

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

Determinação do Perfil de Citocinas e Quantificação da Carga
Parasitária em Cães Naturalmente Infectados por *Leishmania*
(Leishmania) chagasi (Cunha & Chagas, 1937) Com e Sem
Expressão Clínica da Leishmaniose Visceral.

CÍNTIA FONTES ALVES

Belo Horizonte
2008

CÍNTIA FONTES ALVES

Determinação do Perfil de Citocinas e Quantificação da Carga Parasitária em Cães Naturalmente Infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) Com e Sem Expressão Clínica da Leishmaniose Visceral.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Protozoologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. MARIA NORMA MELO – Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Co-Orientador: Prof. Dr. MAURO MARTINS TEXEIRA – Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Dedico este trabalho aos grandes e verdadeiros amores da minha vida:

minha mãe, *Célia*,

meus irmãos: *Celminha, Abel, Juninho e André*,

meu companheiro *Floquinho*...

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Gostaria de agradecer ao meu amigo **Weverton Marcos Sampaio** que esteve sempre ao meu lado durante este trabalho e que, com certeza, continua torcendo por mim...

Muito obrigada, querido!!!

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por sempre colocar pessoas tão especiais no meu caminho!

À querida Professora Norma pelo exemplo de simplicidade, humildade e respeito ao próximo. O maior presente que recebi, nestes quatro anos de caminhada, foi a oportunidade de conviver com alