 250 µL do reagente de Folin (Sigma) diluído 1:2 em água destilada e incuba-se por 20 min a 37°C em banho maria. Após homogeneizar a mistura e ler em espectrofotômetro a 660 nm. A albumina bovina foi utilizada como padrão (1mg/mL).

3.3.4.1 - Atividade da Catalase

O ensaio da catalase foi realizado conforme o método de Nelson & Kiesov (1972) com algumas modificações. Depois da homogeneização dos tecidos em PBS 50 mM a atividade da enzima foi determinada acrescentando-se a uma cubeta de quartzo 2 mL de PBS mais 20 μ L do homogeneizado da amostra. Em seguida foi adicionado 80 μ L de substrato (H_2O_2 0,3 M) e a leitura foi realizada durante 1 min à 25°C à 240 nm em espectrofotômetro. A atividade da catalase foi calculada através de sua capacidade de degradar H_2O_2 e expressa em $\Delta E/\text{min}/\text{mg}$ proteína onde ΔE = variação da atividade da enzima durante um (1) minuto.

3.3.4.2 - Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Este ensaio foi realizado de acordo com Dieterich et al. (2007) com algumas modificações. Foi adicionado a uma cubeta de plástico 1 mL de tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7.8) contendo 1mM de DTPA (ácido dietilenotriaminopentacético), posteriormente foi aquecido a 37°C e adicionado 20 μ L da amostra e a reação é então iniciada com a adição de pyrogallol (0,2 mM) 5 μ L. A leitura foi realizada durante 3 min à 37°C à 420 nm. A determinação da atividade da enzima representada em U/mg é calculada como a capacidade da superóxido dismutase em inibir a autoxidação do pyrogallol. 1U corresponde a 50% de inibição da autoxidação do pyrogallol.

3.3.4.3 - Atividade da GSH-Px (Kit Cayman)

Os tecidos foram homogeneizados em tampão Tris HCl 50 mM (5 mM EDTA e 1 mM DTT pH 7.5). O experimento foi realizado de acordo com a descrição do Kit. Foi adicionado 20 μ L da amostra mais 120 μ L do tampão de ensaio (50 mM Tris HCl pH 7.6, 5 mM EDTA), 5 μ L da mistura do co-substrato (NADPH, glutaciona, glutaciona redutase). Logo após, foi adicionado 20 μ L do substrato Cumeno de hidroperóxido e a leitura foi realizada a cada 1 min durante pelo menos 5 min à temperatura ambiente em

um comprimento de onda de 340 nm. A determinação da atividade da enzima foi representada em nmol NADPH/min/mL.

3.3.5 – Cultura de macrófagos

Para os testes *in vitro*, macrófagos peritoneais foram coletados da cavidade abdominal de dois cães controle. Brevemente durante a necropsia a região abdominal do cão foi limpa (raspagem dos pelos e assepsia com álcool 70%). Uma pequeno corte no abdome expôs a cavidade peritoneal e 1 L de PBS estéril foi adicionado. Procedeu-se a massagem por 15 min e posterior coleta do líquido com seringa de 50 mL. O lavado peritoneal foi então centrifugado a 2000 g por 15 min à 4°C e as células ressuspendidas e plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de 3×10^7 em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 10% soro fetal bovino + L-glutamina + penicillina-streptomicina. As células permaneceram em cultura a 37°C, 5% CO₂ em estufa, por uma hora para aderência dos macrófagos e posterior lavagem das células não aderidas. A viabilidade dos macrófagos foi determinada pelo azul de Tripán (98%). Posteriormente as células foram estimuladas com Fe - 50 µM como Fe (NO₃)₃.9H₂O, quelante de ferro Desferal (DFO) 100 uM e, ou IFN-γ -1ng/ml, LPS - 100ng/ml, aminoguanidina -100 mM e mantidas por 24, 48 e 72 horas. O sobrenadante das células foi utilizado para dosagem de NO.

3.3.6.-Dosagem de nitrito sérico como medida indireta da produção de NO (Método de Griess).

O soro coletado dos animais e o sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais foram analisados quanto à produção de nitrito pela reação de Griess (Green et al. 1982), como medida indireta da produção de NO. Para o ensaio, o soro foi distribuído na placa de 96 poços (TPP) contendo 25 µL de cada amostra em duplicata, o branco, que corresponde a 25 µL de PBS, o padrão nitrito, que corresponde a 100 µM de nitrito em duplicata, e o padrão nitrato, correspondente a 25 µL de nitrato a 1 mM. Os padrões foram diluídos na proporção de 1:2 em PBS nos poços subsequentes pelo

menos 7 vezes com o objetivo de montar a curva. Em seguida, 25 μL de uma solução coquetel que consiste em 500 μL de NADPH tetrasodium salt (Merk) a 5 mg/mL em água mili Q estéril, 500 μL de tampão KH_2PO_4 a 0,5 M e pH 7,5, 500 μL de água mili Q estéril e 1U de Nitrato Redutase (Sigma-Aldrich.) em água mili Q estéril, foi adicionada em todos os poços, exceto no padrão nitrito. A placa foi incubada a 37°C por 6 h e logo após foi acrescentado em cada poço 50 μL de solução de Griess que consiste na mistura entre solução de sulfanilamina 1% (sigma-Aldrich Co.) e solução de naphthylethylenodiamida 0,1% (Sigma-Aldrich Co.) ambas diluídas em ácido fosfórico 2,5% (F Maia, Cutia, SP, Brasil). Após 10 min no escuro, as placas foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de 540 nm. Os resultados foram expressos através da curva padrão em μM de nitrito.

3.3.7 - Determinação da peroxidação lipídica (LPO) pela medição de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúricas (TBARS).-

A peroxidação lipídica foi avaliada pela mensuração de substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS). A peroxidação lipídica é uma das mais importantes expressões orgânicas do estresse oxidativo induzido pela reatividade dos radicais livres de oxigênio. O método mais empregado para determinação do MDA em amostras biológicas é baseado na sua reação com ácido tiobarbitúrico (TBA). Nesta reação, duas moléculas de TBA reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA para formar um pigmento róseo, que tem absorvância máxima em solução ácida em 532 a 535 nm. A um volume de 200 μL de plasma (Grotto 2008) foram adicionados 1100 μL de H_3PO_4 1,4%, e 500 μL de ácido Tiobarbitúrico (TBA) 0,6%. As amostras foram incubadas por 45 min a 90 °C. Posteriormente, 200 μL de Dodecil Sulfato de sódio (SDS) 8,7% foram adicionados às amostras, essas foram homogeneizadas, centrifugadas a 3000 g por 10 min. Para a mensuração na cultura de células (Draper et al.1990) após o período de estímulos, as células foram lisadas com 1mL de Triton X 100. Então, 250 μL do homogenato foram adicionados a tubos de vidro, e incubados em banho-maria a 37 °C por 1 h, seguido por adição de 400 μL de ácido perclórico 35% para precipitar proteínas. A mistura foi centrifugada a 1400 g por 10 min e 600 μL do

sobrenadante foi adicionado a 200 µL de uma solução de ácido tiobarbitúrico a 0,7%. A mistura foi levada a banho-maria e aquecida a 95°C por 30 min. Para a leitura as amostras foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 532 nm.

3.3.8 - Avaliação Histopatológica dos órgãos - Hematoxilina & Eosina (H&E)

Lâminas contendo cortes parafinados de fígado, baço e linfonodos foram coradas pela técnica da Hematoxilina & Eosina (H&E) e analisadas por microscopia óptica. As lâminas foram inicialmente desparafinadas em xilol I e II por 15 min cada, hidratadas em soluções decrescentes de álcoois 3 min cada, e a seguir, lavadas em água corrente. Posteriormente foram coradas em hematoxilina (3 mergulhos) e, após lavagem em água corrente por 10 min, coradas em eosina por 1 min. Posteriormente, as lâminas foram imersas em água corrente, desidratadas em soluções crescentes de álcoois, diafanizadas em xilol e montadas com Entellan[®].

As alterações histopatológicas avaliadas no fígado foram: inflamação da cápsula; inflamação portal; presença de granuloma; fenômenos degenerativos (Hidrópica e esteatose); hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer; congestão sinusoidal e deposição de hemossiderina. No baço: espessamento e inflamação da cápsula; hipertrofia e hiperplasia da polpa branca e da polpa vermelha; granuloma de Virchow; depleção de áreas T dependentes na polpa branca; congestão sinusoidal e deposição de hemossiderina. No linfonodo analisamos a linfadenite capsular, inflamação dos seios subcapsulares, hiperplasia e hipertrofia dos nódulos linfóides e dos macrófagos, congestão e presença de hemossiderina.

Estas alterações foram classificadas, levando em consideração a ausência ou a presença de alterações (frequência) e a extensão das alterações em todo o corte histológico classificados em: 1- ausência de alteração; 2- alteração discreta (20-30%); 3- alteração moderada (>30-60%) e 4 - alteração intensa (>60%).

3.3.9. - Técnica de imunohistoquímica para avaliação da densidade de parasitos nos órgãos e expressão iNOS e de Calprotectina (L1)

Lâminas contendo cortes parafinados de fígado, baço e linfonodos foram hidratadas e submetidas aos banhos em PBS. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio (30 volumes) a 4% (30 min em temperatura ambiente). Reações inespecíficas foram bloqueadas (relacionadas ao anticorpo secundário) com leite em pó (caseína) a 6% em PBS, em câmara úmida por 30 min em temperatura ambiente, com lavagem em PBS 1X. Os cortes foram incubados com soro primário por 24 h em câmara úmida a 4° C. No dia seguinte o anticorpo secundário biotilado (anticorpo biotilado de cabra anti camundongo e anti coelho (kit DAKO - LSAB 2 System, Peroxidase – K0675), segundo Tafuri et al. (2004) foi adicionado por 30 min à temperatura ambiente, em câmara úmida. Posteriormente, o complexo estreptoavidina peroxidase (kit DAKO – LSAB) foi adicionado por 30 min em câmara úmida à temperatura ambiente. A revelação é feita com a adição da solução reveladora *Diaminobenzidina* (DAB) a 0,024%, acrescida da solução de peróxido de hidrogênio por 5 min à temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas em água corrente, contra coradas com Hematoxilina de Harris, lavadas novamente, desidratadas em álcoois crescentes (70°, 80° 90° e álcool absoluto), diafanizadas em xilol e montadas com Entellan®.

Para marcação das formas amastigotas de *Leishmania* utilizamos soro de cão naturalmente infectado (soro hiperimune) na diluição de 1:50.

- Para marcação utilizando INOS L1 vide Tabela 1.

Tabela 1 - Anticorpos primários utilizados			
Anticorpo	Diluição	Marca	
Rabbit polyclonal IgG anti – Human Anti NOS2	1/200	SC-651 – Santa Cruz Biotechnology	Cruz
Mouse anti Human Anti L1 (Calprotectin)	1/200	MCA 874G - Serotec	

O controle negativo foi realizado com PBS no lugar do soro primário. Foi utilizado controle positivo para cada anticorpo.

A quantificação das formas amastigotas de *Leishmania* imunomarcadas e coradas em marrom, foi realizada através da análise de toda a área do corte. Para análise da marcação de iNOS e L1 utilizou-se o analisador de imagens Kontron Elekelectronic através do software KS300 segundo Caliari (1997) e Lima et al. (2007). Veja item 3.3.12

3.3.10. – Avaliação da deposição de ferro tecidual

As lâminas foram inicialmente desparafinadas em xilol por 20 min, hidratadas em soluções decrescentes de álcoois (álcool absoluto ao álcool 70% por 3 min cada), e a seguir lavadas em água corrente. Posteriormente foram coradas pela técnica de Azul da Prússia para detecção de Ferro tecidual. A técnica consiste em colocar as lâminas por 5 min na solução de ferrocianeto de potássio 10%, escorrer e acrescentar a solução de uso (10% de ferrocianeto de potássio e 10% de ácido clorídrico 1:1) por 20 a 30 min em temperatura ambiente. Após este período, lavar em água destilada e contra corar com eosina 1 a 2 mergulhos. Passar rapidamente pelos álcoois (soluções crescentes), em xilol e montar com Entellan[®].

Os resultados foram analisados pela análise quantitativa das células marcadas utilizando-se o analisador de imagens Kontron Elekelectronic através do software KS300 segundo Caliari (1997) e Lima et al. (2007). Veja item 3.3.12.

3.3.11- Análise Bioquímica

Afim de avaliar a deficiência ou aumento de ferro, investigamos a capacidade total de ligação do ferro (TIBC), transferrina e índice de saturação da transferrina (%) no soro de todos os animais. Para tal, aliquotas foram enviadas ao Laboratório de Diagnóstico TECSA Pet (Belo Horizonte, MG, Brazil).

3.3.12 – Avaliação da fibrose tecidual por prata amoniacal de Gomori

Para marcação das fibras colágenas foi utilizada a técnica histoquímica Prata Amoniacal de Gomori que cora em negro as fibras colágenas tipo III (fibras reticulares). As lâminas foram desparafinadas em xilol por cerca de 20 min, em seguida hidratadas em ordem decrescente de álcoois (do álcool absoluto ao álcool 70%) até o banho de 5 min em água corrente. Cada lâmina foi coberta com a solução aquosa de permanganato de potássio 0,5% durante 2 min, em seguida lavadas rapidamente até atingirem a cor marrom claro. O passo seguinte foi pingar solução aquosa de ácido oxálico 3% até que os cortes fiquem embranquecidos e em seguida lavar em água corrente rapidamente. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com sulfato férrico amoniacal 2% por 2 min e lavadas com água destilada para serem cobertas com a prata amoniacal de Gomori por cerca de 2 min. Após lavagem em água corrente as lâminas foram cobertas com solução aquosa de formol a 20% por 1 min. Nesta etapa deve-se observar o enegrecimento dos cortes histológicos. As lâminas foram lavadas rapidamente em água e mergulhadas na solução aquosa de cloreto de ouro 0,2% por 3 min e lavadas em seguida com água destilada. Os cortes foram cobertos com hipossulfito de sódio 2% por 1 min e lavados rapidamente com água destilada. Para a contra coloração foi utilizado o Verde Luz 1 % por 30 segundos (s), as lâminas foram lavadas rapidamente com água destilada. Segue-se então com a desidratação das lâminas em álcool 70% até os álcoois absoluto I e II e diafanização rápida em xilol por no máximo 10 min. As lâminas foram montadas em Entellan[®].

Os resultados foram analisados pela análise quantitativa das células marcadas utilizando-se o analisador de imagens Kontron electronic através do software KS300 segundo Caliari (1997) e Lima et al. (2007). Veja item 3.3.10.

3.3.13 - Análise morfométrica da marcação Imunohistoquímica para L1, iNOS e histoquímica para Ferro e Prata tecidual

Para quantificar a imunohistoquímica para L1 e iNOS; a deposição e espessamento das fibras colágenas e histoquímica foram realizadas análises morfométricas através do analisador de imagem “Zeiss Imaging Processing Software (KS 300)” do Departamento de Patologia Geral do ICB/UFMG. De cada material e coloração, separadamente, foram selecionados vinte e cinco campos de cada lâmina histológica contendo amostras (diversos tecidos) de forma aleatória, usando-se a objetiva de 40X. Esses campos foram capturados e posteriormente, através do analisador de imagens, permitiu-se que as estruturas fossem marcadas e quantificadas através de sua coloração diferencial com outras estruturas. Cada estrutura de interesse foi selecionada manualmente, e o computador criou uma imagem negativa da mesma (binarização da imagem), e na seqüência, as medidas foram realizadas de modo automático e os resultados expressos em μm^2 (a figura 1 exemplifica a técnica para a análise de colágeno).

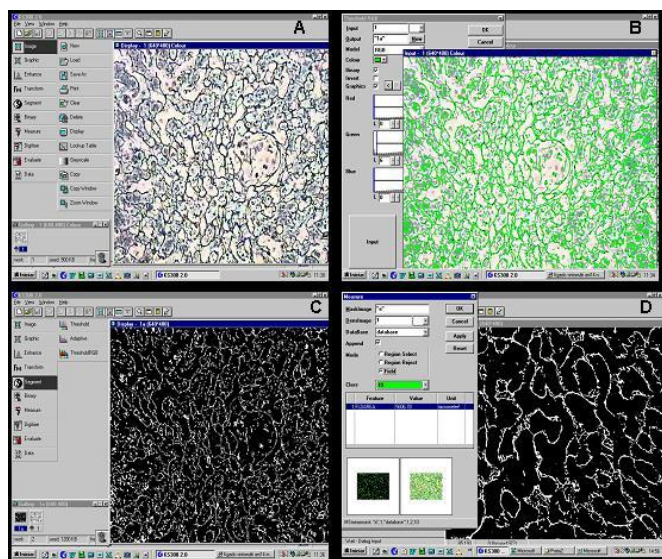


Figura 1 - Sequência de comandos no Software KS300 para determinação da deposição de colágeno no parênquima hepático. (A) Digitalização da imagem; (B) Seleção dos pixels das fibras colágenas; (C) Obtenção da imagem binária para posterior obtenção da área correspondente ao colágeno; (D) Obtenção da área correspondente ao colágeno.

3.3.14 - Análise Estatística

As análises foram realizadas utilizando o programa Graph Pad Prisma 5.0. Todas as análises foram feitas aleatoriamente e os resultados agrupados no grupo de cães infectados sintomáticos ou assintomáticos e de cães não infectados (controles). Os resultados obtidos para os elementos traço, enzimas, NO, TBARs, Fe e fibrose foram comparados entre os grupos de cães sintomáticos, assintomáticos e controles através de ANOVA one-way e teste de Tukey post-hoc. Seguido por análises residuais para verificar a distribuição de erro e adequação do modelo normal. Alterações teciduais (intensidade e frequência) e imunohistoquímica para amastigotas no tecido foram comparadas entre os grupos utilizando o teste de Kruskal-Wallis por não terem distribuição normal. O coeficiente de correlação de Spearman foi calculado para avaliar a correlação entre as variáveis dos grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Análise sorológica e parasitológica

As amostras dos 30 cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Ribeirão das Neves (CCZ), Região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, tiveram sorologia positivas reconfirmadas para RIFI e ELISA e exames parasitológicos positivos para esfregaço de medula óssea e fragmento de pele (5 mm “punch”).

Os nove cães provenientes do controle de zoonoses da região não endêmica de Carandaí, MG tiveram sorologia negativa, reconfirmada para RIFI e ELISA, e exames parasitológicos negativos para esfregaço de medula óssea e fragmento de pele (5 mm “punch”), assim como para a técnica de PCR convencional com a amplificação de fragmentos específicos para a espécie de *L. infantum chagasi* (Figura 2).

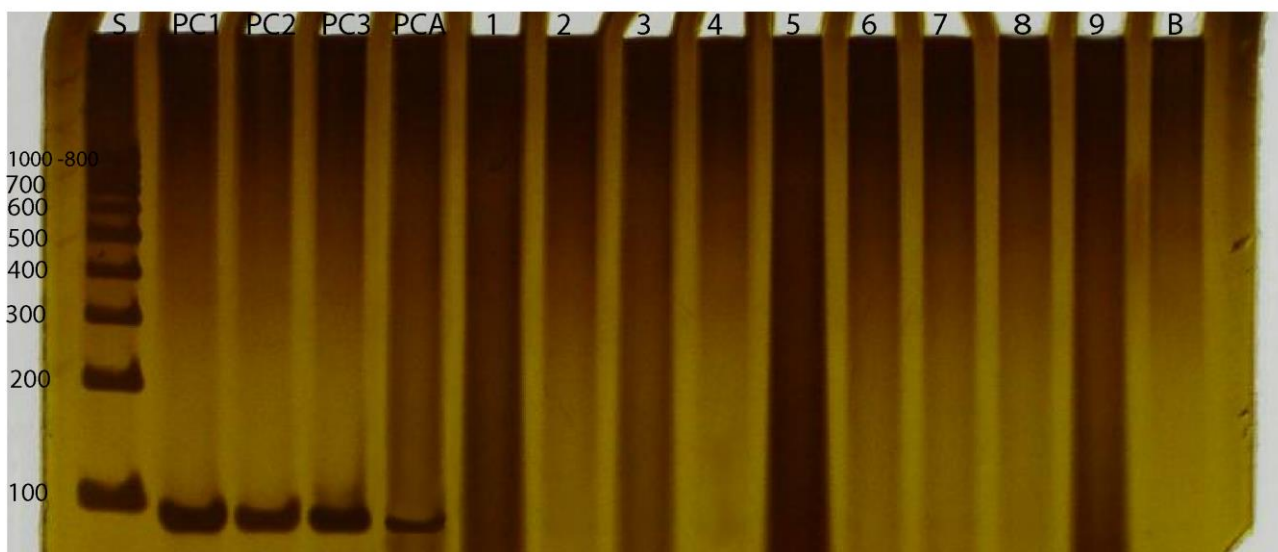


Figura 2 - Análise do produto de PCR.. Resultados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 5%. S – peso molecular 100 bp (Thermo-Scientific); PC1 e PC3 *L. infantum* (MHOM/BR/1972/BH46 strain) genomic DNA; – Controle positivo 10 pico mols de DNA *L. infantum*; PC2 – pGEM-T Easy vector system plasmid (Promega) contendo fragmento de 90-bp do gene da DNA polymerase da *L. infantum*, PCA – controle positivo do material das amostras (extração). 1 – 9 amostras dos 9 cães ditos controles. B – branco da reação.

4.2- Associação entre os níveis de elementos traço e atividade antioxidante

Níveis séricos de Fe e Zn apresentaram-se significativamente menores no grupo dos animais sintomáticos (grupo CS) do que nos grupos dos cães assintomáticos (CA) e animais-controle (C) ($P < 0,01$ para todos) (Figura. 3 A e C). Em contraste, os níveis séricos de Cu no grupo CS foram significativamente maiores comparados aos grupos CA e C ($P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente) (Figura 3 B). A concentração de Se se apresentou significativamente diminuída nos grupos CS e CA comparados ao grupo C ($P < 0,001$ e $P < 0,01$, respectivamente), e também diminuída comparando-se aos grupos CS e CA ($P < 0,01$) (Fig. 3 D).

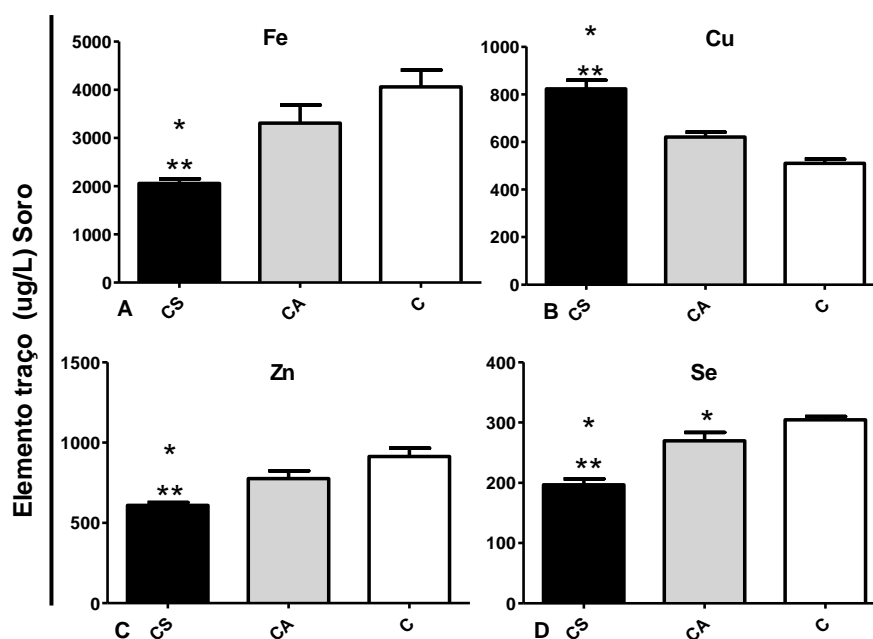


Figura 3. - Níveis dos elementos traço em animais controle e infectados com *L. infantum chagasi*. Concentrações séricas de Fe (A), Cu (B), Zn (C) e Se (D) em cães sintomáticos (CS), cães assintomáticos (CA) e controle (C). Diferença significativa ($P \leq 0,05$) em relação aos cães do grupo controle foi representada por * e em relação ao grupo CA por **

A enzima antioxidante CAT foi mensurada no sangue e GSH-Px no sangue e plasma. Encontramos uma diminuição significativa da CAT no sangue e GSH-Px no plasma dos animais dos grupos CS ($P < 0,001$ e $P < 0,01$, respectivamente) e CA ($P < 0,001$ e $P < 0,01$, respectivamente) comparados aos níveis encontrados no grupo C

(Figura 4 A, B). A atividade da GSH-Px no sangue apresentou-se diminuída nos grupos CS ($P < 0,0001$) e CA ($P < 0,001$) comparados ao grupo C. Essa atividade de GSH-Px CS foi ainda diminuída quando comparada aos animais do grupo CA ($P < 0,01$) (Figura. 4 C).

Os grupos CS e CA apresentaram atividade significativamente aumentada da SOD comparada ao grupo C ($P < 0,01$ e $P < 0,01$, respectivamente) (Figura. 4 D).

Observamos uma correlação positiva nos grupos CS e CA entre a GSH-Px e o Se no sangue ($r = 0,758$ e $P = 0,001$; $r = 0,643$ e $P = 0,01$) e no plasma ($r = 0,588$ e $P = 0,01$; $r = 0,623$ e $P = 0,01$) e uma correlação positiva entre a CAT e o Fe no grupo dos animais infectados ($r = 0,658$ e $P = 0,01$; $r = 0,639$ e $P = 0,01$), mas nenhuma correlação entre a SOD e Cu ou Zn.

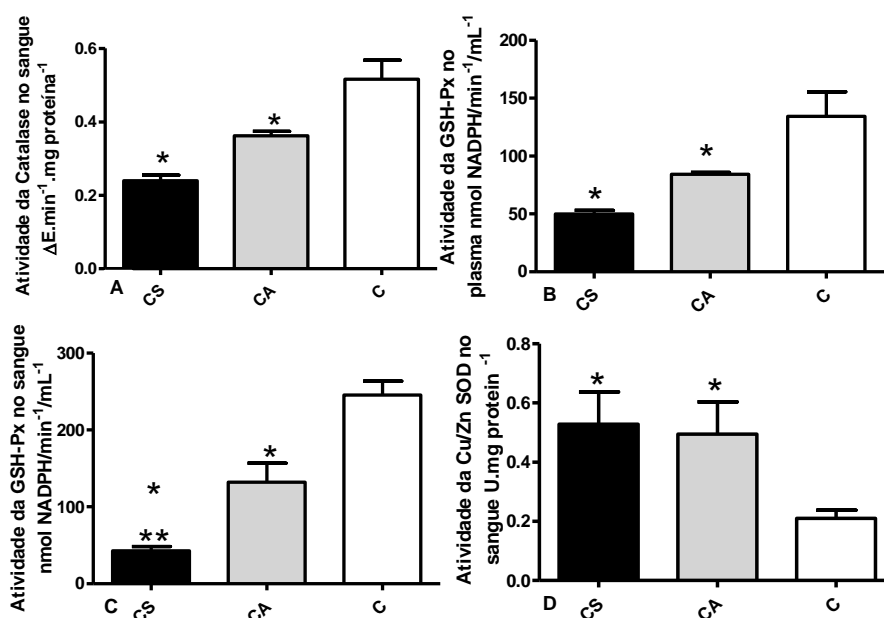


Figura 4. - Atividades das enzimas antioxidantes no sangue ou plasma de animais controles e infectados com *L. infantum chagasi*. CAT (A), GSH-Px no sangue (B) e no plasma (C) e SOD (D) em cães sintomáticos (CS), cães assintomáticos (CA) e controle (C). Diferença significativa ($P \leq 0,05$) em relação ao grupo controle foi representada por * e em relação ao grupo CA por **.

Atividades das enzimas CAT, GSH-Px e SOD nos tecidos do fígado (Figura 5 A-C), baço (Figura 5 D-F) e linfonodo (Figura 5 G-I) apresentaram-se significativamente diminuídas ($P < 0,05$) nos grupos CS e CA comparados ao grupo C. Entretanto, nenhuma diferença foi observada entre os animais infectados (Figura 5 A-I).

Não evidenciamos nenhuma correlação entre enzimas dos tecidos e os elementos traço séricos.

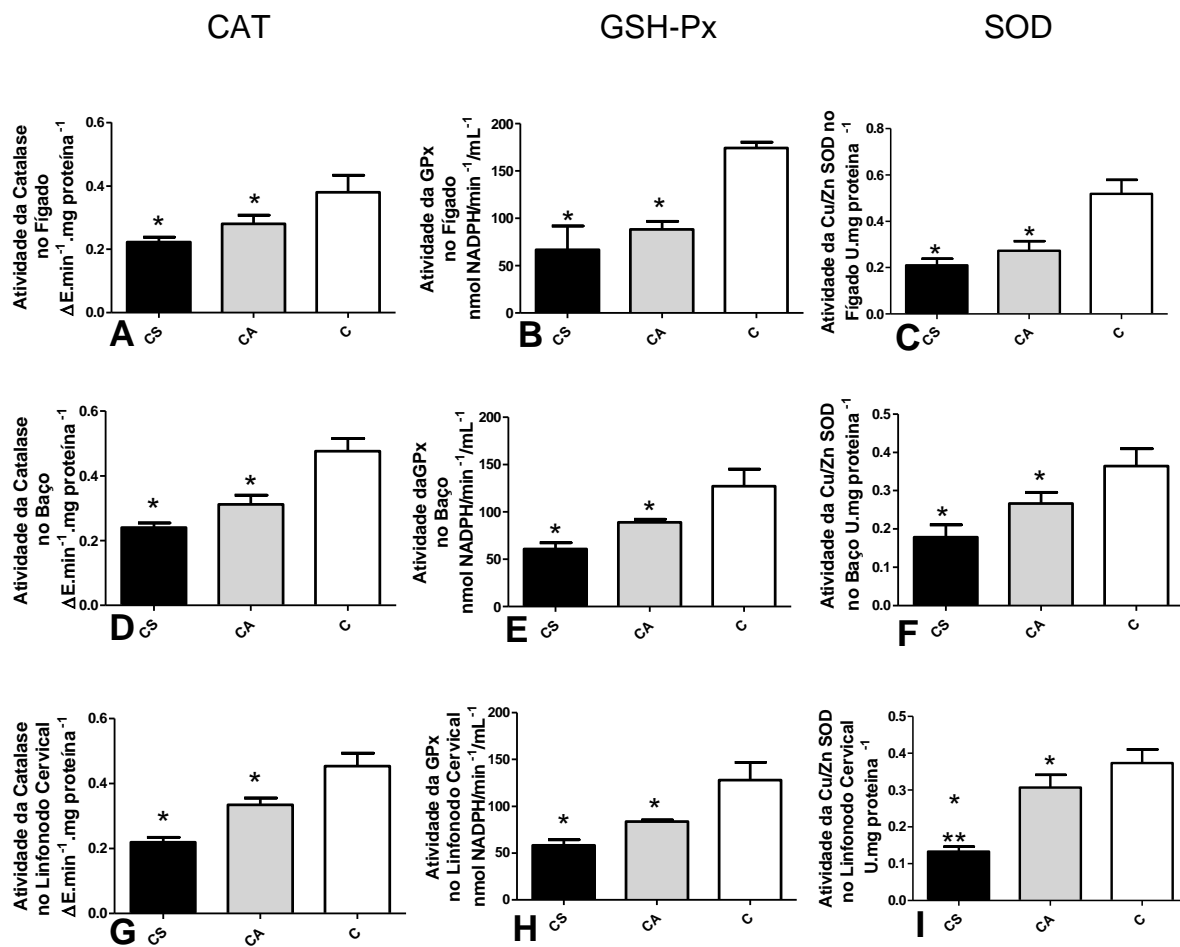


Figura 5. Atividades das enzimas antioxidantes nos tecidos de animais controles e infectados com *L. infantum chagasi*. **CAT** Fígado (A), Baço (D) e Linfonodo Cervical (G); **GSH-Px** Fígado (B), Baço (E) e Linfonodo Cervical (H) e **SOD** Fígado (C), Baço (F) e Linfonodo Cervical (I) em cães sintomáticos (SD), cães assintomáticos (CA) e controle (C). Diferença significativa ($P \leq 0.05$) em relação ao grupo controle foi representada por * e em relação ao grupo CA por **.

4.3 - Peroxidação Lipídica (LPO) – mensurada como TBARs

LPO foi significativamente elevada no plasma dos animais infectados dos grupos CS e CA comparada ao grupo C ($P < 0,0001$; e $P < 0,01$) e elevada nos animais do grupo CS ($P < 0,001$) comparados ao grupo CA (Figura 6).

Correlação negativa foi observada entre LPO e Zn e Se ($P > 0,01$ e $r = -0,785$; $P > 0,01$ e $r = -0,765$, respectivamente) e correlação positiva entre LPO e Cu ($P > 0,01$ e $r = 0,657$) nos animais infectados.

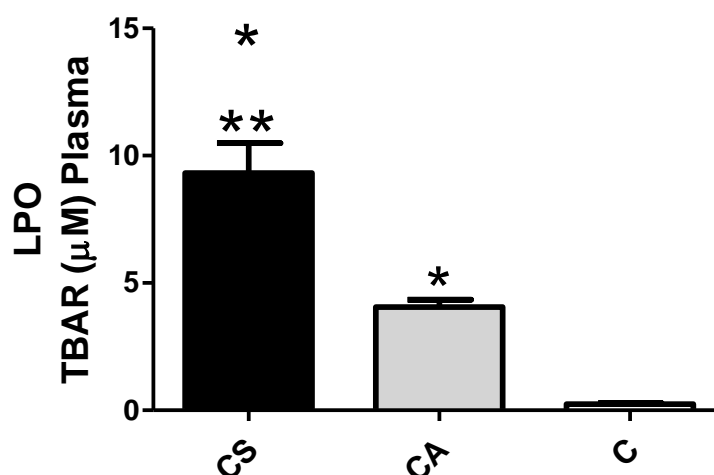


Figura 6 – Peroxidação Lipídica (LPO) no plasma de animais controle e infectados com *L. infantum chagasi*. Cães sintomáticos (CS), cães assintomáticos (CA) e controle (C). Diferença significativa ($P \leq 0,05$) em relação ao grupo controle foi representada por * e em relação ao grupo (CA) por **.

Observamos também aumento significativo da LPO no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais estimulada com 50 µM de Fe nos tempos de 24 horas (h) ($P = 0,03$), 48 h ($P = 0,006$), e 72 h ($P = 0,03$) (Figura 7).

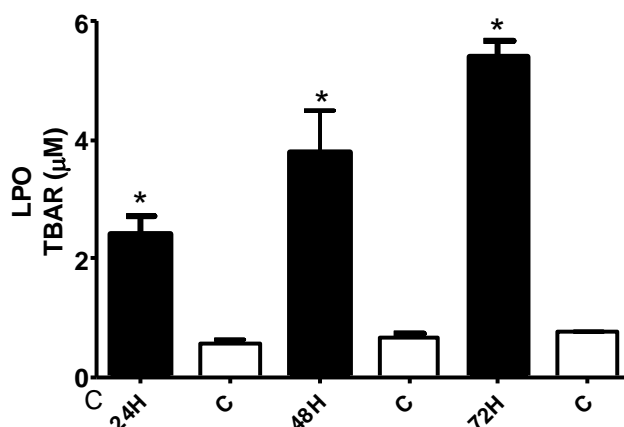


Figura 7 – Peroxidação lipídica (LPO) em cultura de macrófago peritoneal de cães do grupo controle suplementadas com 50 uM de Fe (■). Experimentos realizados em quintuplicata para cada tempo (24, 48 e 72 horas) com células de 2 cães controles. Diferença significativa ($P \leq 0,05$) em relação ao controle (□) foi representada por *

4.4 Aspectos histológicos e parasitológicos

4.4.1. Fígado

Através da análise microscópica dos fragmentos de fígado de todos os animais infectados observamos: (1) inflamação portal, perivascular e capsular, variando de leve a severa, com predomínio de células mononucleares (plasmócitos, macrófagos e linfócitos) (Figura 8 A-E); (2) presença de granulomas intralobulares constituídos principalmente de macrófagos, parasitados ou não, plasmócitos, linfócitos e raros polimorfonucleares neutrófilos e/ou eosinófilos. (Figura 8 C); (3) hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer, muitas parasitadas por amastigotas (Figura 8 F), sendo o parasitismo significativamente maior ($p < 0,01$) nos CS quando comparados aos CA (Teste T não pareado); (4) degeneração hidrópica e esteatose microvesicular (Figura 8 E); (5) congestão sinusoidal; e (6) hemossiderose, evidenciada principalmente e em maior intensidade nos CS (Figura 8 C).

A Intensidade e frequência (Tabela 2) das lesões teciduais foram significativamente maiores ($P < 0,05$) nos animais infectados comparados aos controles. A frequência do espessamento capsular associado com a inflamação foi maior nos CS comparados aos CA ($P < 0,04$). O contrário foi observado para os

granulomas hepáticos, isto é, sua frequência foi maior nos CA quando comparados aos CS ($P = 0,01$). A frequência e intensidade dos depósitos de hemossiderina, principalmente nos capilares sinusoides indicando hemocromatose, foram significativamente maiores nos CS comparados aos CA ($P = 0,04$; $P < 0,02$). Necrose hepatocelular também foi evidenciada, mas não foi amplamente frequente ou intensa.

Tabela 2Avaliação histopatológica e parasitológica do fígado de cães controles e infectados com *Leishmania infantum*.

Histopatologia	Simtomáticos – N = 19					Assintomático – N = 11					Controle – N = 9			
	A	L	M	S	$P \leq 0,05^A$ / / F	A	L	M	S	$P \leq 0,05^A$ / / F	A	L	M	S
<u>Inflamação Capsular</u>	<u>9</u>	<u>7</u>	<u>3</u>	<u>0</u>	<u>*/**</u>	5	2	1	3	*/*	9	0	0	0
<u>Espessamento capsular</u>	<u>8</u>	<u>8</u>	<u>3</u>	<u>0</u>	<u>*/**</u>	7	2	1	0	*/*	9	0	0	0
Inflamação Portal	3	10	2	4	*/*	0	4	4	3	*/*	9	0	0	0
<u>Presença de granuloma intralobular</u>	<u>10</u>	<u>8</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	<u>*/**</u>	0	5	3	3	*/*	9	0	0	0
Hiperplasia das células de Kupffer	1	10	6	3	*/*	2	9				9	0	0	0
Degeneração	0	5	8	6	*/*	0	2	6	3	*/*	7	2	0	0
Congestão	3	4	10	2	*/*	0	5	3	3	*/*	7	2	0	0
<u>Hemossiderina</u>	<u>11</u>	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>0</u>	<u>*/**</u>	9	2	0	0	*/*	8	1	0	0
Fibrose (μm^2) ^B	2751 ± 866 * **					2039 ± 597					1567 ± 303			
Diagnóstico Parasitológico	26,4 ± 5					10,6 ± 2					0			

^AAnálise das lesões hepáticas classificadas de acordo com a frequência (ausência (A) ou presença) e intensidade em: leve (L); moderada (M) e Severa (S). Diferença significativa ($P \leq 0.05$) relativa ao controle foi representada por * e relativa aos cães Assintomáticos por**.

^B Valores foram expressos como média ± desvio padrão.

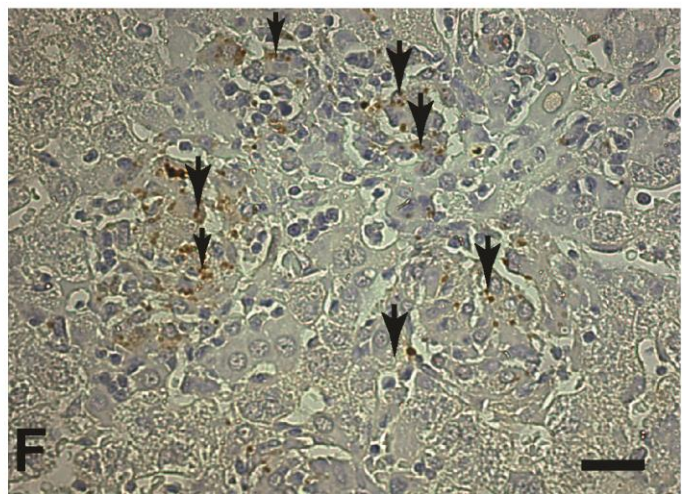
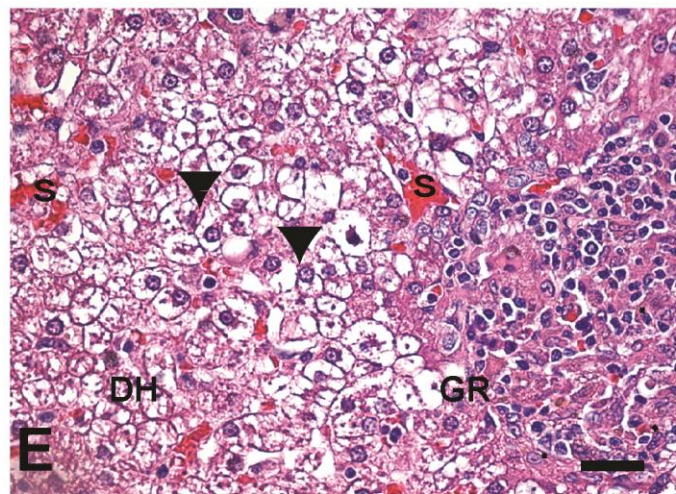
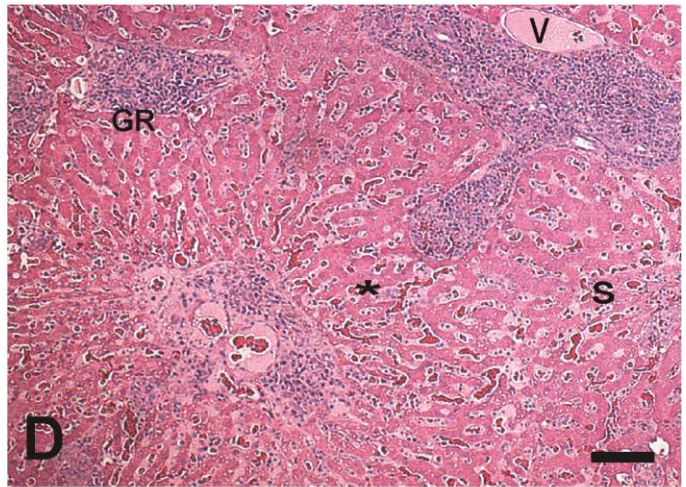
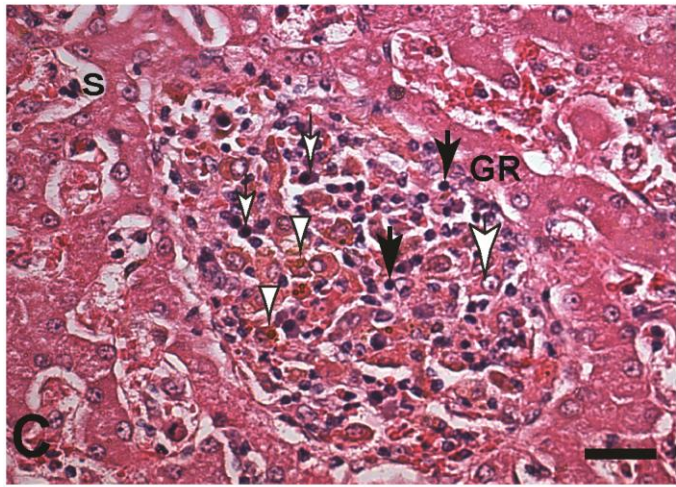
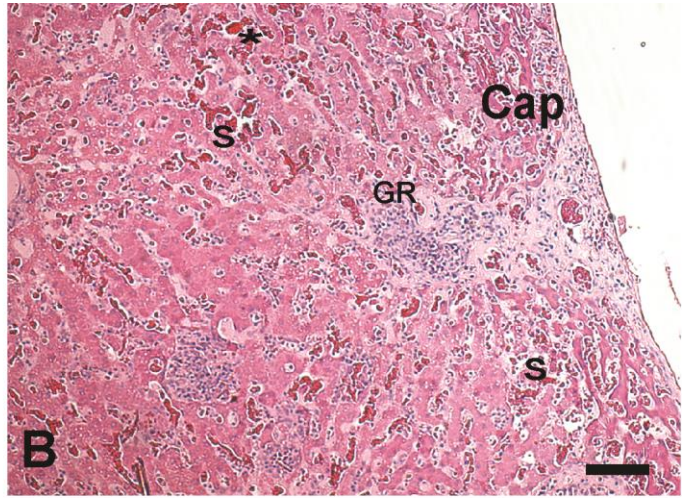
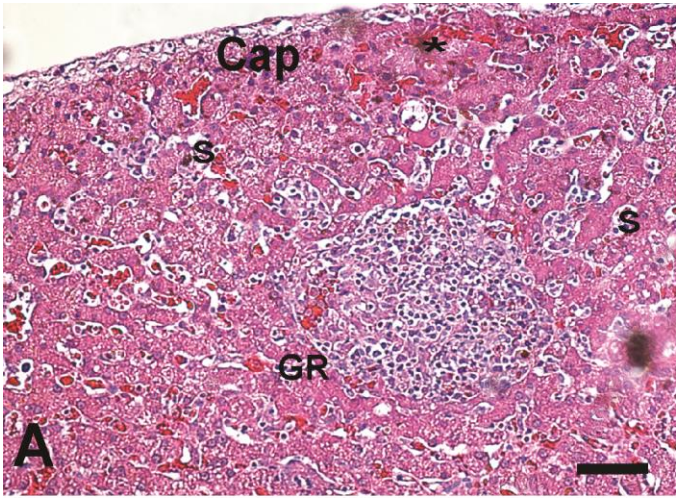


Figure 8 -: Imagens representativas de cortes histológicos parafinados de fragmentos de fígado de cães naturalmente infectados com *L. infantum*. **(A e B)** – Inflamação e espessamento da cápsula de Glisson (Cap). No lóbulo hepático observar formação de granulomas (GR), áreas de congestão sinusoidal (S) (*). **(C)** Detalhe de um granuloma intralobular contendo macrófagos, plasmócitos (seta branca), linfócitos (seta preta), células epitelioides (seta grande branca). Notar a presença de grânulos de hemossiderina dentro de macrófagos (cabeça de seta branca) **(D)**, Observar intenso infiltrado inflamatório nos espaços-porta. **(E)** Detalhe do lóbulo hepático evidenciando hepatócitos em intensa degeneração hidrópica (DH cabeça de seta preta). A direita da figura presença de granuloma (GR) **(F)** Observar infiltrado inflamatório crônico de mononucleares no espaço-porta e formas amastigotas de *Leishmania* no interior de macrófagos (setas pequenas pretas). **Cap** – cápsula; **GR** – granuloma; **V** – vaso; **DH** – degeneração Hidrópica **S** - sinusoide. **A - E** - H&E; **F**- Estreptoavidina-peroxidase. Barras **(A, B e D)** = 62 μm , **(C-F)** = 16 μm .

4.4.2 - Alterações Esplênicas

As principais alterações histopatológicas observadas em todos os animais infectados foram: (1) inflamação crônica e espessamento da cápsula (fibrose); (5) congestão sinusoidal (polpa vermelha) com conseqüente deposição de pigmentos de hemossiderina principalmente observados no grupo dos animais CS (confirmado pela coloração especial do Azul da Prússia) (Figura 9 A, B); (2) depleção da polpa branca: a substituição dos linfócitos por macrófagos ao redor da arteríola central na polpa branca foi uma alteração observada em alguns casos (Figura 9 C, D); (3) hiperplasia e hipertrofia da polpa branca - A polpa branca foi evidente apresentando folículos linfóides muitas vezes confluentes, com células dispostas em diferentes camadas. As células mais centrais eram claras com núcleo vesiculoso e citoplasma acidófilo, as mais periféricas eram mais escuras evidenciando núcleos bem corados pela Hematoxilina (4) hiperplasia e hipertrofia da polpa vermelha em decorrência do aumento do número de macrófagos. Por vezes esses macrófagos formavam arranjos especiais em forma de nódulos ou granulomas conhecidos como Granuloma de Virchow. Esses macrófagos apresentavam citoplasma amplo, pouco corado e cromatina frouxa. (Figura 9 E). Não raro apresentavam-se parasitados com inúmeras formas amastigotas de *Leishmania*. Vários parasitos foram evidenciados nos macrófagos sinusoidais, sendo a parasitose significativamente mais intensa nos animais do grupo CS ($P < 0,02$) (Teste T) (Figura 9 F); (5) plasmocitose presença de inúmeros plasmócitos caracterizados por morfologia peculiar: núcleo excêntrico deslocado para a periferia da célula, cromatina hipercondensada e granulosa, citoplasma amplo tendendo à basofilia, por vezes vacuolizados (vacúolo representando morfologia sugestiva da hipertrofia do complexo de Golgi devido à atividade protéica intensa dessas células como produtoras de anticorpos) ou por vezes tendo a acidofilia indicando exaustão funcional (Corpúsculo de Russel – inclusão citoplasmática como indicativo morfológico da degeneração hialina).

A Intensidade e frequência (Tabela 3) das lesões teciduais foram significativamente maiores ($P < 0,05$) nos animais infectados quando comparados aos controles. O espessamento capsular e a inflamação foram significativamente mais frequentes no grupo CS comparados ao grupo CA ($P = 0,01$); granulomas de Virchow,

que foram mais intensos e frequentes no grupo CS ($P = 0,001$ e $P = 0,01$). A frequência da depleção de áreas T dependentes foi maior nos CS comparados aos CA ($P = 0,02$). Intensa congestão ($p < 0,01$) e intensa e frequente deposição de hemossiderina foram observadas na polpa vermelha dos CS comparados aos CA ($P < 0,01$ e $P = 0,01$). Além disso, a carga parasitária no baço, da mesma forma que no fígado, foi mais elevada nos CS ($P = 0,0269$).

Tabela 3Avaliação histopatológica e parasitológica do baço de cães controle e infectados com *Leishmania infantum chagasi*.

Histopatologia	Sintomático – N = 19					Assintomático – N = 11					Controle – N= 9			
	A	L	M	S	$P \leq 0,05^A$ I/F	A	L	M	S	$P \leq 0,05^A$ I/F	A	L	M	S
<u>Inflamação Capsular</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>** **</u>	7	2	1	1	*/*	9	0	0	0
<u>Espessamento capsular</u>	<u>0</u>	<u>6</u>	<u>8</u>	<u>5</u>	<u>*/* **</u>	5	2	2	2	*/*	9	0	0	0
<u>Granuloma de Virchow</u>	<u>1</u>	<u>12</u>	<u>4</u>	<u>2</u>	<u>** */* **</u>	5	3	1	0	*/*	9	0	0	0
Hipertrofia/Hiperplasia da polpa branca	9	5	5	0	*/*	1	2	6	0	*/*	9	0	0	0
Hipertrofia/Hiperplasia da polpa vermelha	2	3	1	2	*/*	1	3	7	0	*/*	9	0	0	0
<u>Depleção da area T</u>	<u>0</u>	<u>6</u>	<u>8</u>	<u>5</u>	<u>*/* **</u>	5	4	2	0	*/*	9	0	0	0
Hemossiderina	11	3	4	3	* ** */* **	8	2	1	0	*/*	9	0	0	0
<u>Congestão</u>	<u>0</u>	<u>4</u>	<u>6</u>	<u>9</u>	<u>* ** /*</u>	0	5	3	3	*/*	7	2	0	0
Fibrose (μm^2) ^b	3064 ± 881 * **					2022 ± 385					1516 ± 345			
Parasitológico	32 ± 6					8,4 ± 2					0			

^A Análise das lesões hepáticas classificadas de acordo com a frequência (ausência (A) ou presença) e intensidade em: leve (L); moderada (M) e Severa (S). Diferença significativa ($P \leq 0.05$) relativa ao controle foi representada por * e relativa aos cães Assintomáticos por**.

^B Valores foram expressos como média ± desvio padrão.

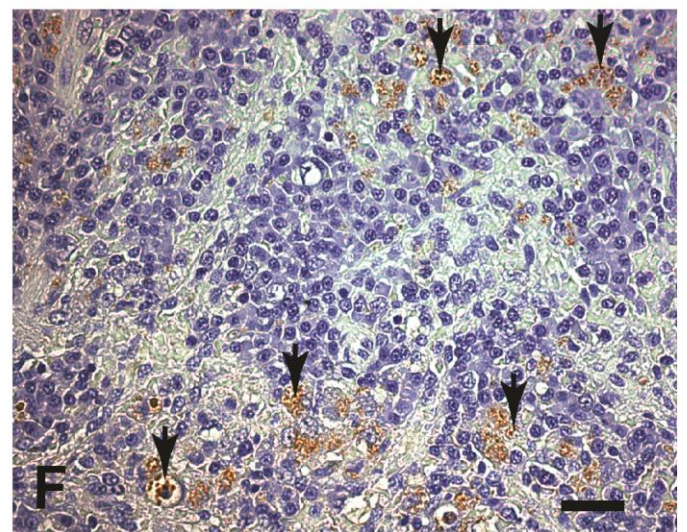
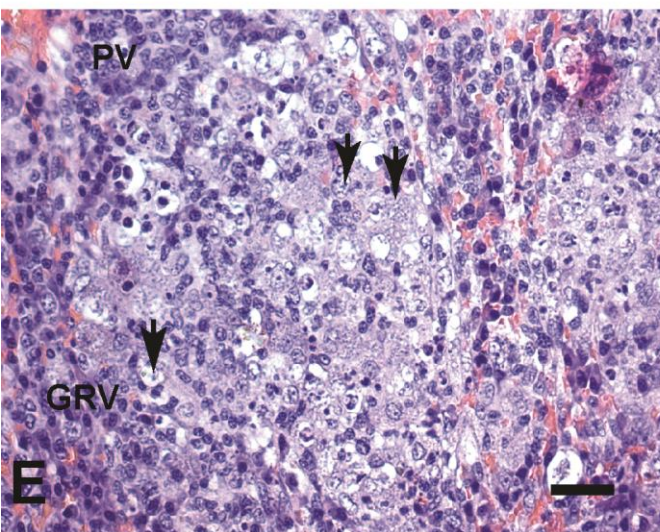
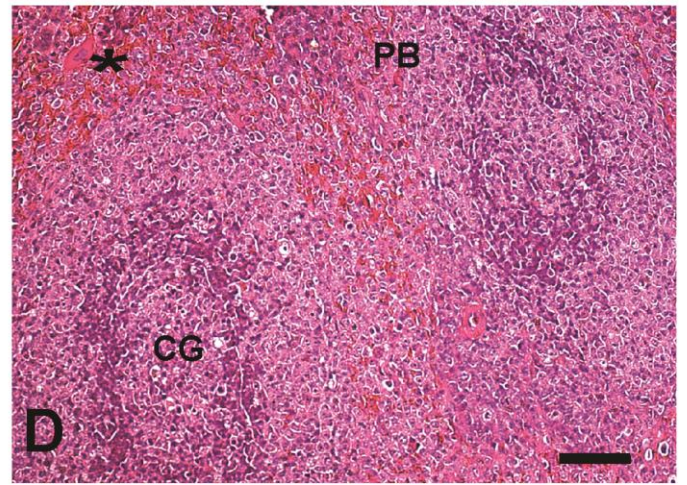
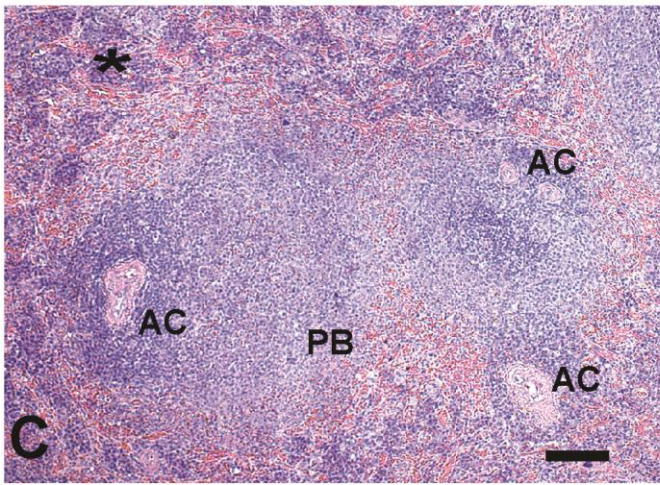
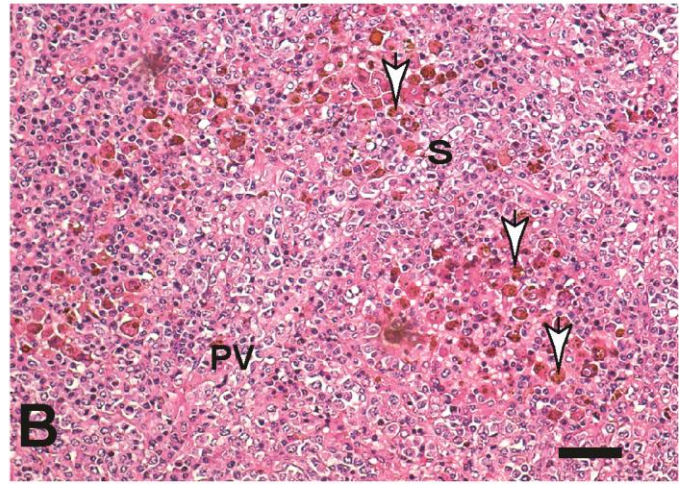
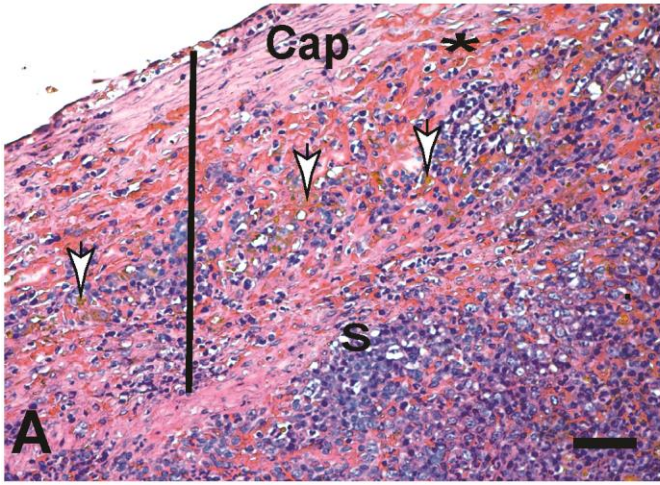


Figura 9 – Imagens representativas de cortes histológicos de fragmentos de baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. **(A)** observar cápsula espessada (Cap), polpa vermelha congesta (*). Grande deposição de hemossiderina (setas brancas) presentes na região cortical e medular **(B)** com macrófagos contendo grânulos marrons grosseiros. **(C)** Cão sintomático: polpa vermelha congesta (*), hiperplasia e confluência de polpa branca (PB) sem formação de centro germinativo e muitas vezes com depleção de área T ao redor da arteríola central (AC). **(D)** Cão assintomático: observar polpa vermelha congesta (s*) e polpa branca reativa, apresentado folículo linfoide evidente hipertrófico e confluindo. Células centrais no centro germinativo (CG) são mais claras com núcleos vesiculosos e citoplasmas acidófilos contendo ou não parasitos. As células mais periféricas são mais escuras evidenciando seus núcleos bem corados pela Hematoxilina. **(E)** Região da polpa vermelha contendo células epitelioides, macrófagos hipertróficos e vacuolizados, sendo alguns deles repletos de formas amastigotas de *Leishmania* (setas pretas) formando estruturas semelhantes à granuloma de Virchow. **(F)** Notar a presença de numerosas formas amastigotas imunomarcadas no interior de macrófagos da polpa vermelha (setas pretas). **Cap** – capsula; **S** – sinusoide; **AC** - arteríola central; **PB** – polpa branca; **PV** – polpa vermelha; **CG** – centro germinativo. **A – E** - H&E; **F**- Estreptoavidina-peroxidase. Barras (**A - D**) = 62 µm, (**E, F**) = 16 µm.

4.4.3 - Alterações no Linfonodo Cervical

As alterações observadas nos linfonodos cervicais dos cães infectados foram: (1) inflamação crônica da cápsula e dos seios subcapsulares (linfadenite capsular); (2) hiperplasia e hipertrofia dos folículos linfóides com formação de centro germinativos com ou sem expansão da camada da paracortical. (3) hiperplasia e hipertrofia das células dos cordões e seios medulares representadas principalmente por plasmócitos, macrófagos (por vezes diferenciados em células epitelióides e linfócitos). Não raro os macrófagos mostravam-se parasitados apresentando formas amastigotas de *Leishmania* no seu citoplasma. (4) congestão dos vasos dos cordões e seios medulares com deposição de pigmentos de hemossiderina (Figuras 10 A-C). Parasitos foram evidenciados significativamente em maior número nos animais do grupo CS ($P < 0,01$) nas áreas subcapsulares e de cordões medulares (Figura 10 D).

Intensidade e frequência (Tabela 4) das lesões teciduais foram significativamente maiores ($P < 0,05$) nos animais infectados comparados aos controles. A Intensidade e frequência do espessamento capsular associada à inflamação foram maiores no grupo CS comparadas ao grupo CA ($P < 0,01$ e $P < 0,01$). A frequência e distribuição da hemossiderina foram maiores no grupo CS ($P < 0,01$; $P = 0,01$) quando comparados ao grupo CA. Da mesma forma, a carga parasitária foi significativamente maior no grupo CS ($P = 0,01$).

Correlação negativa foi demonstrada entre a atividade antioxidante das enzimas teciduais: (1) do fígado e sua inflamação capsular e portal; (2) do baço e sua inflamação capsular, congestão, hemossiderina e fibrose e, (3) do linfonodo cervical com a inflamação capsular e a CAT (Tabela 5).

Tabela 4Avaliação histopatológica e parasitológica do linfonodo cervical de cães controles e infectados com *Leishmania infantum*

Histopatologia	Sintomático – N = 19					Assintomático – N =11					Controle – N =9			
	A	L	M	S	$P \leq 0,05^A$ I / F	A	L	M	S	$P \leq 0,05^A$ I / F	A	L	M	S
<u>Inflamação Capsular</u>	0	7	9	3	***/* **	4	4	3	0	*/*	8	1	0	0
<u>Espessamento capsular</u>	5	6	5	2	*. **/* **	8	2	1	0	*/*	9	0	0	0
Hiperplasia de Macrófagos	0	4	12	3	*/*	0	2	8	1	*/*	9	0	0	0
Hipertrofia/Hiperplasia de folículos linfóides	9	2	4	4	*/*	3	4	2	2	*/*	8	1	0	0
Hipertrofia/Hiperplasia dos seios e cordões medulares	0	3	11	5	*/*	0	3	8	0	*/*	8	1	0	0
<u>Hemossiderina</u>	10	4	3	2	***/* **	8	1	1	1	*/*	8	1	0	0
Congestão	7	3	5	2	*/*	3	2	4	2	*/*	8	1	0	0
Fibrose (μm^2) ^b	1943 ± 392 *					1596 ± 261					1280 ± 3217			
Parasitológico ^b	28 ± 3					6,7 ± 2					0			

^AAnálise das lesões hepáticas classificadas de acordo com a frequência (ausência (A) ou presença) e intensidade em: leve (L); moderada (M) e Severa (S). Diferença significativa ($P \leq 0.05$) relativa ao controle foi representada por * e relativa aos cães Assintomáticos por**.

^B Valores foram expressos como média ± desvio padrão.

Tabela 5 – Correlação entre a intensidade das alterações histopatológicas e as enzimas antioxidantes do tecido ou deposição de Fe, produção de NO e LPO em animais infectados com *Leishmania infantum*

Tecidos Histopatologia	Fígado					Baço					Linfonodo		
	CAT	SOD	GSH-Px	Fe	LPO	CAT	SOD	GSH-Px	Fe	LPO	CAT	Fe	LPO
Inflamação	- 0,735	- 0,768	-0,781	0,659	0,659	-0,723	-0,584	-0,787	0,780	0,592	-0,729	-	-
Degeneração	-	-	-	0,758	0,698	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemossiderina	-	-	-	0,597	0,725	-0,659	-0,653	-0,783	0,677	0,652	-	0,729	0,553
Congestão	-	--	-	-	-	-0,696	-0,624	-0,774	0,723	0,734	-	-	-
Fibrose	- 0,677	- 0,598	-0,699	0,598	0,638	-0,648	-0,685	-0,598	0,678	0,658		0,726	0,698

A tabela representa apenas os valores significativos do coeficiente de correlação e Sperman ($P < 0,01$). Sem correlação significativa (-). Enzimas antioxidantes: catalase (CAT), Cu-Zn superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GSH-Px); ferro (Fe); óxido nítrico (NO) e peroxidação lipídica (LPO).

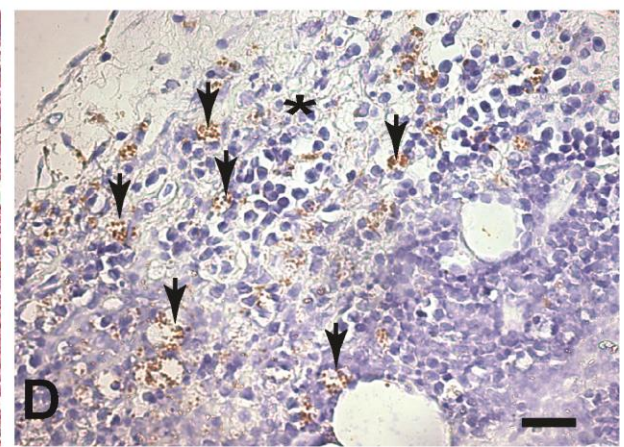
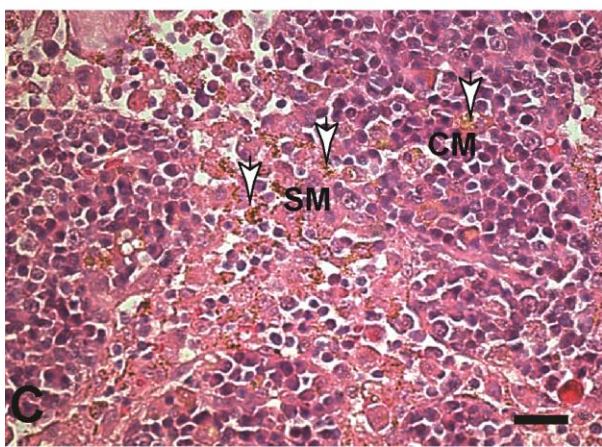
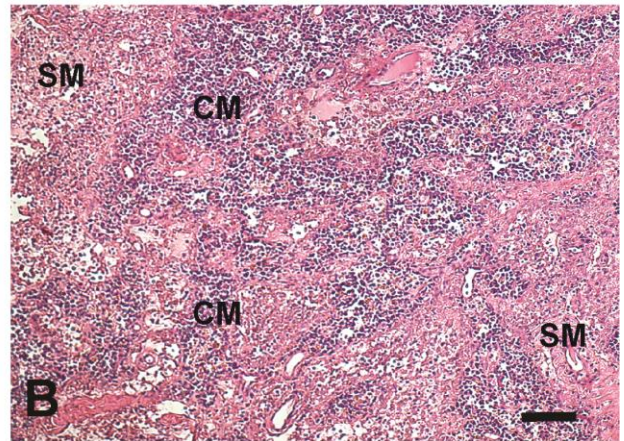
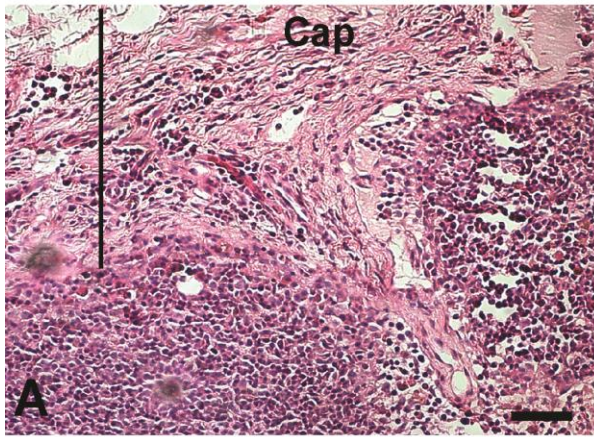


Figura 10 – Imagens representativas de cortes histológicos de fragmento de linfonodo cervical de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*: **(A)** observar cápsula (cap) e seio subcapsular espessados e inflamados. **(B)** hiperplasia e hipertrofia das células dos cordões (CM) e seios medulares (SM). **(C)** congestão dos vasos nos cordões e principalmente seios medulares com a presença de pigmentos de hemossiderina no interior de macrófagos (setas brancas) **(D)** Notar a numerosa presença de formas amastigotas imunomarcadas (setas pretas). **Cap – capsula SM – seio medular; CM – cordões medulares. A-C-H&E; D- Estreptoavidina-peroxidase. Barras (D) = 62 µm, (A, C) = 32 µm e (D) = 16 µm.**

4.5 Deposição tecidual de Fe

Em todos os órgãos estudados de todos os animais infectados observamos elevada deposição de Fe, mas sem áreas características de necrose concomitante.

No fígado observamos, pela histoquímica do azul da Prússia, deposição elevada de Fe no grupo CS comparados aos grupos CA e C ($P < 0,05$ e $P < 0,001$) e entre os grupos CA e C ($P < 0,05$) (Figura 11 A). A deposição de Fe foi observada dentro das células de Kupffer e dentro de hepatócitos (Figura 12 A, B). No baço, animais do grupo CS apresentaram maior deposição de Fe comparados aos grupos CA e C ($P < 0,05$ e $P < 0,01$), mas não houve diferença na deposição de Fe entre os grupos CA e C. (Figura 11 B). A deposição de Fe no baço apresentou-se dentro dos macrófagos da polpa vermelha, mas não na polpa branca (Fig. 12 C, D).

Nos linfonodos cervicais a deposição de Fe apresentou-se elevada no grupo CS comparados aos grupos CA e C ($P < 0,01$ e $P < 0,001$) (Figura 11 C) e foi observada dentro de macrófagos nos cordões medulares (Figura 12 E, F).

Nos animais infectados foi observada uma correlação positiva entre LPO e a deposição tecidual de Fe hepático ($P = 0,003$ e $r = 0,659$), esplênico ($P < 0,002$ e $r = 0,728$) e do linfonodo ($P < 0,01$ e $r = 0,765$), bem como entre o Fe a intensidade das alterações histológicas dos tecidos (Tabela 5)

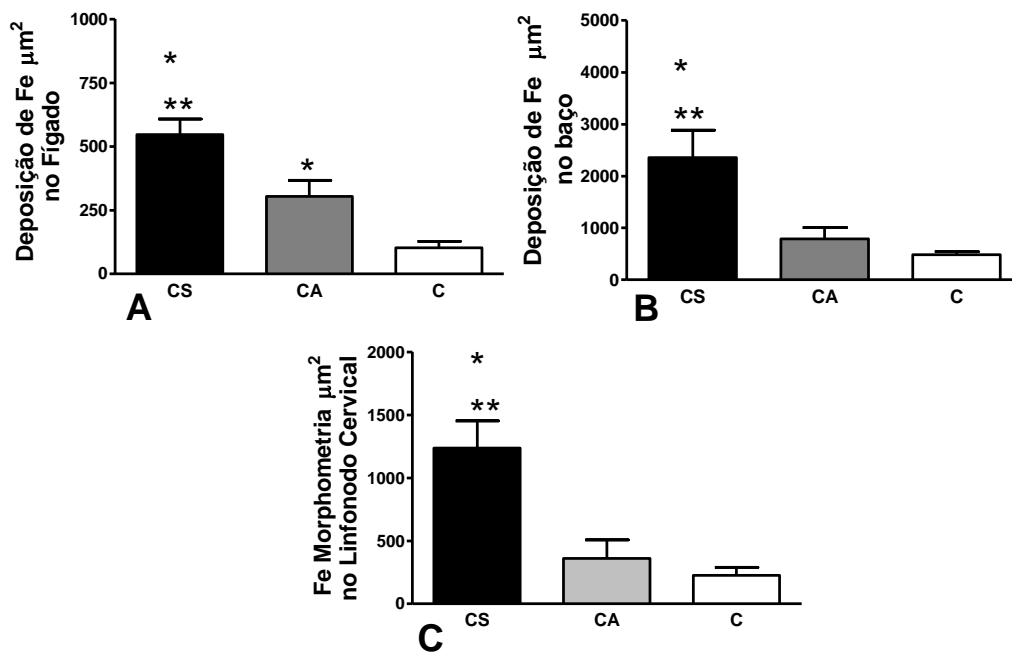


Figura 11 - Análises morfométricas do Fe no Fígado **(A)**, Baço **(B)** e Linfonodo Cervical **(C)** de cães infectados com *L. infantum* sintomáticos (CS), assintomáticos (CA) e cães do grupo controle (C). Diferença significativa ($P \leq 0,05$) em relação ao controle foi representada por * e em relação ao (CA) por **.

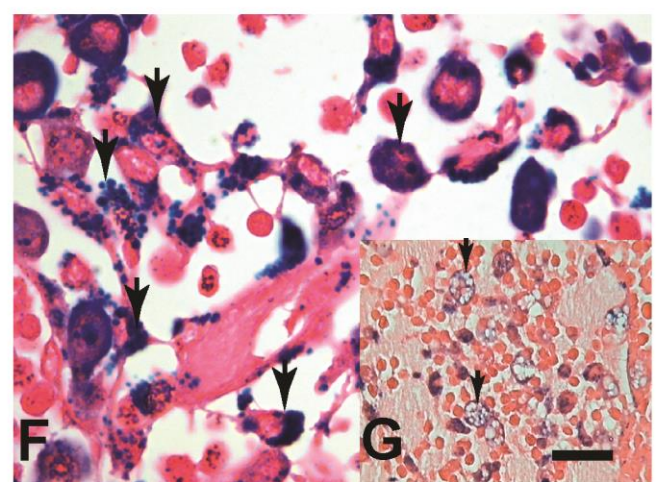
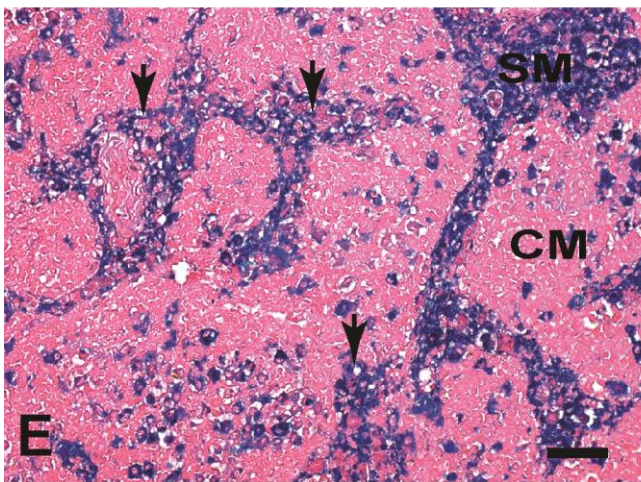
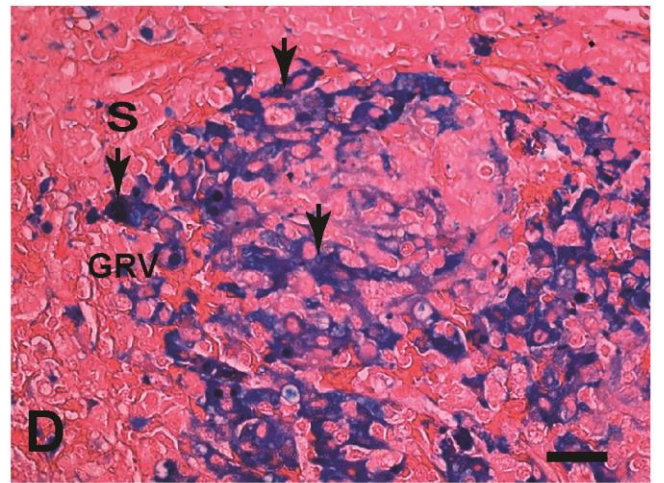
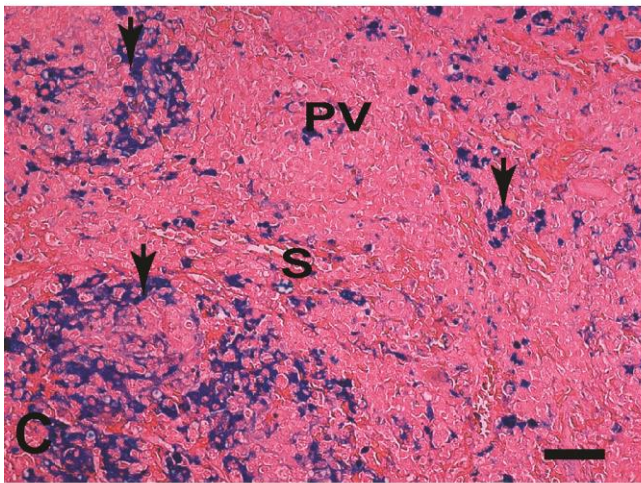
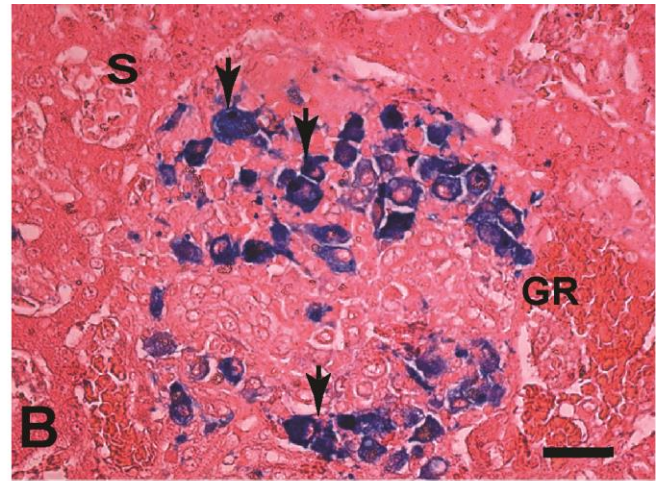
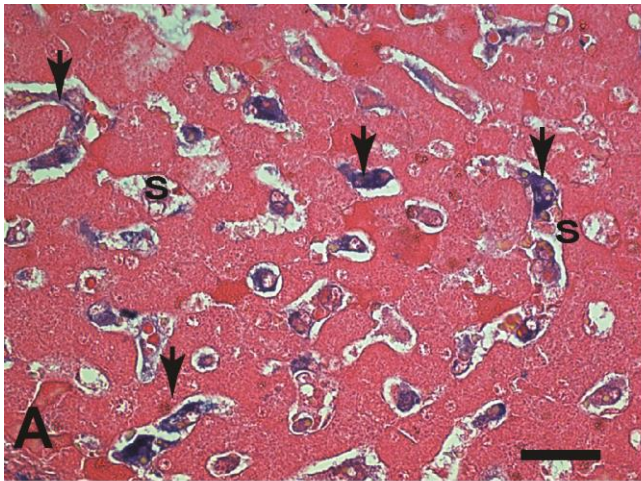


Figura 12 – Fragmentos de tecidos de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. Imagens representativas da deposição de ferro tecidual coradas pelo Azul da Prússia - **(A, B)** Fígado – observar macrófagos corados no interior dos sinusoides e em **B** detalhe de macrófagos corados (setas pretas) dentro de um granuloma (GR). **(C, D)** Baço – observar a coloração de células por toda a polpa vermelha (PV) e em **D** dentro de macrófagos hiperplásicos que formam um granuloma de Virchow (VG). (E, F) Linfonodo – macrófagos do seio marginal (SM) coradas e em **F** detalhe em maior aumento dos grânulos de ferro nos macrófagos. A direita observar inserto G com detalhes de macrófagos com aspecto de células espumosas características de inflamações crônicas. **Barras (C) = 62 µm e (A, B, D, E) = 16 µm.**

4.6 Análise do TIBC, transferrina e índice da saturação da transferrina.

A capacidade total de ligação do ferro livre (TIBC); transferrina e índice de saturação da transferrina foram significativamente diminuídos nos CS e CA em relação aos controles ($p < 0,02$) (Tabela 6).

Tabela 6- Valores de TIBC; Transferrina e índice de saturação da Transferrina (%)

Parâmetros	CS	CA	C
TIBC	153.5 ± 15 *	193,9 ± 8*	253 ± 10
Transferrina	2.03 ± 0.1*	2.40 ± 0.1*	3.05 ± 0.1
Índice de saturação da transferrina (%)	49.5 ± 7*	43.6 ± 6*	72.6 ± 5.

Diferença significativa ($P \leq 0.05$) relativa ao controle foi representada por * e relativa ao CA por**. CS – cão sintomático e CA – cão assintomático Valores foram expressos como média ± desvio padrão.

4.7 Alterações da matriz extracelular

A alteração da matriz extracelular dos tecidos foi avaliada através da marcação com prata amoniacal de Gomori. A quantificação morfométrica demonstrou aumento significativo da fibrilopiose hepática nos CS comparados aos CA e ao C ($P < 0,05$; $P < 0,01$) (Figura 13). As fibras reticulares hepáticas do espaço porta e capilares sinusoides dos CS apresentaram-se espessadas comparadas ao C. As fibras apresentaram-se espalhadas difusamente em várias direções, muitas vezes enclausurando hepatócitos isolados ou em grupo. (Figura 14).

No baço, a análise quantitativa mostrou aumento significativo de matriz extracelular entre os CS comparados aos CA ($P < 0,01$) e C ($P < 0,001$).

Entretanto, assim como no fígado, não houve diferença entre CA e C (Figura 13). As fibras depositadas no tecido dos CS apresentaram-se mais espessas (Figura 14).

Nos linfonodos cervicais, a deposição de fibras colágenas foi significativamente maior nos CS comparados aos CA e C ($P < 0,01$ e $P < 0,01$). (Figuras 13 e 14).

Foi observada correlação positiva entre a deposição de Fe e a deposição de fibras reticulares nos órgão analisados. No fígado observamos tal correlação nos CS ($r = 0,5735$ e $P = 0,0161$) e CA ($r = 0,7608$ e $P = 0,0086$). No baço a correlação positiva também ocorreu nos CS ($r = 0,6250$ e $P = 0,0073$) e CA ($r = 0,7333$ e $P = 0,03$). No linfonodo ocorreu tal correlação nos mesmos grupos, isto é, CS ($r = 0,62$ e $P = 0,002$) e CA ($r = 0,659$ e $P = 0,01$).

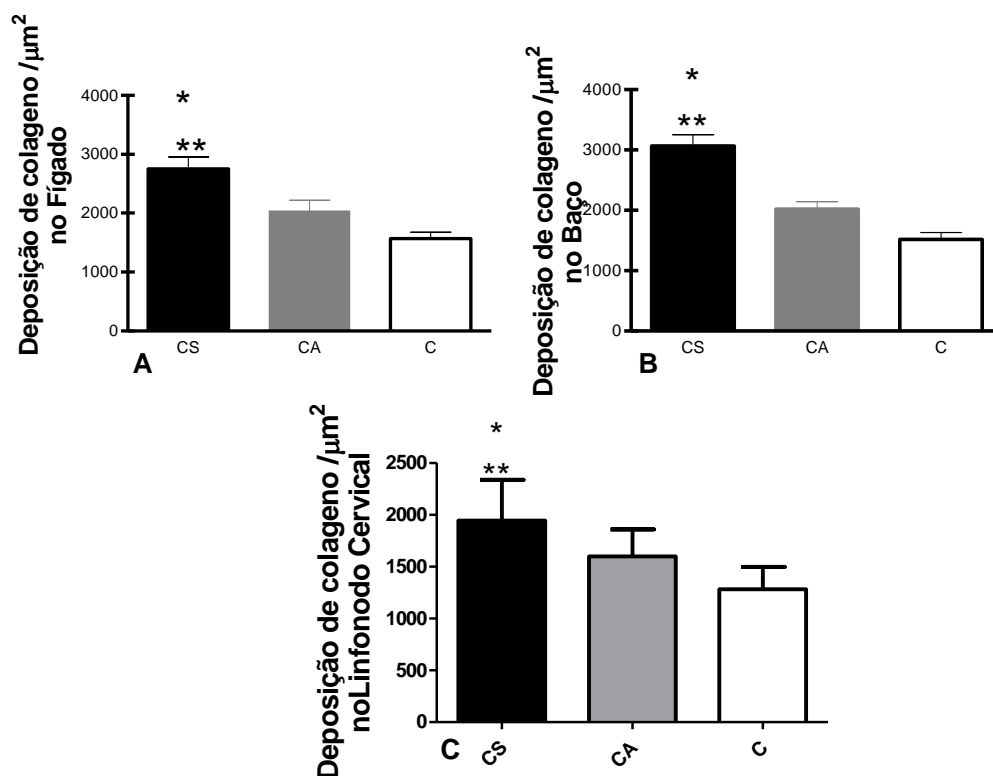


Figura 13 – Análise morfométrica da deposição de colágeno intersticial em cães controles e infectados por *L. infantum*. Fígado (A), Baço (B) e Linfonodo Cervical (C). Cães sintomáticos (CS), cães assintomáticos (CA) e controle (C). Diferença significativa ($P \leq 0,05$) em relação ao controle foi representada por * e em relação ao (CA) por **.

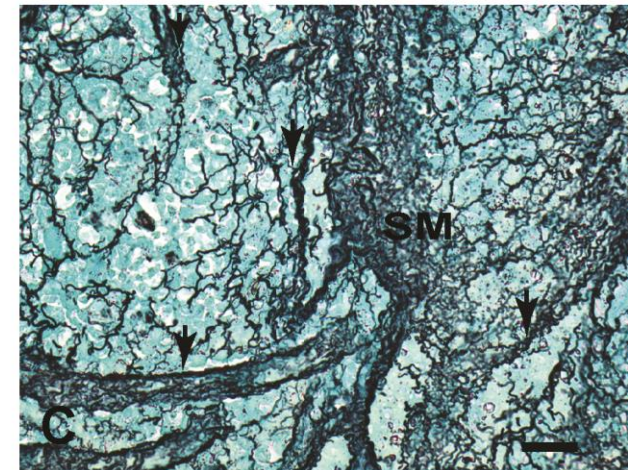
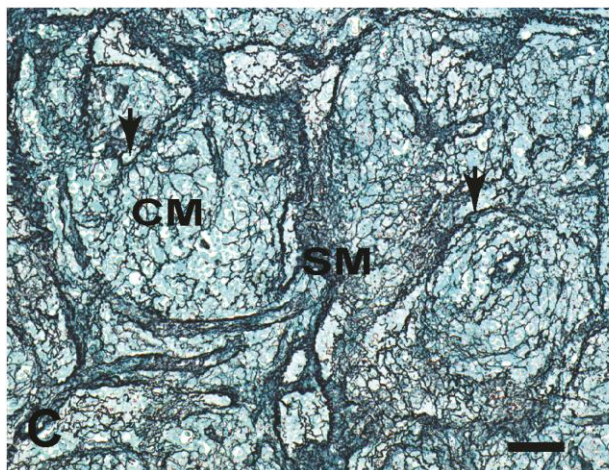
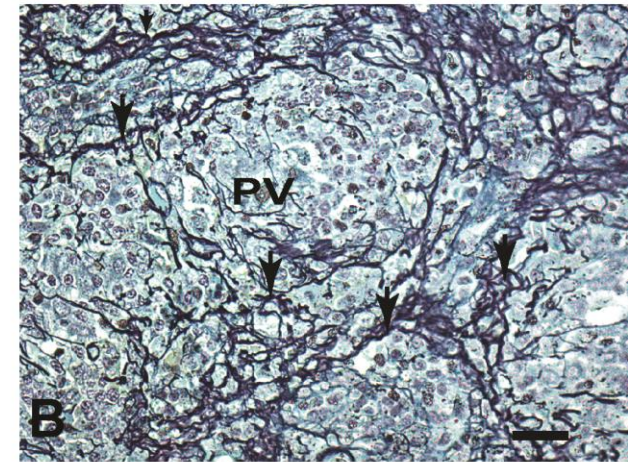
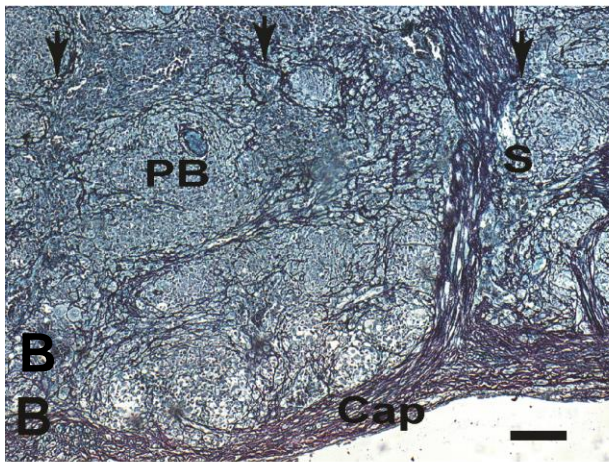
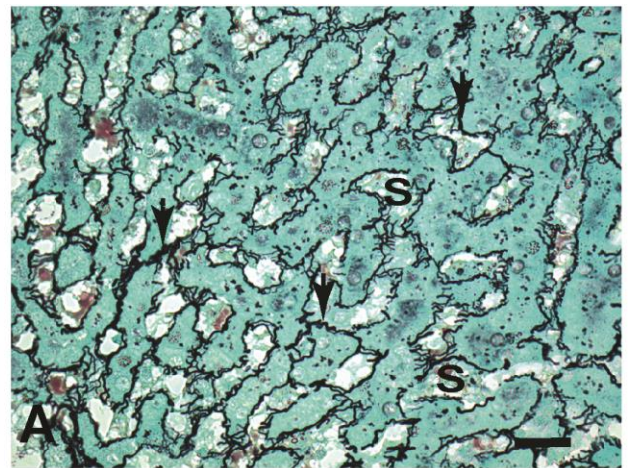
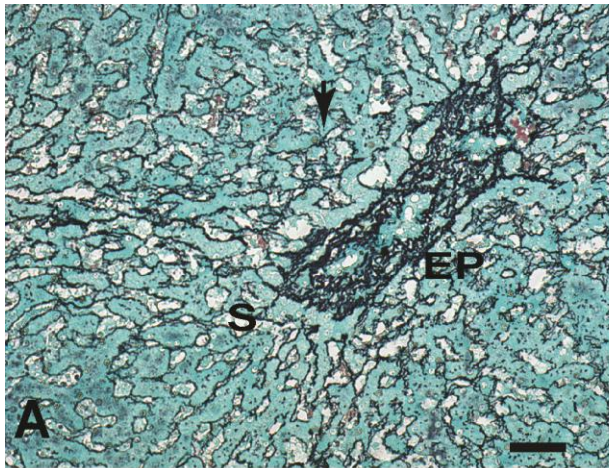


Figura 14: Imagens representativas da marcação das fibras reticulares pela prata Amoniaca de Gomori em cães infectados por *L. infantum*. **(A)** Fígado - observar fibras reticulares espessadas (setas pretas) distribuídas difusamente em várias direções, formando trama compacta que muitas vezes enclausura os hepatócitos. **(B)** Baço e **(C)** linfonodo cervical – também se observa um espessamento das fibras (setas) e a formação de trama mais compacta na polpa vermelha do baço e entorno dos cordões e seios medulares do linfonodo. **Barras (C) = 62 µm e (A, B) = 16 µm.**

4.8 Expressão e atividade da iNOS

A expressão da iNOS foi maior nos animais infectados comparados aos controles. De fato, a quantificação morfométrica da detecção de iNOS por imunohistoquímica no fígado detectou maior expressão nos grupos CS e CA ($P < 0,05$) ($P < 0,001$) comparados ao grupo C e menor expressão no grupo CS comparados ao grupo CA ($P < 0,01$) (Figura 15 A). No baço, encontrou-se o mesmo resultado entre os grupos CS e CA ($P < 0,001$) e para os grupos CS e CA quando comparados ao grupo C ($P < 0,01$ e $P < 0,001$) (Figura 15 B). Da mesma forma, no linfonodo cervical entre os grupos CS e CA ($P < 0,01$) e para os grupos CS e CA quando comparados aos C ($P < 0,01$ e $P < 0,001$), (Figura 15 C).

No fígado foi observada uma marcação imunohistoquímica homogênea de iNOS dentro dos hepatócitos e macrófagos (Figura 16 A, B). No baço, a expressão foi observada em macrófagos da polpa vermelha e ao redor da polpa branca (zona marginal) (Figura 16 C, D). Nos linfonodos a marcação foi observada nos macrófagos dos cordões medulares (figura 16 E, F).

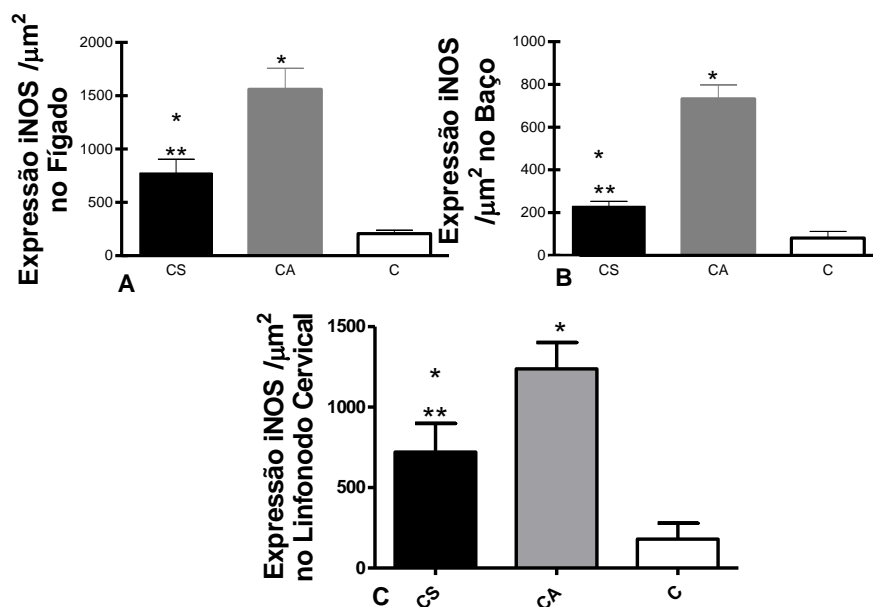


Figure 15 – Análise morfométrica da expressão da iNOS em tecidos de cães controles e infectados com *Leishmania infantum*. Fígado (A), Baço (B) e linfonodo cervical (C). Cães sintomáticos (CS), cães assintomáticos (CA) e controles (C). Diferença significativa ($P \leq 0,05$) em relação ao controle foi representada por * e em relação ao (CA) por **.

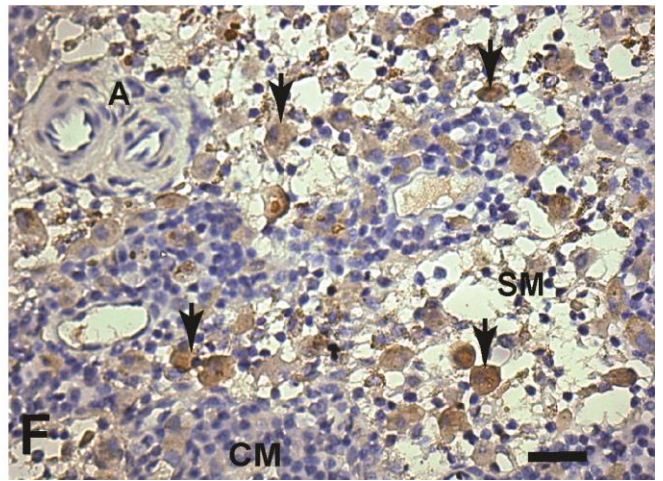
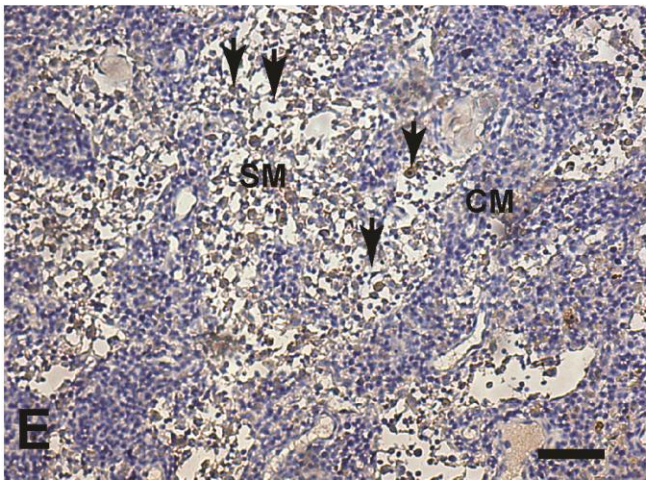
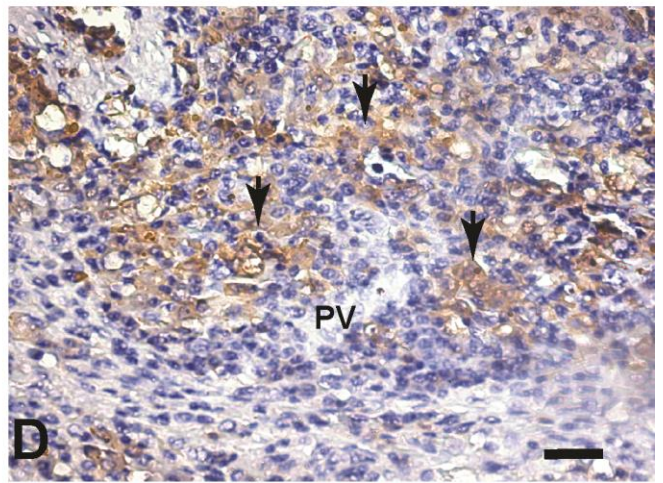
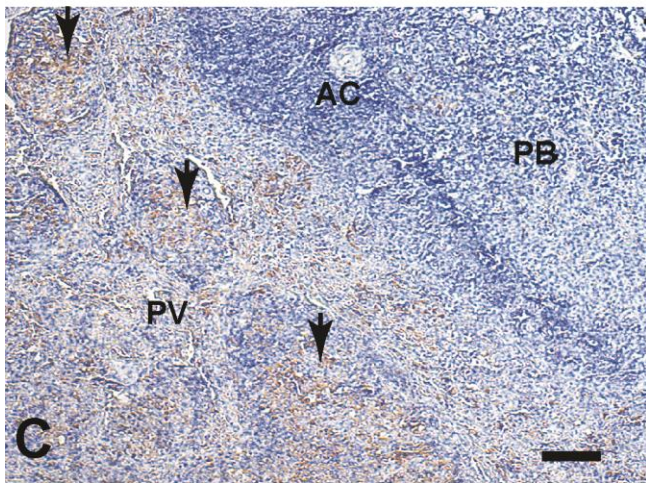
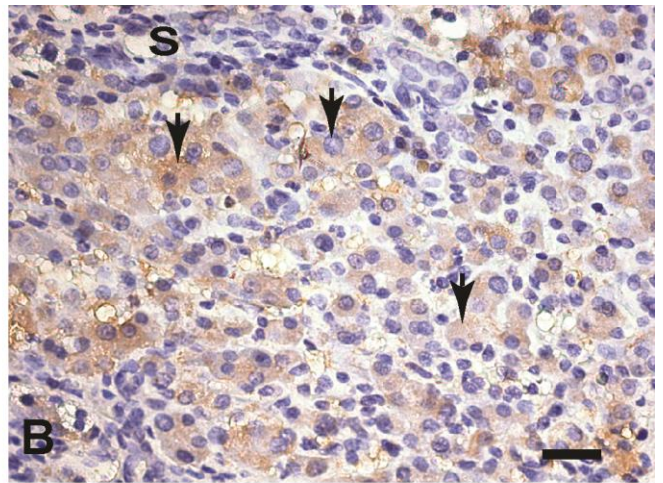
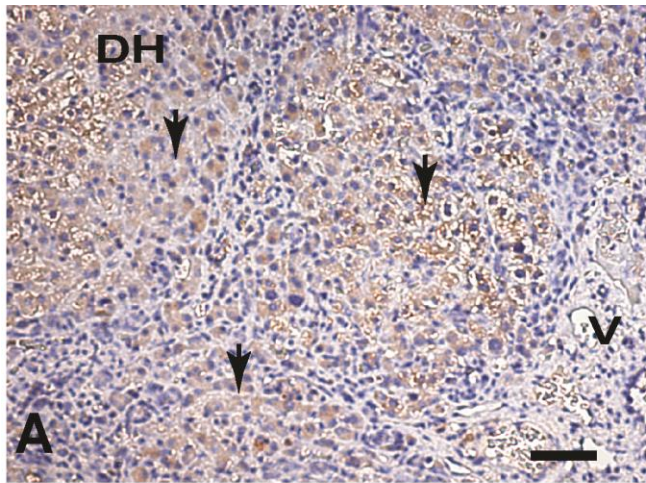


Figura 16 – Fragmentos parafinados de tecidos de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. Imagens representativas da expressão da enzima iNOS. **(A, B)** Fígado – Observar a marcação difusa nas células hepáticas e até mesmo em hepatócitos em degeneração. Em B detalhe da marcação difusa nas células (seta preta). **(C, D)** Baço - notar marcação na polpa vermelha, mas não na polpa branca. Em D detalhe das células marcadas na polpa vermelha com características de macrófagos. **(E, F)** Linfonodo cervical – observar a marcação por todo o órgão e maior (detalhe em F) nos macrófagos dos seios medulares (SM). **Barras (C) = 32 µm, (A, E) = 62 µm e (B, D, F) = 16 µm.**

A atividade da iNOS foi mensurada indiretamente através da dosagem de nitrito sérico. A quantificação foi elevada em ambos os grupos de animais infectados comparados aos C ($P < 0,001$ e $P < 0,001$). Além disso, foi mais elevada nos CA comparada aos CS ($P < 0,001$) (Figura 17).

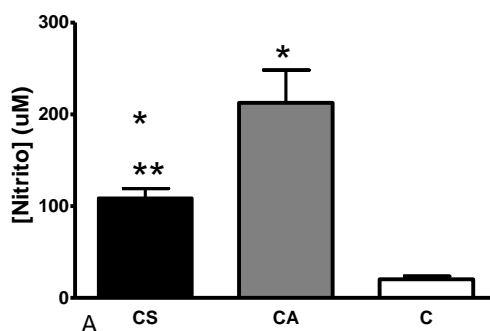


Figura 17 – Quantificação de Oxido Nítrico (NO) sérico em cães controles e infectados com *Leishmania infantum*. Cães sintomáticos (CS), cães assintomáticos (CA) e controles (C). Diferença significativa ($P \leq 0,05$) em relação ao controle foi representada por * e em relação ao (CA) por **.

Com o objetivo de avaliar a relação entre Fe e atividade da iNOS, além do dano tecidual induzido pelo Fe e pelo NO, tratamos culturas de macrófagos peritoneais de 2 cães não infectados sem estímulo (controle) ou com adição de Desferal (DF - 100µM); Ferro (Fe - 50 µM); e / ou estimulada com IFN/LPS - 1ng/ml /100ng/ml e aminoguanidina (AMG- 100mM) e avaliamos a produção de NO no sobrenadante das culturas e a LPO das células.

A adição apenas de Fe ou apenas de DF não afetou significativamente a atividade de iNOS, diferente do observado quando estimulamos as culturas com IFN/LPS, que provocou aumento significativo na produção de NO em ambos os tempos e em relação às outras condições ($P < 0,05$). A adição de quelante nas células previamente estimuladas com IFN/LPS provocou aumento na produção de NO, enquanto que a adição de Fe diminuiu esta produção aproximadamente 4x em relação aos dois estímulos anteriores ($p < 0,05$). Com a adição do inibidor de iNOS, nem o estímulo com IFN/LPS nem a adição de Fe ou DF alteraram a produção de NO (Figura 18 A).

Ao avaliarmos o possível dano (LPO) das células com os diferentes estímulos nos tempos de 48 e 72 h (Figura 18 B), observou-se que Fe adicionado

à cultura e o estímulo com IFN/LPS com e sem DF elevou a LPO de 2 a 4x ($P < 0,01$) em relação ao inibidor de iNOS, DF e controle.

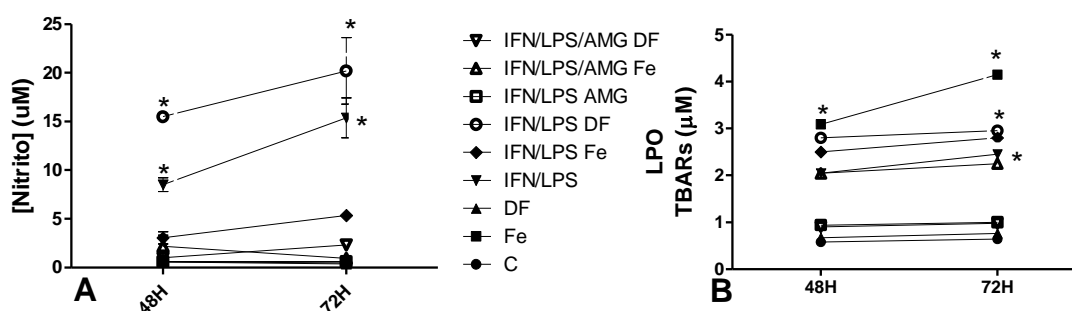


Figura 18 - Detecção de óxido nítrico (NO) e lipoperoxidação (LPO) em cultura de células (macrófagos de cães não infectados) sem estímulo (C); suplementada com Desferal (DF – 100 MicroM); Ferro (Fe - 50 uM); e / ou estimulada com IFN/LPS - 1ng/ml /100ng/ml e aminoguanidina (AMG- 100mM) . Dois experimentos em quintuplicata para cada condição. * diferença estatisticamente significativa entre tratamentos ($p < 0,05$).

Como indicado pela tabela 7, observamos nos tecidos correlação positiva entre prata, NO e iNOS. Entretanto, houve correlação negativa entre Fe, iNOS e NO. Estes resultados sugerem que o Fe pode estar relacionado com o dano tecidual e a atividade da iNOS. Interessante que a dosagem de NO não apresentou correlações com o Fe e com a prata.

Tabela 7 - Correlação entre NO e iNOS e a deposição de Fe e prata nos animais infectados com *Leishmania infantum chagasi*.

	Grupo	Fe X NO	iNOS X Fe	NO X prata	iNOS X prata
Fígado	CS	$r = -0,8150$	$r = -0,6642$	$r = 0,6452$	$r = 0,5544$
	CA		$r = -0,7213$		$r = 0,9337$
Baço	CS	$r = -0,5393$	$r = -0,5651$	$r = 0,5857$	$r = 0,4861$
	CA		$r = -0,6634$		$r = 0,8261$
Linfonodo	CS	$r = -0,639$	$r = -0,546$	$r = 0,649$	$r = 0,659$
	CA		$r = -0,764$		$r = 0,652$

A tabela representa apenas os valores significativos do coeficiente de correlação de Spearman ($P < 0,01$). Sem correlação significativa (-). Ferro (Fe); óxido nítrico (NO); Enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS).

4.9 Caracterização do infiltrado inflamatório através da expressão da Calprotectina

Observou-se maior expressão da calprotectina nos diversos órgãos estudados nos cães naturalmente infectados em relação ao grupo controle. No fígado houve uma tendência ao aumento da expressão desta proteína nos animais infectados quando comparados ao grupo C. Entretanto este aumento foi significativo apenas quando comparamos animais do grupo CS com os animais do grupo C ($P < 0,001$) e, por sua vez, grupo CS em relação ao grupo CA ($P < 0,01$) (Figura 19 A). Nesse órgão observamos marcação celular difusa em células do espaço porta e capilares sinusoides (Figura 20 A, B).

No baço, também foi observado aumento da expressão da calprotectina no grupo CS em comparação ao grupo C ($P < 0,001$) e em relação aos animais do grupo CA ($P < 0,01$) (Figura 19 B). O padrão de marcação celular foi difuso, com células na zona marginal e na polpa vermelha (Figura 20 C, D).

No linfonodo observou-se aumento da expressão da calprotectina nos grupos CS e CA em comparação ao grupo C ($P < 0,001$ e $P < 0,02$) (Figura 19 C). O padrão de marcação celular também foi difuso, com células por todo o órgão, mas especialmente nos seios medulares e raramente nos folículos linfoides.

As células imunomarcadas para calprotectina em sua maioria tinham característica de monócitos/macrófagos (Figura 20 E, F).

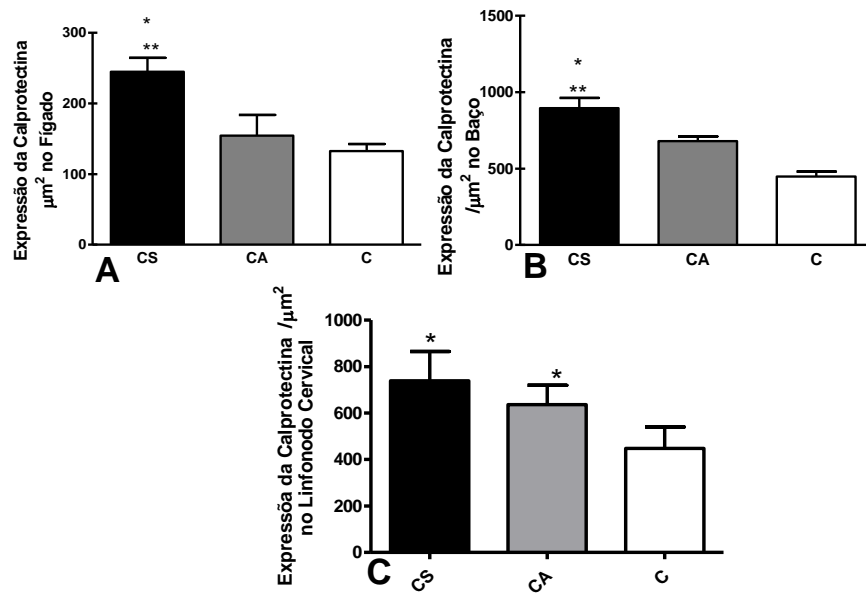


Figura 19 – Quantificação da calprotectina no fígado (A); baço (B) e linfonodo cervical (C) em cães infectados com *Leishmania infantum*. Cães sintomáticos (CS), cães assintomáticos (CA) e controle (C). Diferença significativa ($P \leq 0,05$) em relação ao controle foi representada por * em relação ao (CA) por **.

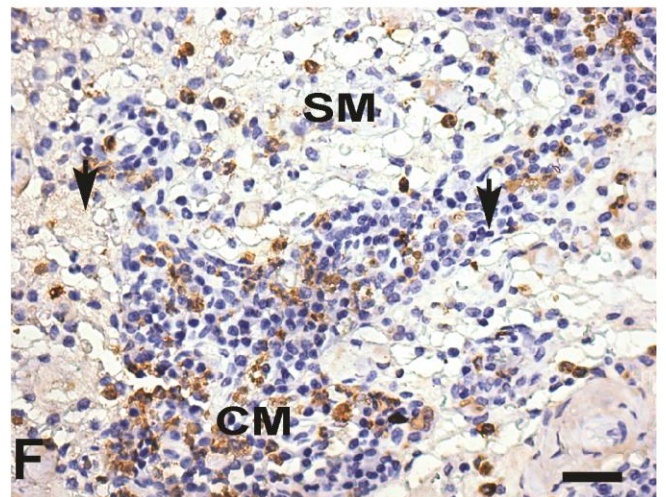
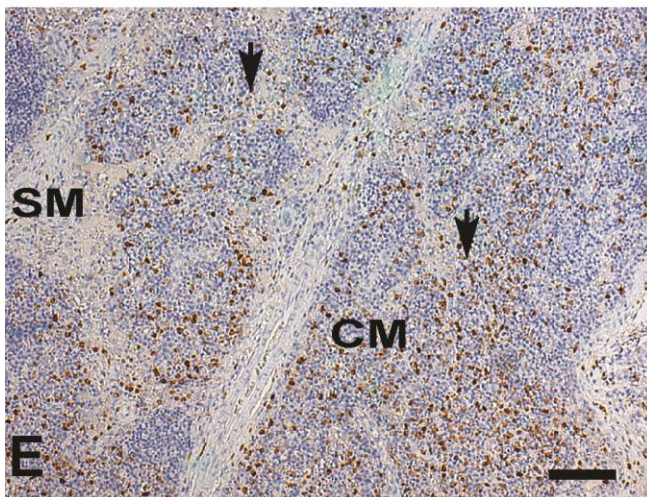
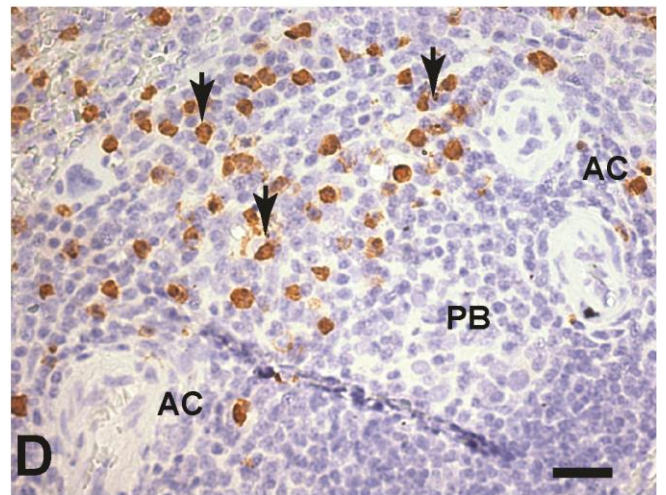
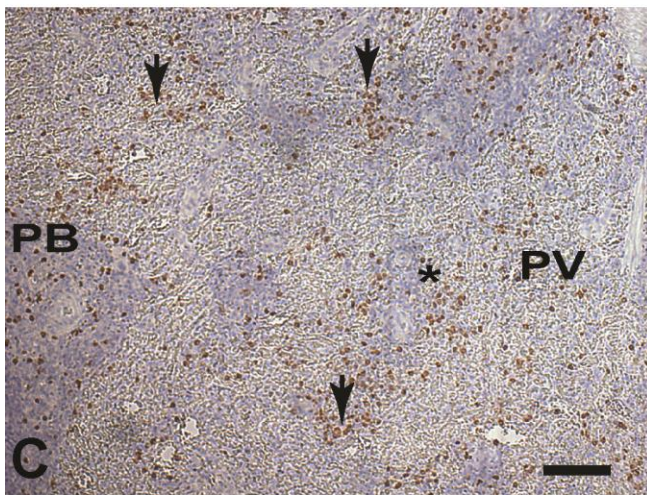
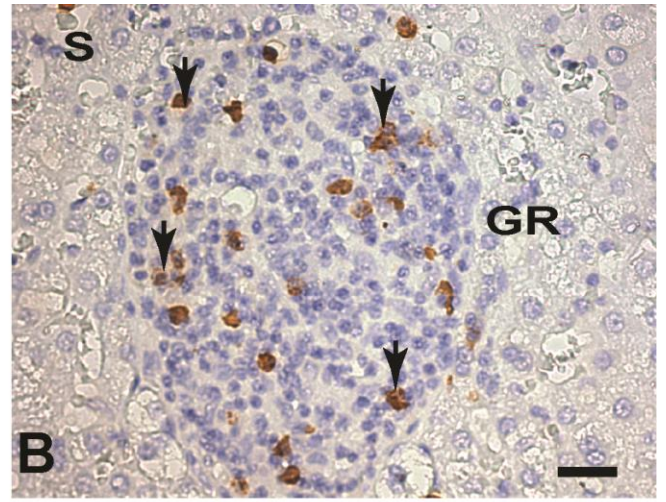
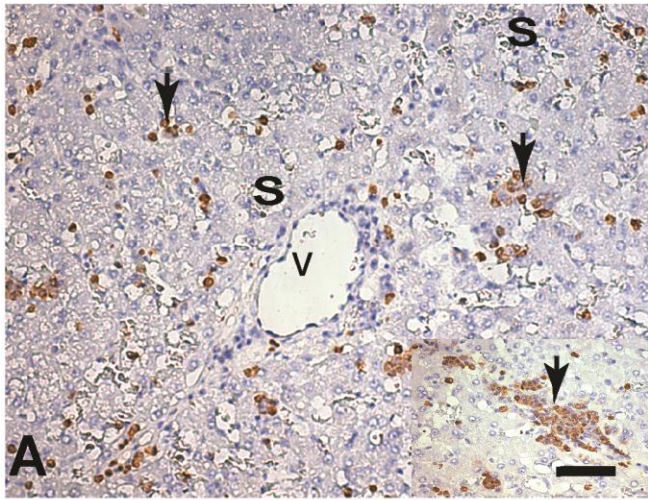


Figura 20 – Fragmentos parafinados de tecidos de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. Imagens representativas da imuno-histoquímica para calprotectina no fígado (**A, B**); baço (**C, D**) e linfonodo cervical (**E, F**) de cães naturalmente infectados. (**A, B**) observar células marcadas no interior dos sinusoides, dentro do granuloma hepático e em regiões de inflamação no parênquima (inserto em **B**). (**C-F**) a marcação celular se apresenta por todas as áreas do órgão principalmente em torno da polpa branca e dentro dela. Detalhe de células marcadas na polpa branca. (**E, F**) a marcação celular se deu principalmente em torno ou em células dos cordões medulares. (**F**) Detalhe das células marcadas e inserto mostrando que não há marcação nos folículos linfoides. As células marcadas em sua maioria apresentam característica de monócito/macrófagos. **Estreptoavidina-peroxidase. Barras = (C, E) = 62 µm, (A) 32 µm, (B, D, F) = 16 µm.**

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que cães naturalmente infectados com *L. infantum chagasi* principalmente os sintomáticos, apresentam diminuição da atividade das enzimas antioxidantes no sangue e em órgãos como fígado, baço e linfonodo cervical. Associada a essa diminuição observa-se outras alterações como a desregulação dos elementos traço séricos, elevada peroxidação lipídica e lesões mais intensas nesses órgãos. Todos esses danos foram ainda potencializados por vários fatores como: (1) produção de NO via aumento da atividade da iNOS, (2) carga parasitária tecidual; (3) deposição de íons ferro nos tecidos. Cada um desses fatores faz parte dos resultados encontrados nesse trabalho. Todos merecem discussão, o que será feito a seguir:

Parte 1 - Existe relação entre os níveis séricos de elementos traço e o estresse oxidativo associada às diferentes formas clínicas da LVC?

ERMOS são capazes de iniciar e promover a LPO como resultado do dano oxidativo (Erickson et al. 2000; Field et al. 2002) sendo um mecanismo bem estabelecido da injúria celular. São indicadores do estresse oxidativo em várias doenças assim como no dano eritrocítico na LVC (Biswas et al. 1997; Serarslan et al. 2005; Britti et al. 2008). O dano resultante dos ERMOS afeta todas as biomoléculas e pode resultar na desnaturação, perda de função, ligação cruzada, agregação e fragmentação das mesmas. Entretanto, o dano primordial é a LPO dos lipídeos ácidos poliinsaturados das membranas biológicas que não só resulta na diminuição da função de barreira como da fluidez (Arthur 1996; Alexander et al. 2007). A LPO é uma reação em cadeia composta pela iniciação, propagação e término e os seus vários produtos como hidroperóxidos e os aldeídos, podem inibir a síntese proteica, bloquear a ação dos macrófagos, enzimas e a quimiotaxia de leucócitos (Fridovich & Porter 1981).

Nesse trabalho demonstramos elevados níveis de LPO plasmático nos animais infectados, especialmente nos sintomáticos, associados a uma desregulação do sistema antioxidante enzimático exemplificado pelo aumento da SOD e diminuição da atividade da GSH-Px e CAT. Esses resultados estão de acordo com Britti et al. (2008) na leishmaniose visceral canina, mas também em outras doenças no cão como na infecção por *Dirofilaria immitis* (Dimri 2012) ou em humanos, na leishmaniose tegumentar (Kocyigit et al. 1998a, b) e no vitiligo (Hazneci et al. 2005).

A elevada atividade da SOD sanguínea pode ser atribuída ao aumento da regulação em sua síntese para contrabalancear a elevação na produção de ERMOS. Por outro lado, este aumento resultaria em elevada conversão de H_2O_2 e diminuição da atividade da GSH-Px e CAT em converter H_2O_2 em H_2O . É sabido que embora o H_2O_2 não seja um radical, ele é reativo e rapidamente convertido em $\cdot OH$ na presença de Fe^{2+} pela reação de Fenton a menos que seja removido (Mates, 2000). Como resultado haveria o aumento de ERMOS e predisposição das células ao estresse oxidativo, o que se soma ao resultado da elevada LPO encontrada no plasma dos animais infectados.

O aumento da SOD observado, também esta em acordo com resultados encontrados em pacientes com leishmaniose tegumentar (Erel et al. 1999; Kocyigit et al. 2003), mas difere da observação de outros autores também na leishmaniose tegumentar (Serarslan & Atik 2005) ou mesmo na visceral canina (Biswas et al. 1997). Esses resultados contraditórios podem estar relacionados com a metodologia de detecção dos antioxidantes ou mesmo pelas amostras obtidas de pacientes (homem e cão) com tempos de infecção distintos e às vezes indeterminado.

Associada à desregulação da atividade das enzimas antioxidantes, encontramos baixos níveis de Zn, Fe, Se, e aumento de Cu nos soros dos animais infectados, de forma mais intensa nos sintomáticos. Esses resultados sugerem uma elevada utilização dos elementos (Kocyigit et al. 1998a, b; Erickson et al. 2000; Field et al. 2002; Britti et al. 2008) e estão de acordo com resultados encontrados para elementos traço na LVC (Adamama-Moraitou et al 2005; Pasad

et al 2003; Nieto et al. 2003). Entretanto, sabe-se que a redistribuição dos elementos do soro para os tecidos ou vice-versa pode ser secundária às diversas doenças (Mastousek et al. 1993). Essa redistribuição pode ser entendida como parte do sistema de defesa de nosso organismo para modular a infecção (Faryadi & Moheballi 2003), mas também pode estar ligada à dieta. Porém, os animais do presente estudo foram tratados durante todo o experimento com ração canina comercial balanceada de boa qualidade. Assim, o desbalanço sérico dos elementos encontrado poderia estar mais relacionado com a suscetibilidade do hospedeiro vertebrado ao patógeno (Pasad et al 2003; Nieto et al 2003; Weyenbergh et al. 2004; Adamama-Moraitou et al 2005). De fato, de acordo com a literatura, esses elementos participam da resposta imune através do estímulo da maturação, diferenciação e atividade dos leucócitos como linfócitos, macrófagos e neutrófilos (Erickson et al. 2000; Field et al. 2002; Faryad & Moheballi 2003; Weyenbergh et al. 2004).

Em conjunto, os resultados da LPO; enzimas antioxidantes e elementos traço séricos, são indicativos de estresse oxidativo que concorrem para o dano celular e tecidual de caráter reversível ou não. Assim, as alterações histológicas encontradas no fígado, baço e linfonodos cervicais nos animais infectados, preferencialmente nos sintomáticos, podem estar associadas com esse estresse oxidativo. De acordo com a literatura, o dano oxidativo afeta as células pela indução das degenerações, necrose, inflamação e fibrose. Na LVC, as lesões histológicas clássicas são descritas em órgãos ricos em células do sistema monocítico mononuclear (SMM) como o fígado, baço, linfonodo, medula, trato gastrointestinal e pele. Em geral observa-se uma reação inflamatória crônica e intensa consistindo de um infiltrado de plasmócitos, macrófagos e linfócitos (plasmolinfoliocitário) em todos esses órgãos (Alvar et al. 2004).

No fígado, as alterações mais importantes relacionadas ao estresse são as degenerações hidrópica e gordurosa (esteatose). Essas alterações foram encontradas de forma intensa e frequente nos animais infectados em relação ao grupo controle, embora não existindo diferenças entre os dois grupos de infectados. Entretanto, o estudo histológico dos fragmentos dos fígados dos animais infectados revelou maior frequência de lesões nos animais sintomáticos

em relação aos assintomáticos. Estas lesões foram: inflamação da cápsula com espessamento da mesma (fibrose) e congestão sinusoidal com deposição de pigmentos de hemossiderina revelados pela técnica histoquímica do Azul da Prússia. Outro achado frequente foi a formação dos granulomas intralobulares hepáticos caracterizando a hepatite crônica granulomatosa presente na maioria dos animais infectados. Porém, a formação desses granulomas teve uma maior frequência nos assintomáticos. Todos esses achados estão em concordância com a literatura (Tryphonas et al. 1977; Anosa & Idowu 1983; Tafuri et al. 1996, 2001; Alvar et al. 2004; Rallis et al. 2005; Giunchetti et al. 2008; Solano-Gallego et al. 2009).

No baço, como no fígado, chamou atenção a inflamação crônica da cápsula, que também se apresentava espessada. Outros achados foram: exuberância do sistema trabecular, depleção das áreas T dependentes, formação dos granulomas de Virchow na polpa vermelha, congestão sinusoidal e depósitos de hemossiderina. Todas essas lesões apresentaram maior frequência nos animais infectados sintomáticos, o que estaria de acordo com a literatura. (Alvar et al. 2004; Santana et al. 2008; Baneth et al. 2008; Melo et al. 2009).

A análise histológica dos fragmentos dos linfonodos cervicais revelou intensa e frequente inflamação crônica com espessamento capsular (linfadenite capsular), espessamento dos seios capsulares, reatividade da camada cortical com formação de folículos linfóides e principalmente a hipertrofia e hiperplasia dos macrófagos dos seios e cordões medulares, congestão dos vasos e depósito de hemossiderina. Todos esses achados estão em concordância com Ciaramella (1997); Lima et al. (2004) e Costa et al. (2008).

Uma notável fibrilopoiese foi observada nos três órgãos estudados e principalmente nos animais infectados sintomáticos comparados aos assintomáticos e controle como caracterizado por Rallis et al. (2005) e Melo et al. (2009) para o fígado, por Alexandre-Pires et al. (2006) no baço e por Lima et al. (2004) nos linfonodos. De acordo com Silva et al. (2013 – artigo *in press*) o cão com leishmaniose visceral é importante modelo de doença fibrosante por

apresentar uma fibrilopiose intensa e sistêmica provavelmente secundária à inflamação crônica encontrada nos diversos órgãos nesse hospedeiro vertebrado.

Apesar das alterações acima serem bem caracterizadas na LVC estas não foram correlacionadas às enzimas antioxidantes do fígado, baço e linfonodo cervical e em conjunto com a LPO e elementos traço. Diferente do sangue e dos tecidos (fígado, baço e linfonodos cervicais) houve uma diminuição da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px. Essa diminuição não se correlacionou aos elementos traço séricos, mas correlacionou-se negativamente com a LPO, sugerindo que o dano na CVL pode também estar relacionado a diminuição da capacidade antioxidante. Oliveira e Cechini (2002) na LV experimental e Bildik et al. (2004) analisando os eritrócitos na LVC sugerem que as enzimas são “consumidas” durante o processo oxidativo exacerbado na leishmaniose resultando na diminuída atividade dessas enzimas.

A diminuição da atividade das enzimas também se correlacionou negativamente com a fibrilopiose observada nos três órgãos, bem como com a inflamação. No baço a fibrilopiose correlacionou-se também com a congestão e deposição de hemossiderina. No linfonodo só houve correlação entre a CAT e a inflamação.

Alexandre-Pires et al. (2006) e Melo et al. (2009) relataram anormalidades no sistema microvascular do baço e na arquitetura do fígado resultando em mudanças da dinâmica circulatória, com redução da circulação relacionada com a congestão e hemossiderose. Santana et al. (2008) também relataram alterações na estrutura da microvasculatura do baço e o aumento do número das fibras reticulares. Baneth et al. (2008) relatam que esta alteração estaria presente em cerca de 10-53% dos casos de LVC.

Na tentativa de avaliar um possível causador do dano tecidual, mensuramos a produção de NO sérica uma vez que este é produzido frente a infecções contra patógenos, e em conjunto com a produção de radicais livres de oxigênio pode conduzir a exaustão do sistema antioxidante do hospedeiro potencializando lesões. (Kocyigit et al. 2005). Como descrito por Alvar et al. (2004); Reis et al. (2006 a,b) e Zafra et al. (2008) e descrito nesse trabalho, animais sintomáticos

apresentam elevada carga parasitária e baixos níveis de NO comparados aos assintomáticos. O NO é um mediador citotóxico e citostático contra a *Leishmania* e a resistência esta relacionada ao aumento da produção desse elemento (Mauel et al. 1991; Assrue et al. 1994; Murray & Nathan 1999; Sisto et al. 2001). Macrófagos estimulados sintetizam NO e superóxidos que podem gerar peróxido nítrico (ONOO⁻), e dependendo da quantidade e duração, teriam ação microbicida ou citotóxica (Assrue et al. 1994;). O fato dos animais nesse trabalho apresentarem elevado NO em relação aos animais do grupo controle, não parece ser suficiente para atuação microbicida como sugerido por Panaro et al. (1998).

O papel de injúria tecidual via NO vem sendo discutido e uma nova função dentre as várias e complexas funções vem ganhando força: a de seu papel protetor e anti-apoptótico (Kanner et al. 1991; Wink et al. 1993; Muriel 1998; Mojena et al. 2001; Abe et al. 2008). Nesse contexto, a menor produção de NO, associada à elevada LPO suportada pela desregulação das enzimas antioxidantes, encontrada nos animais sintomáticos, resultaria em maior quantidade de ROS e injúria. Por outro lado, a maior produção de NO nos animais assintomáticos explicaria as alterações mais discretas, talvez mediadas pelo seu papel protetor e não como microbicida e agente de injúria. Além disso, o NO pode interferir na reação de Fenton e diminuir a produção de OH[·], (Kanner et al. 1991; Wink et al. 1993). Entretanto, o papel exato do NO ainda é discutido (Wink et al. 1993 Mojena et al. 2001; Abe et al. 2008).

O parasito do gênero *Leishmania* também pode se proteger contra o estresse oxidativo adotando vários mecanismos de escape, como por exemplo o lipofosfoliglicano (LPG) de membrana e o receptor 3 do complemento (CR3) que inibem a atividade da NADPH oxidase durante a fagocitose com consequente produção de superóxidos ou pela expressão de enzimas antioxidantes como a Fe-SOD etc (Cunningham 2002). Isso explicaria em parte a presença de parasitos apesar do estresse e do NO nos animais infectados.

Um aumento nos níveis oxidativos e da LPO foi bem descrito nos eritrócitos na leishmaniose com aumento da eritrocaterese e diminuição da vida dessas células na LVC somada a um quadro de anemia hemolítica (Biswas et al. 1997;

De Luna et al. 2000; Bildik et al. 2004; Britti et al. 2008; Samanta et al. 2012.); na leishmaniose visceral experimental (Sen et al. 2001); na leishmaniose cutânea (Vural et al. 2004; Ozbilge et al. 2005; Serarslan et al. 2005; Kocyigit et al. 2003, 2005). De fato, os eritrócitos são altamente suscetíveis aos ERMOS e participam do seu “scavenging” no plasma. Por serem diretamente expostos aos ERMOS são mais suscetíveis ao estresse do que qualquer outra célula do corpo o que resulta na hemólise e eritrocaterese (De Luna et al. 2000; Britti et al. 2008; Samanta et al. 2012). No presente estudo não determinamos a anemia hemolítica nos animais como caracterizada em outros trabalhos (De Luna et al. 2000; Samanta et al. 2012), mas visualizamos prováveis causas e consequências da mesma, como: desbalanço do sistema oxidativo/antioxidante, o aumento de Cu sérico e o acúmulo de Fe tecidual em diferentes órgãos. A anemia, frequente na doença canina, é reportada em cerca de 50 a 70% dos doentes e tem como características marcantes a normocitose, normocromia e arregeneração (Da Costa-Val et al. 2007; De Amorim et al. 2011). As principais causas desta alteração no hemograma seriam: perda sanguínea pela epistaxe e ulcerações da pele, eritrólise, inflamação generalizada e insuficiência renal crônica, além de hipoplasia ou aplasia medulares (Baneth et al. 2008; De Luna et al. 2000; Koutinas et al. 1999). Por outro lado, há autores que consideram a anemia como um achado pouco freqüente na LVC (Alvar et al. 2004; Amusategui et al. 2003).

De acordo com a literatura sabe-se que a exposição das células ao aumento de Fe e Cu livres em experimentos com animais ou em doenças crônicas eleva a injúria tecidual (Jain et al. 1978; Morris et al. 1995; Arthur 1996; Huang et al. 2001; Fuentealba & Aburto 2003; Alexander et al. 2007). Proteínas séricas que tem em sua constituição Zn (Metalotioneína e ceruloplasmina) ou selênio (níveis séricos diminuídos nos animais infectados) funcionam como antioxidantes através da oxidação e sequestro do Cu e Fe, limitando assim a produção de radicais e o dano celular (Bettger & O'dell. 1993; Field et al. 2002). Um dos mecanismos pelo qual o Fe e o Cu promovem o dano celular é por meio da formação de OH^\cdot ; um dos mais potentes radicais livres produzidos pela reação de Fenton e de Haber-Weiss (Arthur 1996; Weiss et al. 1999; Soubasis et al. 2006; Alexander et al. 2007). Além disso, o Cu pode interagir ainda com o H_2O_2 gerando mais OH^\cdot

(Weiss et al. 1999; Huang et al. 2001) o que pode ser implicado também na elevada LPO encontrada nos animais infectados, especialmente sintomáticos. De acordo com Weiss et al. (1999); Weiss (2002 e 2005); Huynh & Andrews (2008), íons Fe^{2+} e Fe^{3+} são capazes de iniciar a LPO nas células. Todavia, as evidências nesse trabalho de que o aumento de Fe tecidual resulte no dano hepático, esplênico ou do linfonodo, não foi ainda relatado na LVC.

Para avaliar a deposição de Fe tecidual utilizamos o Azul da Prússia que cora ambos os íons Fe^{2+} e o Fe^{3+} . Os íons ferro marcados foram visualizados em todos os órgãos estudados de todos os animais, controles e infectados, mas sempre com maior intensidade nos últimos, e em especial, nos sintomáticos. No fígado eram localizados preferencialmente nas células de Kupffer nos sinusoides, macrófagos constituintes dos granulomas intralobulares hepáticos e/ou macrófagos inflamatórios nos espaço-porta. No baço, os íons ferro foram detectados nos macrófagos da polpa vermelha, muitas vezes formando nódulos (granuloma de *Virchow*). Já nos linfonodos foram principalmente visualizados nos macrófagos dos seios e cordões medulares. Houve uma correlação positiva entre a deposição de ferro com a LPO e com a intensidade das alterações histológicas principalmente com a inflamação.

A quantidade de Fe nos diferentes compartimentos do corpo é bem regulada para evitar a toxicidade e controlar respostas contra patógenos. O Fe está presente no corpo na forma Fe^{2+} , solúvel e muito tóxica e na forma Fe^{3+} , quelada à ferritina no citosol de células de todo o corpo, em especial nos órgãos que realizam eritrocaterese (Huynh & Andrews 2008). No processo inflamatório, citocinas proinflamatórias como IFN e IL-1 e IL-6, tem função reguladora com sequestro do ferro tecidual, principalmente através da atividade do NO (Weiss et al. 1999; Weiss 2002, 2005; Huynh & Andrews 2008) para não utilização do mesmo pelos patógenos (Ganz 2009). Essa regulação é descrita como “faca de dois gumes” (Weiss 2002), pois o excesso de Fe livre no tecido pode ser tóxico.

No presente trabalho, observamos uma correlação positiva entre LPO elevada e a elevada fibrilopoiese nos animais infectados em destaque os sintomáticos, o que está de acordo com a literatura (Gardi et al. 2002). Além disso, em um ensaio

in vitro com macrófagos caninos obtidos de animais não infectados com *Leishmania*, observamos que macrófagos peritoneais suplementados com Fe mantidos em cultura 48 e 72 h, mostraram forte aumento de LPO, suportando nossos dados.

Nesse momento, surgem perguntas importantes inerentes à patogênese da LVC e o Fe: o acúmulo progressivo de Fe nos tecidos estaria implicado na progressão da LVC? Como se daria esse acúmulo?

Apesar da complexidade desses prováveis mecanismos, e considerando as limitações desse trabalho alguns resultados relacionados merecem discussão. Por exemplo, a capacidade total de ligação do ferro, transferrina e índice de saturação da transferrina foram diminuídas nos animais infectados (mas sem diferenças entre os assintomáticos e sintomáticos) em relação aos controles. Então, esses resultados somados aos menores níveis de ferro sérico e a progressiva deposição de Fe nos tecidos encontradas em todos os animais infectados parecem ser consequência da inflamação crônica e sistêmica que caracteriza a leishmaniose visceral (Warner e Harrus, 2000; Cansado e *Chiatton*, 2002). Estudos em diferentes tipos de infecções sugerem que há um aumento dos níveis de ferritina e diminuição da transferrina, o que resultaria no sequestro citoplasmático do Fe e diminuição de sua liberação (Konijn e Hershko, 1977). Entretanto, segundo Alvarez-Hernandez *et al.*, (1986) a deposição seria na forma mais inerte do Fe, como a hemossiderina, pigmento visualizado nas inflamações crônicas. Nemei *et al.* (2004) mostrou na inflamação, que a IL-6 medeia a hipoferrinemia através da indução da hepcidina (hormônio regulador do Fe e que controla a transcrição da Ferritina e transferrina), sendo a chave para explicar o desbalanço do ferro sérico e tecidual na anemia de doenças crônicas (ADC) ou da inflamação. Paciente com ADC tem baixo Fe sérico e reduzida eritropoietina, enquanto a inflamação perpetua a retenção de Fe nos macrófagos (Lee, 1983, Means, 2000). El Hag *et al.* (1994) observaram um aumento de Fe em macrófagos com evidências ocasionais de eritrofagocitose em 18 biopsias de fígado humano com LV. Por outro lado, Soubasis *et al.* (2006), em um estudo experimental de indução de hepatite crônica em cães com CCL₄, observaram

acúmulo de hemossiderina no interior de células de Kupffer e hepatócitos. Esses dois achados implicam em uma natureza não específica deste sequestro de Fe.

No presente trabalho, consideramos que o aumento da deposição de Fe tecidual observado é resultado de condições distintas, mas que se sobrepõem: (1) um estresse oxidativo que resulta na diminuição da vida dos eritrócitos (eritrócitos senescentes) com elevada LPO nos animais infectados e também em cultura suplementadas com Fe livre. Eritrócitos senescentes são fagocitados por macrófagos pelo processo de eritrocaterese, sendo que o Fe é reutilizado através do transporte ou estoque nos tecidos (Weiss et al. 1999). (2) LVC é uma infecção crônica caracterizada por uma reação inflamatória sistêmica em órgãos ricos em células do sistema monocítico mononuclear (SMM) (Alvar et al. 2004). Os danos teciduais ou inflamação nos órgãos estudados apresentaram correlação positiva com a LPO, NO e Fe tecidual. (3) Na LVC as anormalidades no sistema microvascular do baço e na arquitetura do fígado resultam em mudanças da dinâmica circulatória, com redução da circulação relacionada com a congestão e hemossiderose (Rallis et al. 2005; Alexandre-Pires et al. 2006; Santana et al. 2008; Baneth et al. 2008; Melo et al. 2009).

A combinação das três condições explicaria os depósitos de Fe tecidual como resultado da oxidação da hemoglobina frequentemente observado no fígado (Melo et al. 2009), baço (Alexandre-Pires et al. 2006; Santana et al. 2008; Baneth et al. 2008), e linfonodo (Lima et al. 2004) na LVC.

Parte 2 - Os elementos traço estariam relacionados na resistência e suscetibilidade e histopatológico mais intenso na LVC?

Como descrito os elementos traço estão associados a várias funções do organismo como na participação da estrutura e atividade de metaloenzimas e enzimas antioxidantes (Miller 1985; Chandra 1997; Scrimshaw & SanGiovanni 1997; Erickson et al. 2000; Field et al. 2002), bem como no desenvolvimento da imunidade inata e adaptativa do hospedeiro. De fato, atuam na produção,

maturação e função de células como macrófagos, células NK, neutrófilos, células B e T. (Erickson et al. 2000; Ibs & Rink 2003). Essas células requerem uma suplementação adequada de alguns elementos traço para expressão, preservação da estrutura, função de metaloproteínas e produção de energia, como por exemplo, o ferro nos citocromos a, b e c, NADH e succinato desidrogenase. (Erickson et al. 2000; Linder 2001; Rink & Haase 2007).

Detectamos um aumento significativo de Cu, diminuição do Zn, Fe e Se séricos nos animais infectados em especial nos sintomáticos. Weyenbergh et al. (2004) na LV experimental e humana e Amini et al. (2009) na LC experimental, demonstraram que esta relação inversa Cu/Zn promove uma diminuição da secreção de IFN- γ e está associada a uma baixa atividade celular e elevada resposta humoral. Por outro lado Huang et al. (2001), em cultura celular, demonstraram que o Cu é essencial no processo de diferenciação de monócitos, contribuindo para a competência do sistema de defesa do hospedeiro e está relacionado à expressão de marcadores de maturação como Mac-1 (CD11b), ICAM (CD54) e LPS-R (CD14). Nesse contexto de maturação e quimiotaxia de células inflamatórias é sabido que as alterações histopatológicas observadas nos órgãos na LVC (Genaro 1993; Alvar et al. 2004) têm os macrófagos como principais células hospedeiras. De acordo com Russel & Talamas-Rohana (1989) a internalização das formas amastigotas de *Leishmania* pelas células do sistema mononuclear fagocitário seria etapa fundamental para o estabelecimento da infecção.

Para a identificação dos macrófagos teciduais caninos são utilizados vários marcadores de superfície e ativação como o CD68, lisozima, antígeno L1 (calprotectina) dentre outros. A Calprotectina é uma proteína de ligação ao cálcio e Zn pertencente à família S100 (Odink et al. 1987; Schafer & Heizmann 1996). Sua expressão é detectada em neutrófilos e em monócitos imaturos (Goto et al. 2008; Stríz & Trebichavský 2004), mas não se expressa em macrófagos residentes (Edgeworth et al. 1991). Pode também ser secretada por monócitos ativos em resposta a estímulos tendo atividade quimiotática para macrófagos, monócitos e neutrófilos, participando da resposta inflamatória ao induzir a expressão do CD11b em monócitos humanos (Devery et al. 1994; Rammes et al.

1997; Harrison et al. 1999; Lackmann et al. 1993; Lau et al. 1995; Ryckman et al. 2003). Apresenta vários sinônimos, tais como: “Myeloide-related protein” - MRP8/14, antígeno L1, calgranulina, complexo S100A8 e complexo S100A9.

Sohnle et al. (1996, 2000) e Kehl-Fie & Skaar (2010) mostraram que a calprotectina apresenta atividade microbicida ao sequestrar Zn e Mg durante o processo de infecção. Sampson et al. (1997, 2002) demonstraram que uma hipercalproteinemia resulta na deficiência do Zn e inflamação generalizada. Esses dados estão de acordo com nossos resultados, pois uma diminuição de Zn sérica e uma elevada expressão de calprotectina nos animais infectados, em especial nos sintomáticos, foram observadas. Isso sugere uma possível relação desses fatores na resposta imune de animais sintomáticos durante a infecção por *Leishmania*.

A expressão da calprotectina regula o acúmulo de células supressoras mielóides que expandem durante a inflamação e em neoplasias, agindo como células supressoras da resposta imune mediada por células T (Cheng et al. 2008; Sinha et al. 2008; Gabrilovich & Nagaraj 2009; Ichikawa et al. 2011). Em modelo murino a calprotectina foi relacionada à suscetibilidade na infecção por *L. major* (Sunderkotter et al. 1999; Steinbrink et al. 2000; Goto et al. 2008) e indução de células mielóides no evento de formação do granuloma (Yang et al. 1997). Goto et al. (2007) demonstraram acúmulo de macrófagos expressando essa proteína em lesões de pele de animais BALB/c deficientes em linfócitos T e B e experimentalmente infectados por *L. major*. Por outro lado, Goto et al. (2008) demonstraram aderência da calprotectina nas formas amastigotas e promastigotas sugerindo tal achado como um fator quimiotático para macrófagos, monócitos e neutrófilos, sendo mais uma vez implicada na inflamação por *L. major* (Lau et al. 1995; Ryckman et al. 2003). Em pacientes, o aumento da expressão da calprotectina foi implicada na amplificação e persistência da inflamação no lúpus eritematoso sistêmico (Lood et al. 2011) e também na fibrose pulmonar (Bargagli et al. 2011) e cicatrização (Thorey et al. 2001).

Outro elemento importante investigado por nós foi o Fe tecidual, bem caracterizado na literatura como sendo extremamente regulado nos diferentes

compartimentos do corpo evitando toxicidade (Grotto 2008, 2010) e controlando a resposta contra patógenos (Weiss 2002; Crichton et al. 2002), pois grande parte desses utiliza o Fe do hospedeiro para proliferar, como é o caso da *Leishmania* (Marcs 2007; Huynh & Andrews 2008; Ganz 2009). Múltiplas funções efetoras do sistema imune, principalmente as dos macrófagos, estão reguladas pelos níveis de Fe celular e vice versa, na chamada “faca-de-dois gumes” (Weiss et al. 1994, 1999; Weiss 2002). Em processos inflamatórios agudos, crônicos ou neoplásicos é observada captação do ferro sérico para os tecidos, em especial para o fígado (Bricks 1994; Weiss et al. 1999; Soubasis et al. 2006, Grotto 2008). Essa condição é mediada por citocinas Th1 e Th2 que mantem a homeostase do Fe através da regulação do complexo IRP/IRE (Weiss et al. 1994, 1999, 2004; Weiss 2002, 2005; Crichton et al. 2002). A ativação dos macrófagos pelo IFN- γ aumenta a deposição do Fe na ferritina, através do aumento da produção de NO pela iNOS. Por outro lado, o aumento excessivo de Fe livre inibe a produção de NO, diminui a ativação dos monócitos mediada pelo IFN- γ e da expressão de MHC-II, formação de neopterin, TNF e a transcrição da iNOS, e por consequência a citotoxicidade contra microorganismos (Weiss et al. 1994, 1999;). Por sua vez, os quelantes de Fe aumentam a ativação medida por IFN- γ (Weiss et al. 1994).

Nossos resultados indicaram, em um primeiro momento, diminuição do Fe sérico e aumento do Fe tecidual nos animais infectados, sempre de maneira mais expressiva nos cães sintomáticos. Esse aumento, como já discutido, parece estar relacionado ao dano tecidual promovido pela elevada LPO e diminuição das enzimas antioxidantes (Gualdi et al. 1994; Arthur 1996; Ramm & Ruddell 2005; Alexander et al. 2007). Sabendo da importância da atividade da iNOS na leishmaniose, mas não de sua possível ligação com o Fe nesta infecção, avaliamos a expressão e sua possível relação com o elemento Fe. Um aumento da expressão de iNOS nos tecidos (da enzima e atividade sérica de NO) foi observada nos animais infectados e mais nos assintomáticos. O que vem de encontro com a literatura que descreve sua atividade microbicida frente aos parasitos (Tomokane et al. 2010; Araujo et al. 2009; Zafra et al. 2008). Ao correlacionar a expressão de iNOS e a atividade com o Fe tecidual, uma correlação negativa foi encontrada especialmente nos sintomáticos. Além da

conhecida ação microbicida da iNOS sabe-se que a quantidade de Fe disponível para o parasito também é importante para a proliferação deste (Ganz 2009;). Portanto, essa correlação entre a expressão e atividade da iNOS e Fe tecidual, principalmente nos sintomáticos, sugere não só uma atuação antagônica de um sobre o outro, mas somatória na proliferação parasitária.

Estudos *in vitro* com macrófagos caninos suplementados com Fe foram realizados com intuito de avaliar o papel do Fe no dano celular e demonstrar a relação entre Fe e iNOS encontrada *in vivo*. Culturas de macrófagos peritoneais estimuladas com DF ou Fe e ou IFN/LPS e ou AMG, em diferentes intervalos de tempos (48 e 72 horas) foram realizadas. O Fe livre foi capaz de promover diminuição na produção de NO nas células previamente estimuladas com IFN/LPS. Ao contrário, observou-se aumento com a adição de DF nessas mesmas células. Já a adição de DF ou Fe ou destes nas células com adição de AMG não promoveu nenhuma alteração. Esses achados estão de acordo com a literatura para células de murino ou transformadas (Meneghini 1997; Weiss et al. 1994, 1999; Weiss 2005; Fritsche et al. 2001)

Por outro lado estudos relacionaram os níveis aumentados de ferro com o dano tecidual (Bacon et al., 1983; Gualdi et al. 1994; Pietrangelo et al. 1994; Pantopoulos & Hentze 1995; Arthur 1996; Recalcati et al. 1998, Casaril et al. 2000; Dai and Churg, 2001; Fritsche et al. 2001; Crichton et al. 2002; Ramm & Ruddell 2005; Alexander et al. 2007; Hill et al. 2010). Gardi et al. (2002) postularam que os mecanismos de injúria do excesso de ferro estariam relacionados ao aumento da LPO, ao efeito direto do Fe sobre a síntese de colágeno e a combinação destes fatores. Entretanto, isto não foi implicado na LVC. Observamos um aumento da fibrilopose nos órgãos estudados dos animais infectados mais notável nos sintomáticos. No fígado foi caracterizada por espessamento das fibras colágenas na parede dos sinusóides, semelhante ao observado por Rallis et al (2005) e Melo et al. (2009). No baço, intensa fibrilopose na cápsula, sistema trabecular e sinusóides (polpa vermelha) (Santana et al. 2008; Baneth et al. 2008). De fato, evidenciou-se uma correlação positiva entre a fibrilopose com o aumento do Fe tecidual, NO e iNOS. Tudo isso pode ser reforçado com as ideias de Chojkier et al. (1989) e Maher et al. (1994)

ao defenderam o fato de que o aumento de produtos da LPO pode também aumentar a expressão da cadeia $\alpha_1(I)$ da proteína colágeno pelas células estreladas (célula de Ito) (principal célula produtora de colágeno no fígado).

Os achados do Fe, NO, iNOS e fibrilopoeise associados com o aumento da expressão da calprotectina nos tecidos dos animais infectados, em especial nos sintomáticos, também segue o discutido na literatura para uma infecção ampla e persistente da *Leishmania* no hospedeiro vertebrado (Lau et al. 1995; Ryckman et al. 2003; Ikemoto et al. 2007; Bargagli et al. 2011; Sunderkotter et al. 1999; Steinbrink et al. 2000; Goto et al. 2008).

5 Conclusões

- Há um desequilíbrio dos elementos traço séricos e da atividade enzimática oxidante e antioxidante nos animais naturalmente infectados com *Leishmania (L) Leishmania infantum chagasi* diretamente relacionados às diferentes formas clínicas da doença.

- Cães sintomáticos, além das alterações dos elementos traço e sistema oxidante-antioxidantes mais intensos, apresentaram maior carga parasitária, menor produção de NO, maior acúmulo de Fe tecidual e dano tecidual.

- Há um provável mecanismo do desbalanço do metabolismo do Fe com a expressão/atividade iNOs, o dano tecidual e o processo de fibrose sistêmica na LVC.

- O presente trabalho abre perspectivas de avaliação da LVC com o enfoque dos elementos traço, principalmente o Fe como mecanismo de dano tecidual e fibrose originados de uma congestão generalizada característica da LVC ou de uma anemia por doença crônica.

7-REFERÊNCIAS

- ABE Y., HINES I, ZIBAR G, GRISHAM M. B. Hepatocellular protection by nitric oxide or nitrite in ischemia and reperfusion injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2008.
- ABRANCHES P; SILVA-PEREIRA MCD; CONCEIÇÃO-SILVA FM; SANTOS GOMES GM; JANZ G. Canine leishmaniasis: Pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol*, 77: 557-561, 1991.
- ADAMAMA-MORAITOU KK; SARIDOMICHELAKIS MN; POLIZOPOULOU Z; KRITSEPI M; TSOMPANAKOU A; KOUTINAS AF. Short-term exogenous glucocorticosteroidal effect on iron and copper status in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Can J Vet Res*, **69**: 287-292, 2005.
- ALENCAR JE. Calazar canino. Contribuição para o estudo da epidemiologia no Brasil. Tese, Imprensa Oficial, Fortaleza, Ceará, Brasil, 1959. 342p.
- ALFORD CE; KING TE Jr; CAMPBELL PA. Role of transferrin, transferrin receptors, and iron in macrophage listericidal activity. *J Exp Med*, **174**: 459-466, 1991.
- ALEXANDER J; SATOSKAR AR; RUSSEL DG. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci*, **112**: 2993-3002, 1999.
- ALEXANDER J; BRUCE Y; TUNG AC; KRIS VK. Effect of iron depletion on serum markers of fibrogenesis, oxidative stress and serum liver enzymes in chronic hepatitis C: results of a pilot study. *Liver International ISSN*, **27**(2) 1478-3223, 2007.
- ALEXANDRE-PIRES G; PAIS D; CORREIA M; PINA JA. Leishmaniosis: a report about the microvascular and cellular architecture of the infected spleen in *Canis familiaris*. *Microsc Res Tech*, **69**: 227-235, 2006.
- ALEXANDROVA R; RASHKOVA G; ALEXANDROV I; TSENOVA W; TUDOSE R; COSTISOR O. Briefly about copper. *Experimental Pathology and Parasitology*, 6: 1-12. 2003.
- ALMEIDA MA; JESUS EE; SOUSA-ATTA ML; ALVES LC; BERNE ME; ATTA AM. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*, **106**: 151-158, 2005.

- ALVAR J; CANAVATE C; MOLINA R; MORENO J; NIETO J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol*, **57**: 1-88, 2004.
- ALVAR J, MOLINA R, SAN ANDRES M, TESOURO M, NIETO J, VITUTIA M, GONZALEZ F, SAN ANDRES MD, BOGGIO J, RODRIGUEZ F, et al. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann Trop Med Parasitol*, **88**: 371-378. 1994.
- ALVAR J; VÉLEZ I D.; BERN C , HERRERO M , DESJEUX P , CANO J , JANNIN J , BOER M ,AND THE WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence PLoS One. 7(5),1-12 2012.
- ALVES W. Controle da leishmaniose visceral baseado no reservatório canino, In: Consulta de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis sobre leishmaniose visceral en las Américas. Organización Panamericana de salud, Rio de Janeiro, 2006, pp. 94-98.
- ALVES CF, DE AMORIM IF MOURA EP, RIBEIRO RR, ALVES CF, MICHALICK MS,KALAPOTHAKIS E,BRUNA-ROMERO O, TAFURI WL. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009 Apr 15;128(4):349-58.
- Alvarez-Hernandez., Felstein, M.V., and Brock, J.H. The relationship between iron release, ferritin synthesis and intracellular iron distribution in mouse peritoneal macrophages. Evidence for a reduced level of metabolically available iron in elicited macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 886: 214–222, 1986.
- AMINI M; NAHREVANIAN H; KHATAMI S; FARAHMAND M; MIRKHANI F; JAVADIAN S. Biochemical association between essential trace elements and susceptibility to leishmania major in BALB/c and C57BL/6 mice. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 13:83-85, 2009.
- AMUSATEGUI I; SAINZ A; RODRIGUEZ F; TESOURO MA. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *Eur J Epidemiol*, **18**: 147-156, 2003
- ANDRÁSI E. FARKAS E, SCHEIBLER H, RÉFFY A, BEZÚR L. Al, Zn, Cu, Mn and Fe levels in brain in Alzheimer's disease. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, **21**: 89-97, 1995.
- ANDREWS N. ITO Textbook - Chapter 1: Iron Metabolism Date Published: 06/2005.

- ANOSA VO; IDOWU AL. The clinico-haematological features and pathology of leishmaniasis in a dog in Nigeria. *Zentralbl Veterinarmed B*, **30**: 600-608, 1983.
- ANSTEAD GM; CHANDRASEKAR B; ZHAO W; YANG J; PEREZ L; MELBY P. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* Infection. *Infection and immunity*, **69** (8): 4709-4718, 2001.
- ARAÚJO MSS; ANDRADE RA; SATHLER-AVELAR; TEIXEIRA-CARVALHO A, ANDRADE MC; MAYRINK W; REIS AB. T-cell-derived cytokines, nitric oxide production by peripheral blood monocytes and seric anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG subclass patterns following immunization against Canine Visceral Leishmaniasis using Leishvaccine and Leishmune®. *Vaccine*, **27**: 1008-1011, 2009.
- ARTHUR MJ. Iron overload and liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol*, **11**: 1124-1129, 1996.
- ARTHUR, J.R. The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **57**: 1825-1835, 2000.
- ARTHUR JR; BECKETT GJ. Newer aspects of micronutrients in at risk groups (New metabolic roles for selenium). *Proceedings of the Nutrition Society*, **53**: 615-624, 1994.
- ASSRUE J; CUNHA FQ; EPPERLEIN M. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *Eur J Immunol*, **24**: 672-676, 1994.
- BACON B R., ANTHONY S. TAVILL, GARY M. BRITTENHAM, C. H. PARK, and RICHARD O. RECKNAGEL Hepatic Lipid Peroxidation In Vivo in Rats with Chronic Iron Overload, *J. Clin. Invest.* Volume 71 March 1983 429-439.
- BANETH G; AROCH I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *Vet J*, **175**: 14-15, 2008.
- BANETH G; KOUTINAS AF; SOLANO-GALLEGO L; BOURDEAU P; FERRER L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol* **24**: 324-330, 2008.
- BARBIERI CL. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite immunology*, **28**: 329-337, 2006.

- BARGAGLI E; CARMELA OLIVIERI C; CINTORINO M; REFINI RM; BIANCHI N; PRASSE A; ROTTOLI P; CALGRANULIN B. (S100A9/MRP14): A Key Molecule in Idiopathic Pulmonary Fibrosis? *Inflammation*, **34**: 85-91, 2011.
- BARROUIN-MELO SM; LARANGEIRA DF; DE ANDRADE FILHO FA; TRIGO J; JULIAO FS; FRANKE CR; PALIS AGUIAR PH; CONRADO DOS-SANTOS WL; PONTES-DE-CARVALHO L. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. *Vet J*, **171**: 331-339, 2006.
- BEARD JL. Iron Biology in Immune Function, Muscle Metabolism and Neuronal Functioning. *J Nutr*, **131**: 568S-580S, 2001.
- BETTGER WJ; O'DELL BL. Physiological roles of zinc in the plasma. *J Nutr Biochem*, **4**: 194-207, 1993.
- BILDIK A; KARGIN F; SEYREK K; PASA S; OZENSOY S. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidative status in dog with visceral Leishmaniasis. *Res Vet Sci*, **77**: 63-66, 2004.
- BISWAS T; GHOSH DK; MUKHERJEE N; GHOSAL J. Lipid peroxidation of erythrocytes in visceral leishmaniasis. *J Parasitol*, **83**: 151-152. 1997.
- BISTI S. The outcome of Leishmania major experimental infection in BALB/c mice can be modulated by exogenously delivered iron. *Eur. J. Immunol.* **30**: 3732-3740, 2000.
- BOGDAN C; RÖLLINGHOFF M; DIEFENBACH A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current Opinion in Immunology*, **12**: 604, 2000.
- BONHAM M, O'CONNOR JM; HANNIGAN BM; STRAIN JJ. *British Journal of Nutrition*, **87**: 393-403, 2002.
- BRENER Z. Calazar canino em Minas Gerais. Tese (Faculdade de Medicina – Universidade Federal de Minas Gerais), Belo Horizonte, 1957. 90p.
- STÉPHANE BRETAGNE, RÉMY DURAND, MARTINE OLIVI, JEAN-FRANÇOIS GARIN, ANNIE SULAHIAN, DANIELÈ RIVOLLET, MICHEL V. AND DENIAU M. Real-Time PCR as a New Tool for Quantifying Leishmania infantum in Liver in Infected Mice. *Clin Diagn Lab Immunol.* **8**(4): 828–831, 2001.
- BRICKS LF. Ferro e Infecções. *Pediatr*, **16**: 34-43, 1994.

- BRITTI D; SCONZA S; MORITTU VM; SANTORI D; BOARI A. Superoxide dismutase and Glutathione peroxidase in the blood of dogs with Leishmaniasis. *Vet Res Commun*, **32**: S251-S254, 2008.
- BROCK JH; MULERO V. Cellular and molecular aspects of iron and immune function. *Proceedings of the Nutrition Society*, **59**: 537-540, 2000.
- CALIARI, M. V. Principios de morfometria digital: KS300 para iniciantes. Belo Horizonte: Editora da UFMG, 148 p. 1997.
- CANÇADO, R. D. AND CHIATTONE, C. S.2002. Anemia de Doença Crônica *Rev.bras.hematol.hemoter.*,24(2):127-136.
- CANGUSSÚ, SD; SOUZA CC; VIEIRA LQ; AFONSO LCC; ARANTES RME. Histopathology of *Leishmania major* infection: revisiting *L. major*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **104**: 918 - 922, 2009.
- CARDIER JE; ROMANO E; SOYANO A. Lipid peroxidation and changes in T lymphocyte subsets and lymphocyte proliferative response in experimental iron overload. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **17**: 705-717, 1995.
- CARVALHO MC; BARACAT ECE; SGARBIERI VCS. Anemia Ferropriva e Anemia de Doença Crônica: Distúrbios do Metabolismo de Ferro. *Segurança Alimentar e Nutricional*, **13**: 54-63, 2006.
- CASARIL M; STANZIA LAM; TOGNELLA P. Role of iron load on fibrogenesis in chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology*, **47**: 220-5, 2000.
- CHAGAS E; CUNHA AM; CASTRO GO; FERREIRA LC; ROMANA C. Leishmaniose visceral americana. Relatório dos trabalhos da Comissão encarregada dos estudos da Leishmaniose Visceral Americana em 1936. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **32**: 321-385, 1937.
- CHAGAS E; CUNHA AM; FERREIRA LC; DEANE L; DEANE G; GUIMARÃES FN; PAUMGARTTEN MJ; SÁ B. Leishmaniose visceral americana (relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da leishmaniose visceral americana em 1937). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **33**: 189-229, 1938.
- CHANDRA RK. Excessive intake of zinc impairs immune responses. *JAMA*, **252**: 1443-1446, 1984.
- CHANDRA RK. Nutrition and immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr*, **66**: 460S-463S, 1997.

- CHENG P; CORZO CA; LUETTEKE N; YU B; NAGARAJ S; BUI MM; ORTIZ M; NACKEN W; SORG C; VOGL T; *et al.* Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med*, **205**: 2235-2249, 2008.
- CHOJKIER M; HOUGLUM K; SOLIS-HERRUZO J; BRENNER DA. Stimulation of collagen gene expression by ascorbic acid in cultured human fibroblasts. A role for lipid peroxidation? *J Biol Chem*, **264**: 16957–16962, 1989.
- CIARAMELLA P; OLIVA G; LUNA RD; *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec*, **22**: 539-543, 1997.
- COMBS GFJr. Selenium in global food systems. *Br J Nutr*, **85**: 517–547, 2001.
- CORNELIS R. Application of neutron activation analysis for trace element determinations in biological materials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **4**: 237-241, 1985.
- CORREDOR A; GALLEGO JF; TESH RB; MORALES A; DE CARRASQUILLA CF; YOUNG DG; KREUTZER RD; BOSHELL J; PALAU MT; CACERES E. *et al.* Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. *Am J Trop Med Hyg*, **40**:480-486, 1989.
- COSTA MMS; LIMA WG; FIGUEIREDO MM; MICHALICK MSM; TAFURI WL. Cervical, Mandibular, and Parotid Lymph Nodes of Dogs Naturally Infected with *Leishmania infantum*: A Histopathologic and Immunohistochemistry Study and Its Correlation with Facial Skin Lesions. *Veterinary Pathology*, **45**: 613-616, 2008.
- CRICHTON RR; WILMET S; LEGSSYER R; ROBERTA J. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *Ward Journal Of Inorganic Biochemistry*, **91**: 9-18, 2002.
- CUNNINGHAM AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology*, **72**: 132-141, 2002.
- CUNNINGHAM-RUNDLES S; GIARDINA PJ; GRADY RW; CALIFANO C; MACKENZIE P; DE SOUSA M. Effect of transfusional iron overload on immune response. *J Infect Dis*, **182** :S115-S121, 2000.
- DA COSTA-VAL AP; CAVALCANTI RR; DE FIGUEIREDO GN; MARQUES MICHALICK MS; ALEXANDER B; WILLIAMS P; MELO MN. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response,

haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Vet J*, **174**: 636-643, 2007.

JIN DAI AND ANDREW CHURG. Relationship of Fiber Surface Iron and Active Oxygen Species to Expression of Procollagen, PDGF-A, and TGFb1 in Tracheal Explants Exposed to Amosite Asbestos. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* Vol. 24, pp. 427–435, 2001

DA SILVA ES; VAN DER MEIDE WF; SCHOONE GJ; GONTIJO CM; SCHALLIG HD; BRAZIL RP. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Vet Res Commun*, **30**: 637-643. 2006.

DA SILVA SM. Avaliação clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937) submetidos a um protocolo terapêutico em clínica veterinária de Belo Horizonte Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2007.

DA SILVA SM, RIBEIRO VM, RIBEIRO RR, TAFURI WL, MELO MN, MICHALICK MS. First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. *Vet Parasitol* **166**: 159-162. 2009.

DAI J; CHUG A. Relationship of fiber surface iron and active oxygen species to expression of procollagen, PDGF-A, and TGFb 1 in tracheal explants exposed to amosite asbestos. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **24**: 427-435, 2001.

DAVIES KJ. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50: 279-289, 2000.

DE ALMEIDA MC; VILHENA V; BARRAL A; BARRAL-NETO M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **98**: 861-870, 2003.

DE AMORIM IFG; FREITAS E; ALVES CF; TAFURI WL; MELO MN; MICHALICK MSM; DA COSTA-VAL AP. Humoral immunological profile and parasitological statuses of Leishmune® vaccinated and visceral leishmaniasis infected dogs from an endemic area. *Parasit Vectors*, **4**: 86, 2011.

DEANE LM; DEANE MP: Sobre a biologia do *Phlebotomus longipalpis*, transmissor da leishmaniose visceral em zona endêmica do Estado do Ceará. I. Distribuição, predominância e variação estacional. *Rev Brasil Biol*, **15**: 83-95, 1955.

DEANE LM. Leishmaniose visceral no Brasil – estudo sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará, sanitária, S.n.d.e., ed. (Rio de

Janeiro), p. 161. 1956.

DE LUNA R; FERRANTE M; SEVERINO L; AMBROSIO R; PIANTEDOSI D; GRADONI L; LUCISANO A; PERSECHINO A. Decreased Lipid Fluidity of the Erythrocyte Membrane in Dogs with Leishmaniasis associated Anaemia. *J Comp Pathol*, **122**: 213-216. 2000.

DESJEUX P. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clinics in Dermatology*, **14**: 417-123, 1996.

DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **27**: 305-318, 2004.

DEVERY JM; KING NJ; GECZY CL. Acute inflammatory activity of the S100 protein CP-10. Activation of neutrophils *in vivo* and *in vitro*. *The Journal of Immunology*, **152**: 1888-1897, 1994.

DIETERICH S, BIELIGK U, BEULICH K, HASENFUSS G, PRESTLE J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart. Increased expression of catalase in the end stage failing heart. *Circulation* **101**: 33-39, 2000.

DIMRI U. Oxidant/antioxidant balance, minerals status and apoptosis in peripheral blood of dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis*. *Res Vet Sci*, **93**: 296-299, 2012.

DRAPER HH; HADLEY M. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, **186**: 421-431, 1990.

DYE C; WILLIAMS BG. Malnutrition, age and risk of parasitic disease: visceral leishmaniasis revisited. *Proc R Soc Lond B*, **22**: 33-39, 1993.

EDGEWORTH J; GORMAN M; BENNETT R; FREEMONT P; HOGG N. Identification of p8,14 as a highly abundant heterodimeric calcium binding protein complex of myeloid cells. *Journal of Biological Chemistry*, **266**: 7706-7713, 1991.

El Hag, I. A., Hashim, F. A., El Toum, I. A., Homeida, M., El Kalifa, M. and El Hassan, A. M. (1994). Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kala-azar). *Journal of Clinical Pathology*, **47**, 547–551.

EL- KHOYL MS; GAS ALLAH MA; EL-SHIMI S; EL-BAZ F; EL-TAYEB H; ABDEL-HAMIT MS. Zinc and copper status in children with bronchial asthma and atopic dermatitis. *J Egypt Pub Health Assoc*, **65**: 657-668, 1990.

- EREL O; KOCYIGIT A; BULUT V; GUREL MS. Reactive Nitrogen and Oxygen Intermediates in Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **94**: 179-183, 1999.
- ERICKSON LK; MEDINA EA; HUBBARD NE. Micronutrients and innate immunity. *J Infect Dis*, **182**: S5-S10, 2000.
- FARYADI M; MOHEBALI M. Alterations of serum zinc, copper and iron concentration in patients with acute and chronic cutaneous leishmaniasis. *Iranian J Publ Health*, **32**: 53-58, 2003.
- FERREIRA ALA; MATSUBARA LS. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil*, **43**: 61-68, 1997.
- FERREIRA SA, ITUASSU LT, DE MELO MN, DE ANDRADE AS. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol* **152**: 257-263, 2008.
- FERRER L; RABANAL RM; DOMINGO M; RAMOS JA; FONDEVILA D. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. *Res Vet Sci*, **44**: 194-196, 1988.
- FERRER L; JUANOLA B; RAMOS JA; RAMIS A. Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs. *Vet Pathol*, **28**: 342-343, 1991.
- FIELD CJ; IAN RJ; PATRICIA DS. Nutrients and their role in host resistance to infection. *J Leukoc Biol*, **71**: 16-32, 2002.
- FIORENTINO, D.F., M.W. BOND, AND T.R. MOSMANN, Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *Journal of Experimental Medicine*, **170**(6): p. 2081-95. 1989.
- FLEMING J; GHOSE A; HARRISON PR. Molecular mechanisms of cancer prevention by selenium compounds. *Nutr Cancer*, **40**: 42-9, 2001.
- FRIDOVICH SE; PORTER NA. Oxidation of arachidonic acid in micelles by superoxide and hydrogen peroxide. *J Biol Chem*, **256**: 260-265, 1981.
- FRITSCH G; LARCHER C; SCHENNACH H; WEISS G. Regulatory interactions between iron and nitric oxide metabolism for immune defense against *Plasmodium falciparum* infection. *The Journal of Infectious Diseases*, **183**:1388-1394, 2001.

- FUENTEALBA CI; ABURTO EM. Animal models of copper-associated liver disease. *Comparative Hepatology*, **2**: 5, 2003.
- GABRILOVICH DI; NAGARAJ S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*, **9**: 162-174, 2009.
- GANZ T. Iron in innate immunity: starve the invaders *Current Opinion in Immunology*, **21**: 63-67, 2009.
- GARDI C; AREZZINI B; FORTINO V; COMPORITI M. Effect of free iron on collagen synthesis, cell proliferation and MMP-2 expression in rat hepatic stellate cells. *Biochem Pharmacol*, **64**:1139-1145, 2002.
- GENARO O. Leishmaniose Visceral Canina Experimental. (Doutorado), Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, 1993. 202p.
- GIUNCHETTI RC; MAYRINK W; CARNEIRO CM; CORREA-OLIVEIRA R; MARTINS-FILHO AO; MARQUES MJ; TAFURI WL; REIS AB. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*, **84**: 269-277, 2008.
- GOTO Y; SANJOBA C; ARAKAKI N; OKAMOTO M; SAEKI K; ONODERA T; ITO M; MATSUMOTO Y. Accumulation of macrophages expressing MRP8 and MRP14 in skin lesions during *Leishmania major* infection in BALB/c and RAG-2 knockout mice. *Parasitology International*, **56**: 231-234, 2007.
- GOTO Y; SANJOBA C; ASADA M; SAEKI K; ONODERA T; MATSUMOTO Y. Adhesion of MRP8/14 to amastigotes in skin lesions of *Leishmania major*-infected mice. *Exp Parasitol*, **119**:80-86, 2008.
- GRADONI L. The diagnosis of canine leishmaniasis. *Round Table: Scalibor Protector Band*: 7-14. 2002.
- GRAMICCIA M; DI MUCCIO T; FIORENTINO E; SCALONE A; BONGIORNO G; CAPIELLO S; PAPARCONI R; MANZILLO VF; MAROLI M; GRADONI L; OLIVA G. Longitudinal study on the detection of canine *Leishmania* infections by conjunctival swab analysis and correlation with entomological parameters. *Vet Parasitol*, **171**: 223-228, 2010.
- GREEN LC; WAGNER DA; GLOGOWSKI J; SKIPPER PL; WISHNOK JS. Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, **126**:131-138, 1982.

- GROTTO HZW. Iron metabolism: an overview on the main mechanisms involved in its homeostasis. *Rev Bras Hematol Hemoter*, **30**: 390-397, 2008.
- GROTTO HZW. Iron physiology and metabolism. *Rev Bras Hematol Hemoter*, **32**: 8-17, 2010.
- GUALDI R; CASALGRANDI G; MONTOSI G; VENTURA E; PIETRANGELO A. Excess iron into hepatocytes is required for activation of collagen type I gene during experimental siderosis. *Gastroenterology*, **107**:1118-1124, 1994.
- GUERIN PJ; OLLIARO P; SUNDAR S; BOELAERT M; CROFT SL; DESJEUX P; WASUNNA MK; BRYCESON ADM. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis*, **2**: 494-501, 2002.
- H Aidaris CG; Bonventre PF. A role for oxygen-dependent mechanisms in killing of *Leishmania donovani* tissue forms by activated macrophages. *J Immunol*, **129**: 805-855, 1982.
- HALLQUIST NA; MCNEIL LK; LOCKWOOD JF; SHERMAN AR. Maternal-iron-deficiency effects on peritoneal macrophage and peritoneal natural-killer-cell cytotoxicity in rat pups. *Am J Clin Nutr*, **55**: 741-746, 1992.
- HARRISON CA; RAFTERY MJ; WALSH J; ALEWOOD P; IISMAA SE; THLIVERIS S; GECZY CL. Oxidation regulates the inflammatory properties of the murine S100 protein S100A8. *Journal of Biological Chemistry*, **274**: 8561-8569, 1999.
- HAZNECI E; KARABULUT AB; OZTURK C; BATCIOĞLU K; DOĞAN G; KARACA S. A comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities and nitrate levels in vitiligo patients. *Int J Dermatol*, **44**: 636-640, 2005.
- HEIDARPOUR M; SOLTANI S; MOHRI M; KHOSHNEGAH J. Canine visceral leishmaniasis: relationships between oxidative stress, liver and kidney variables, trace elements, and clinical status. *Parasitol Res*, **111**(4):1491-6.2012.
- HILL BG; DRANKA BP; SHANNON M; LANCASTER Jr; DARLEY-USMAR VM. What part of no don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. *JBC J Biol Chem.*, **25**;285(26):19699-704, 2010.
- HUANG ZL; FAILLA ML; REEVES P. Differentiation of human U937 promonocytic cells is impaired by moderate copper deficiency. *Exp Biol Med V*, **226**: 222-228, 2001.

- HUYNH C; ANDREWS NW. Iron acquisition within host cells and the pathogenicity of *Leishmania* * Published in final edited form as: *Cell Microbiol*, **10**: 293-300, 2008.
- IBS KH; RINK I. zinc-altered immune function. *J Nutr*, **133**: 1452S-1456S, 2003.
- ICHIKAWA M; WILLIAMS R; WANG L; VOGL T; SRIKRISHNA G. S100A8/A9 activate key genes and pathways in colon tumor progression. *Mol Cancer Res*, **9**: 133-148, 2011.
- IKEMOTO M; MURAYAMA H; ITOH H; TOTANI M; FUJITA M. Intrinsic function of S100A8/A9 complex as an anti-inflammatory protein in liver injury induced by lipopolysaccharide in rats. *Clin Chim Acta*, **376**: 197-200, 2007.
- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos-DOQ-CGCRE-008. Rio de Janeiro. 2. ed. 33p. 2010.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION – ISO. part 1: Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. 8466-1 Switzerland, 11p, 1999.
- IVERSSON LB; CAMARGO ME; VILLA NOVA A; REICHMANN MLAB; ANDRADE EA; TOLELANO JE. Inquérito sorológico para pesquisa de leishmaniose visceral em população canina-urbana do município de São Paulo-Brasil (1979-1982). *Rev Inst Med trop São Paulo*, **25**: 310-317, 1983.
- JAIN S; SCHEUER PJ; ARCHER B; NEWMAN SP; SHERLOCK S. Histological demonstration of copper and copper-associated protein in chronic liver diseases. *Journal of Clinical Pathology*, **31**: 784-790, 1978.
- Kanner, J., Harel, S. & Granit, R. Nitric Oxide Mechanism of Protection in Ischemia and Reperfusion Injury. *Arch. Biochem. Biophys.* 289, 130-136, 1991.
- KEENAN CM; HENDRICKS LD; LIGHTNER L; JOHNSON AJ: Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. II. Pathology. *Vet Pathol*, **21**: 80-86, 1984.
- KEHL-FIE TE; SKAAR EP. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Curr Opin Chem Biol*, **14**: 218-224, 2010.
- KILLICK-KENDRICK R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann Parasitol Hum Comp*, **65**: 37-42, 1990.

- KIREMIDJIAN-SCHUMACHER L; ROY M. Selenium and immune function. *Z Ernährungswiss*, **37**: 50-56, 1998.
- KLASSING K.C. Nutritional aspects of leukocytic cytokines. *J Nutr*, **118**:1435-1443, 1988.
- KLASSING KC; LAURIN DE; PENG PK; FRY DM. Immunological mediated growth depression in chicks: influence of feed, intake corticosterone and interleukin-1. *J Nutr*, **117**: 1629-1637, 1987.
- KOCHANOWSKI BA; SHERMAN AR. Cellular growth in iron-deficient rats: effect of pre- and post-weanling iron repletion. *J Nutr*, **115**: 279-287, 1985.
- KOCYIGIT A; EREL O; GUREL MS; AVCI S; AKTEPE K. Alteration of serum selenium, zinc, copper, and iron concentration and some related antioxidant enzyme activities in patients with cutaneous leishmaniasis. *Biol Trace Elements Res*, **65**: 271-281, 1998a.
- KOCYIGIT A; EREL O; SEYREK A; GUREL MS; AKTEPE K; AVCI S; VURAL H. Effects of antimonial therapy on serum zinc, copper and iron concentration in patients with cutaneous Leishmaniasis in Turkey. *J Egypt Soc Parasitol*, **28**: 133-142. 1998b.
- KOCYIGIT A; EREL O; GUREL MS; AKTEPE K; GUR S; AVCI S. Decreasing selenium levels and glutathione/peroxidase activity in patients with cutaneous leishmaniasis. *T J Medical Sciences*, **29**: 229-293, 1999a.
- KOCYIGIT A; GUR S; EREL O; GUREL MS. Association among plasma selenium, zinc, copper and iron concentration and immunoregulatory cytokine levels in patients with cutaneous leishmaniasis. *Biol Trace Elements Res*, **90**: 47-55, 1999b.
- KOCYIGIT A; GUREL M; ULUKANLIGIL M. Erythrocyte antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation levels in patients with cutaneous leishmaniasis. *Parasite*, **10**: 277-281, 2003.
- KOCYIGIT A; KELES H; SELEK S; GUZEL S; CELIK H; EREL O. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mutat Res*, **1**: 585: 71-78, 2005.
- KONIJN, A.M. AND HERSHKO, C.. Ferritin synthesis in inflammation. I. Pathogenesis of impaired iron release. *Br J Haematol* **37**: 7-16, 1977.
- KOUTINAS AF, POLIZOPOULOU ZS, SARIDOMICHELAKIS MN, ARGYRIADIS D, FYTIANOU A, PLEVRAKI KG. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J Am Anim Hosp Assoc*, **35**: 376-383, 1999.

- KUVIBIDILA SR; KITCHENS D; BALIGA BS. *In vivo* and *in vitro* iron deficiency reduces protein kinase C activity and translocation in murine splenic and purified T cells. *J Cell Biochem*, **74**: 468-478, 1999.
- LACKMANN M; RAJASEKARIAH P; IISMAA SE; JONES G; CORNISH CJ; HU S; SIMPSON RJ; MORITZ RL; GECZY CL. Identification of a chemotactic domain of the pro-inflammatory S100 protein CP-10. *The Journal of Immunology*, **150**: 2981-2991, 1993.
- LAL CS; KUMAR S; RANJAN A; RABIDAS VN; VERMA N; PANDEY K; VERMA RB; DAS S; SINGH D; DAS P. Comparative analysis of serum zinc, copper, magnesium, calcium and iron level in acute and chronic patients of visceral leishmaniasis. *J Trace Elem Med Biol*, **27**:130-7, 2012.
- LEE G. The anemia of chronic disease. *Semin Haematol* 1983;**20**:61–80.
- LAU W; DEVERY JM; GECZY CL. A chemotactic S100 peptide enhances scavenger receptor and Mac-1 expression and cholesteryl ester accumulation in murine peritoneal macrophages *in vivo*. *The Journal of Clinical Investigation*, **95**: 1957-1965, 1995.
- LIMA WG; MICHALICK MS; MELO MN; TAFURI WL. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Trop*, **92**: 43-53, 2004.
- LIMA WG; OLIVEIRA PS; CALIARI MV; GONÇALVES R; MICHALICK MS; MELO MN; TAFURI WL. Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b/CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*, **117**: 129-136, 2007.
- LINDER MC. Copper and genomic stability in mammals. *Mutation Res*, **475**: 141-152, 2001.
- LIPOWITZ AJ; BLUE J; BAÇO, In: Slatter, B.V. (Ed.) Manual de cirurgia de pequenos animais. *Manole Ltda*, São Paulo, pp. 1143-1159, 1998.
- LOOD C; STENSTRÖM M; TYDÉN H; GULLSTRAND B; KÄLLBERG E; LEANDERSON T; TRUEDSSON L; STURFELT G; IVARS F; BENGTSSON AA. Protein synthesis of the pro-inflammatory S100A8/A9 complex in plasmacytoid dendritic. *Arthritis Research & Therapy*, **13**: R60, 2011.
- LOWRY OH; ROSEBROUGH NJ; FARR AL; RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**: 265-275, 1951.
- MACKENZIE RC; RAFFERTY TS; BECKETT GJ. Selenium: an essential element for

immune function. *Immunology Today*, **19**: 342-345, 1998.

MAHER JJ; TZAGARAKI SC; GIMENEZ A. Malondialdehyde stimulates collagen production by hepatic lipocytes only upon activation in primary culture. *Alcohol*, **29**: 605-610, 1994.

MAIA C; CAMPINO L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol*, **158**: 274-287, 2008.

MANCIANTI F; GRAMICCIA M; GRADONI L; PIERI S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **82**: 566-567, 1988.

MARCS G. Intracellular *Leishmania*: your iron or mine? Jean-François Marquis and Philippe Gros *TRENDS in Microbiology* Vol.15 N°.32007, 2007.

MARZOCHI MCA; COUTINHO SG; SOUZA WJS; TOLEDO LM; GRIMALDI JR G; MOMEN H; PACHECO RS; SABROZA PC; SOUZA MA; RANGEL JR FB; TRAMONTANO N. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, Parasitological, Therapeutical and Epidemiological findings (1977-1983). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **80**: 349-357, 1985.

MASTOUSEK AJ; BURGUERA JL; BURGUERA M; ANEZ N. Changes in total content of iron, copper and zinc in serum, heart, liver, spleen and skeletal muscle tissues of rats infected with *Trypanosoma cruzi*. *Biol Trace Element Res*, **37**: 51-69, 1993.

Mates JM.,. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*; 153:83–104, 2000.

MAUEL J; RANSIJN A; BUCHMULLER-ROUILLER Y. Killing of *Leishmania* parasites in activated murine macrophages is based on n L-arginine-dependent process that produces nitrogen derivatives. *J Leukoc Biol*, **49**: 73-82, 1991.

MAURICIO IL, STOTHARD JR, MILES MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*, **16**: 188-189, 2000.

MEANS RT JR. THE ANAEMIA OF INFECTION. *BAILLIERE'S BEST PRACT RES CLIN HAEMATOL* 2000;13:151–62.

MELO FA; MOURA EP. Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Int J Exp Pathol*, **90**: 538-548, 2009.

- MELO FA; AMARAL M; OLIVEIRA P; LIMA W; ANDRADE M; MICHALICK M; RASO P; TAFURI W. Diffuse intralobular liver fibrosis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Am J Trop Med Hyg*, **79**: 198-204, 2009.
- MENEZHINI R. Iron homeostasis, oxidative stress, and dna damage *Free Radical Biology & Medicine*, **23**: 783-792, 1997.
- MICHALICK MSM, GENARO O, COSTA da, MELO MN, MAYRINK W. Expansão da leishmaniose visceral na grande Belo Horizonte, MG. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical*, **25**: 85, 1993.
- MILLER ER. Mineral x Disease interaction. *Journal of animal Science*, **60**: 1500-1507, 1985.
- MIRÓ G; CARDOSO L; PENNISI MG; OLIVA G; BANETH G. Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol*, **24**: 371-377, 2008.
- MISHRA J; CARPENTER S; SINGH S. Low serum zinc levels in an endemic area of visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Indian J Med Res*, **131**: 793-798, 2010.
- MOCCHEGIANI E; VECCIA S; ANCARANI F; SCALISE G; FABRIS N. Benefit of oral zinc supplementation as an adjunct to zidovudine (ATZ) therapy against opportunistic infection in AIDS. *Int. J. Immunopharmacol.* **17**, 719-727, 1995.
- MOCCHEGIANI E; MUZZIOLI M; GIACCONI R. Zinc and immunoresistance to infection in aging: new biological tools. *Trends Pharmacol Sci*, **21**: 205-208, 2000.
- Mojena M, Hortelano S. Castrillo A. Díaz-Guerra M. J. M., García-Barchino M. J. Sáez, G. T. and Boscá L. Protection by nitric oxide against liver inflammatory injury in animals carrying a nitric oxide synthase-2 transgene The FASEB Journal. Published online January 5, 2001.
- MORENO J; ALVAR J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol*, **18**: 399-405, 2002.
- MOREIRA PR, DE BARROS BANDARRA M, MAGALHÃES GM, MUNARI DP, MACHADO GF, PRANDINI MM, ALESSI AC, DE OLIVEIRA VASCONCELOS R.. Influence of apoptosis on the cutaneous and peripheral lymph node inflammatory response in dogs with visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*. Feb 18, 149-57, 2013.
- MORRIS CJ; JOHN R; EARL CW; TRENAM D, BLAKE R. Reactive Oxygen Species and Iron-a Partnership in Inflammation Research. *J Biochem Cell Bid*, **27**: 109-122, 1995.

- MOSMANN TR et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology*, **136**(7): p. 2348-2357, 1986.
- Muriel P. Nitric oxide protection of rat liver from lipid peroxidation, collagen accumulation, and liver damage induced by carbon tetrachloride. *Biochemical Pharmacology*. 56, Issue 6, 15 September, 773–779 1998.
- MURRAY HW; NATHAN CF. Macrophage Microbicidal Mechanisms *in vivo*: Reactive Nitrogen versus Oxygen Intermediates in the Killing of Intracellular Visceral *Leishmania donovani*. *J Exp Med*, **189**: 741-746, 1999.
- MURRAY MJ; MURRAY AB; MURRAY MB; MURRAY CJ. The adverse effect of iron repletion on the course of certain infections. *Br Med J*, **2**: 1113-1115, 1978.
- NATIONAL ASSOCIATION OF TESTING AUTHORITIES – NATA. (Australia), Format and content of test methods and procedures for validation and verification of chemical test methods, technical note. 8. 1997.
- NELSON DP, KIESOW, LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solution in the UV). *Anal Biochem* **49**: 474-478, 1972.
- NEMETH E, RIVERA S, GABAYAN V, KELLER C, TAUDORF S, PEDERSEN BK, GANZ T. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 2004;113:1271–6.
- NICOLLE C; COMTE C. Origine canine du Kala-azar. *Bull Soc Pathol Exot*, **1**: 299-301, 1908.
- NIETO CG; NAVARRETE I; HABELA MA; SERRANO F; REDONDO E. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol*, **45**: 33-47, 1992.
- NIETO J; ALVAR J; MULLEN AB; CARTER KC; RODRIGUEZ C; SAN ANDRES MI; SAN ANDRES MD; BAILLIE AJ; GONZALEZ F. Pharmacokinetics, toxicities, and efficacies of sodium stibogluconate formulations after intravenous administration in animals. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**: P2781-P2787, 2003.
- ODINK K; CERLETTI N; BRUGGEN J; CLERC RG; TARCSAY L; ZWADLO G; GERHARDS G; SCHLEGEL R; SORG C. Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature*, 330: 80-82, 1987.
- OLIVEIRA FJ; CECCHINI R. Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania (L.) chagasi*. *J Parasitol*, **86**: 1067-1072, 2000.

- OMARA FO; BLAKLEY BR the effects of iron deficiency and iron overload on cell-mediated immunity in the mouse. *Br J Nutr*, **72**: 899-909, 1994.
- OMS. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. In WHO Technical Report Series, 2011.
- OZBILGE H; AKSOY N; KILIC E; SARAYMEN R; YAZAR S; VURAL H. Evaluation of oxidative stress in cutaneous leishmaniasis. *J Dermatol*, **32**: 7-11, 2005.
- ÖZGÜNER M; SAYIN N. Histological changes in rat liver after chronic iron-sorbitol overload. *Journal of Ankara Medical School*, **24**: 49-54, 2002.
- PALTRINIERI S; RAVICINI S; ROSSI G; ROURA X. Serum concentrations of the derivatives of reactive oxygen metabolites (d-ROMs) in dogs with leishmaniosis. *Vet J*, **186**: 393-395, 2010.
- PANARO MA; FASANELA A; LISI S; MITOLO V; ANDRIOLA A; BRANDONISIO O. Evaluation of nitric oxide production by *Leishmania infantum*-infected dog macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, **20**: 147-158, 1998.
- PANTOPOULOS K; HENTZE MW. Nitric oxide signaling to iron-regulatory protein: Direct control of ferritin mRNA translation and transferrin receptor Mrna stability in transfected fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**: 1267-1271, 1995.
- PASAD S; KARGIN F; BILDIK A; SEYREK K; OZBEL Y; OZENSOY S. Serum and hair levels of zinc and other elements in dogs with visceral leishmaniasis. *Biol Trace Elem Res*, **94**: 141-147, 2003.
- PERCIVAL S. The immune system as a physiological indicator of marginal copper status? *Am J Clin Nutr*, **67**: 1064S-1068S, 1998.
- PIETRANGELO A; GUALDI R; CASALGRANDI G; GEERTS A; DE BLESER P; MONTOSI G; VENTURA E. Enhanced hepatic collagen type I mRNA expression into fat-storing cells in a rodent model of hemochromatosis. *Hepatology*, **19**:714-721, 1994.
- PINELLI E; KILLICK-KENDRICK R; WAGENAAR J; BERNADINA W; DEL REAL G; RUITENBERG J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun*, **62**: 229-235, 1994.

- PRASAD AS. Zinc and immunity. *Mol Cell Biochem*, **188**: 63-69, 1998.
- PUNCHARD NA; KELLY FJ. Chapter. 16. Glutathione peroxidase: activity and steady-state level of mRNA (Daret K. St. Clair e Ching K. Chow). *Free radicals: a Practical Approach*. Oxford University Press, p. 227- 240, 1996.
- RALLIS T; DAY MJ; SARIDOMICHELAKIS MN; ADAMAMA-MORAITOU KK; PAPAZOGLU L; FYTIANOU A; KOUTINAS AF. Chronic Hepatitis Associated with Canine Leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a Clinicopathological Study of 26 Cases. *J Comp Path*, **132**: 145-152, 2005.
- RAMM GA; RUDELL RG. Hepatotoxicity of iron overload: mechanisms of iron-induced hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis*, **25**: 433-434, 2005.
- RAMMES A; ROTH J; GOEBELER M; KLEMP M; HARTMANN M; SORG C. Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, **272**: 9496-9502, 1997.
- RASKIN KB, BELDNER S. Clinical examination of the distal ulna and surrounding structures. *Hand Clin* **14**: 177-190, 1998.
- RECALCATI S; TARAMELLI D; CONTE D; CAIRO G. Nitric oxide-mediated induction of ferritin synthesis in J774 macrophages by inflammatory cytokines: role of selective iron regulatory protein-2 down regulation. *Blood*, **91**: 1059-1066, 1998.
- REIS AB; MARTINS-FILHO AO; TEIXEIRA-CARVALHO A; CARVALHO MG; MAYRINK W; FRANCA-SILVA JC; GIUNCHETTI RC; GENARO O; CORREA-OLIVEIRA R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci*, **81**: 68-75, 2006a.
- REIS AB; TEIXEIRA-CARVALHO A; VALE AM; MARQUES MJ; GIUNCHETTI RC; MAYRINK W; GUERRA LL; ANDRADE RA; CORREA-OLIVEIRA R; MARTINS-FILHO OA. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*, **112**: 102-116, 2006b.
- REIS AB; MARTINS-FILHO OA; TEIXEIRA-CARVALHO A; CORDEIRO R; CARNEIRO CM; MAYRINK KW; TAFURI WL; CORREA-OLIVEIRA. R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **128**: 87-95, 2009.

- RIBEIRO RR; MOURA EP; PIMENTEL VM; SAMPAIO WM; SILVA SM; SCHETTINI DA; ALVES CF; MELO FA; TAFURI WL; DEMICHELI C; MELO MN; FREZARD F; MICHALICK MS. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother*, **52**: 2564-2572, 2008.
- RINK L; HAASE H. Zinc homeostasis and immunity. *TRENDS in Immunology*, **28**:1, 1-4. 2007.
- ROFE AM; PHILCOX JC; COYLE P. Trace metal, acute phase and metabolic response to endotoxin in metallothionein-null mice. *Biochem J*, **314**: 793-797, 1996.
- ROSARIO EY; GENARO O; FRANCA-SILVA JC; DA COSTA RT; MAYRINK W; REIS AB; CARNEIRO CM. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **100**: 197-203, 2005.
- ROY M; KIREMIDJIAN-SCHUMACHER L; WISHE H; COHEN MW; STOTZKY G.. Supplementation with selenium and human immune cell functions. I. Effect on lymphocyte proliferation and interleukin 2 receptor expression. *Biol Trace Elem Res*, **41**: 103-114, 1994.
- RUSSEL DG; TALAMAS-ROHANA P. *Leishmania* and the macrophage: a marriage of inconvenience. *Immunology Today*, **10**: 328-333, 1989.
- RYCKMAN C; VANDAL K; ROULEAU P; TALBOT M; TESSIER PA. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *The Journal of Immunology*, **170**: 3233-3242, 2003.
- SAMANTA S; GHOSHAL A; BHATTACHARYA K; SAHA B; WALDEN P; MANDAL C. Sialoglycosylation of RBC in visceral leishmaniasis leads to enhanced oxidative stress, calpain-induced fragmentation of spectrin and hemolysis. *PLoS One*, **7**:1-12, 2012.
- SAMBROOK J, FRITSH EF, MANIATIS T GEL Eletrophoresis: Polyacrylamide Gel Eletrophoresis, In: Sambrook, J., Russell, D.W. (Eds.) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 173-180, 1982.
- SAMPSON B; KOVAR IZ; RAUSCHER A; FAIRWEATHER-TAIT S; BEATTIE J; MCARDLE HJ; AHMED R; GREEN C. A case of hyperzincemia with functional zinc depletion: a new disorder? *Pediatr Res*, **42**: 219-225, 1997.

- SAMPSON B; FAGERHOL MK; SUNDERKOTTER C; GOLDEN BE; RICHMOND P; KLEIN N; KOVAR IZ; BEATTIE JH; WOLSKA-KUSNIERZ B; SAITO Y; ROTH J. Hyperzincaemia and hypercalprotectinaemia: anew disorder of zinc metabolism. *Lancet*, **360**: 1742-1745, 2002.
- SANTANA CC; VASSALLO J; DE FREITAS LA; OLIVEIRA GG; PONTES-DE-CARVALHO LC; DOS SANTOS WL. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. *Parasite Immunol*, **30**: 515-524, 2008.
- SANTOS FR, PENA SD, EPPLEN JT Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum Genet* **90**: 655-656. 1993.
- SCHAFER BW; HEIZMANN CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends in Biochemical Sciences*, **21**: 134-140, 1996.
- SCRIMSHAW NS; SANGIOVANNI JP. Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. *Am J Clin Nutr*, **66**: 464S-477S, 1997.
- SEN G; MUKHOPADHYAY R; GHOSAL J; BISWAS T. Oxidative damage of erythrocytes: a possible mechanism for premature hemolysis in experimental visceral leishmaniasis in hamsters. *Ann Hematol*, **80**: 32-37, 2001.
- SERARSLAN G; ATIK E. Expression of inducible nitric oxide synthase in human cutaneous leishmaniasis. *Mol Cell Biochem*, **280**: 147-149, 2005.
- SERARSLAN G; YILMAZ HR; SOGUT S. Serum antioxidant activities, malondialdehyde and nitric oxide levels in human cutaneous leishmaniasis. *Clinical and Experimental Dermatology*, **30**: 267-271, 2005.
- SHANKAR AH; PRASAD AS. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr*, **68**: 447S-463S, 1998.
- SILVA AV; PAULA AA; CABRERA MA; CARREIRA JC. Leishmaniasis in domestic dogs: epidemiological aspects. *Cad Saude Publica*, **21**: 324-328, 2005.
- SILVA FLT; OLIVEIRA M.R; TAFURI WL: Histopathological and immunohistochemical study of the gastrointestinal tract from a dog naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Arq Bras Med Vet Zoot*, **54**: 340-344, 2002.

- SILVA-ARAUJO MSS; ANDRADE RA; SATHLER-AVELAR R; TEIXEIRA-CARVALHO A; ANDRADE MC; VIANNA LR; MAYRINK W; REIS AB. Cell-derived cytokines, nitric oxide production by peripheral blood monocytes and seric anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG subclass patterns following immunization against canine visceral
- SINHA P; OKORO C; FOELL D; FREEZE HH; OSTRAND-ROSENBERG S; SRIKRISHNA G. Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*, **181**: 4666-4675, 2008.
- SISTO M; BRANDONISIO O; PANARO MA; ACQUAFREDDA A; LEOGRANDE D; FASANELLA A; TROTTA T; FUMAROLA L; MITOLO V. Inducible nitric oxide synthase expression in *Leishmania*-infected dog macrophages. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **24**: 247-254, 2001.
- SLAPPENDEL RJ; GRENE CE. Leishmaniasis. In: Greene C.E. (Ed). Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia: WB Saunders Co. 1990. p.769-777.
- SOHNLE PG, HAHN BL, SANTHANAGOPALAN V. INHIBITION OF CANDIDA ALBICANS GROWTH BY CALPROTECTIN IN THE ABSENCE OF DIRECT CONTACT WITH THE ORGANISMS. *J INFECT DIS* 1996;174:1369-72.
- SOHNLE PG, HUNTER MJ, HAHN B, ET AL. ZINC-REVERSIBLE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF RECOMBINANT CALPROTECTIN (MIGRATION INHIBITORY FACTOR-RELATED PROTEIN 8 AND 14). *J INFECT DIS* 2000;182:1272-5.
- SOLANO-GALLEGO L; FERNANDEZ-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. *J Comp Pathol*, **130**: 7-12, 2004.
- SOLANO-GALLEGO L; KOUTINAS A; MIRO G; CARDOSO L; PENNISI MG; FERRER L; BOURDEAU P; OLIVA G; BANETH G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*, **165**: 1-18, 2009.
- SOUBASIS N; RALLIS TS., VLEMMAS J; ADAMAMA-MORAITOU KK, ROUBIES N. Serum and liver iron concentration in dogs with experimentally induced hepatopathy. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **21**: 599-604, 2006.
- STEFANIDOU M; MARAVELIAS C; DONA A; SPILIOPOULOU C. Zinc: a multipurpose trace element. *Arch Toxicol*, **80**: 1-9, 2006.

- STEINBRINK K; SCHÖNLAU F; RESCHER U; HENSELEIT U; VOGEL T; SORG C; SUNDERKÖTTER C. Ineffective elimination of *Leishmania major* by inflammatory (MRP14-positive) subtype of monocytic cells. *Immunobiology*, **202**: 442-459, 2000.
- STRAUSS-AYALI D; JAFFE CL; BURSHTAIN O; GONEN L; BANETH G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J Infect Dis*, **189**: 1729-1733, 2004.
- STRÍZ I; TREBICHAŤSKÝ I. Calprotectin: a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiol Res*, **53**: 245-253, 2004.
- SUNDERKÖTTER C; KUNZ M; STEINBRINK K; MEINARDUS-HAGER G; GOEBELER M; BILDAU H; SORG C. Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol*, **151**: 4891-4901, 1999.
- TAFURI WL; BARBOSA AJ; MICHALICK S; GENARO O; FRANCA-SILVA JC; MAYRINK W; NASCIMENTO E. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **38**: 81-89, 1996.
- TAFURI WL; DE OLIVEIRA MR; MELO MN. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol*, **96**: 203-212, 2001.
- TAFURI WL; SANTOS RL. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods*, **292**: 17-23, 2004.
- TESH RB. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: Is it time to change strategies? *Am J trop Hyg*, **52**: 287-292, 1995.
- THOMSON CD; REA HM; DOESBURG VM; ROBINSON MF. Selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in whole blood of New Zealand residents. *Br J Nutr*, **37**: 457-460; 1977.
- THOREY IS, ROTH J, REGENBOGEN J, HALLE JP, BITTNER M, VOGL T, KAESLER S, BUGNON P, REITMAIER B, DURKA S, GRAF A, WOCKNER M, RIEGER N, KONSTANTINOW A, WOLF E, GOPPELT A, WERNER S: THE CA²⁺-BINDING PROTEINS S100A8 AND S100A9 ARE ENCODED BY NOVEL INJURYREGULATED GENES. *J BIOL CHEM* 276: 35818-35835, 2001.

- TOMOKANE TY; SACOMORI JV; MATTA VLR; MARCONDES M; CORBETT CEP; LAURENTI MD. Alta expressão de NOs2 em macrófagos está associada com a baixa carga parasitária em baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi*. *Anais da Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli*, **4**: 5-10 2010.
- TRYPHONAS L; ZAWIDZKA Z; BERNARD MA; JANZEN EA. Visceral leishmaniasis in a dog: clinical, hematological and pathological observations. *Can J Comp Med*, **41**: 1-12, 1977.
- TURNER RJ; FINCH JM. Selenium and the immune response. *Proc Nutr Soc*, **50**: 275-285, 1991.
- VOLTARELLI EM; ARRAES SMAA; PERLES TF; LONARDONI MVC; TEODORO U; SILVEIRA TGV. Serological survey for *Leishmania sp.* infection in wild animals from the municipality of Maringá, Paraná state, Brazil. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*, **15**: 732-744, 2009.
- VURAL H, AKSOY N, OZBILGE H. Alterations of oxidative-antioxidative status in human cutaneous leishmaniasis. *Cell Biochem Funct*, **22**:153-156, 2004.
- XAVIER, S.C., DE ANDRADE, H.M., MONTE, S.J., CHIARELLI, I.M., LIMA, W.G., MICHALICK, M.S.M., TAFURI, W.L., TAFURI, W.L., 2006. COMPARISON OF PARAFFIN-EMBEDDED SKIN BIOPSIES FROM DIFFERENT ANATOMICAL REGIONS AS SAMPLING METHODS FOR DETECTION OF LEISHMANIA INFECTION IN DOGS USING HISTOLOGICAL, IMMUNOHISTOCHEMICAL AND PCR METHODS. *BMC VET. RES.* 2, 1–17.
- WARNER, T.; HARRUS, S. ANEMIA OF INF1AMMATORY DISEASE. IN: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. SCHALM'S VETERINARY HEMATOLOGY. PHILADELPHIA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, P. 205-209, 2000.
- WEISS G. Iron and immunity: a double-edged sword. *Eur J Clin Invest*, **32**: 70-78, 2002.
- WEISS, G. Modification of iron regulation by the inflammatory response. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, **18**: 183-201, 2005.
- WEISS G; WERNER-FELMAYER G; WERNER ER; WERNER K; WACHTER H; HENTZE MW. Iron regulates nitric oxide synthase activity by controlling nuclear transcription. *J Exp Med*, **180**: 969, 1994.
- WEISS G; UMLAUFT F; URBANEK M; HEROLD M; LOVEVSKY M; OFFNER F; GORDEUK VR. Associations between cellular immune effector function, iron

metabolism and disease activity in patients with chronic hepatitis C virus infection. *The Journal of Infectious Diseases*, **180**:1452-1458, 1999.

WEYENBERGH JV; SANTANA G; D'OLIVEIRA Jr A; SANTOS A; COSTA CH; CARVALHO EM; BARRAL A; BARRA-NETTO M. Zinc/copper imbalance reflects immune dysfunction in human leishmaniasis: an *ex vivo* and *in vitro* study. *BMC Infectious Diseases*, **4**: 1-7, 2004.

WINK D A, HANBAUER I, KRISHNA M C., DEGRAFF W, GAMSON J AND MITCHELL J B. Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species Proc. Natl. Acad. Sci. 90, pp. 9813-9817, 1993

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). TDR diseases/Diseases current portfolio. <http://www.who.int/tdr/publications/pdf/pr13/leis.pdf/pr13/leish.pdf>. outubro 2011.

YANAGISAWA H; YAKUGAKU Z. Zinc Deficiency and Clinical Practice. *The Pharmaceutical Society of Japan*, **128**: 333-339, 2008.

YANG TH; TZENG S; CHENG I; BURNETT MG; YOSHIZAWA Y; FUKUYAMA K; LEE SC; EPSTEIN WL. Identification of the mouse calcium-binding proteins, MRP 8 and MRP 14, in *Schistosoma mansoni*-induced granulomas: biochemical and functional characterization. *J Leukoc Biol*, **61**: 258-266, 1997.

ZAFRA R.; JABER JR; PÉREZ-ÉCIJA RA; BARRAGÁN A; MARTÍNEZ-MORENO A, PÉREZ J. High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden. *Vet Immunol Immunopathol*, **123**: 353-359, 2008.

ZULUETA AM; VILLARROEL E; RODRIGUEZ N.*et al.* Epidemiologic aspects of American visceral leishmaniasis in an endemic focus in Eastern Venezuela. *Amer J trop Med Hyg*, **61**: 945-950, 1999.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 213/2007**, relativo ao projeto intitulado "*Avaliação sorológica e "in vitro" de elementos traço durante a interação de promastigotas de Leishmania sp com monócitos-macrofágos de cães naturalmente e experimentalmente infectados com Leishmania chagasi*", que tem como responsável(is) **Wagner Luiz Tafuri**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **13/ 08/2008**.

Este certificado expira-se em **13/ 08/ 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 213/2007**, related to the project entitled "*Serological and "in vitro" evaluation of trace elements during the interaction of promastigotas of Leishmania sp with monocyte-macrophagos of dogs naturally and experimentally infected with Leishmania chagasi*", under the supervisors of **Wagner Luiz Tafuri**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 13, 2008**.

This certificate expires in **August 13, 2013**.

Belo Horizonte, 18 de Agosto de 2008.

Humberto Pereira Oliveira
Pl Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br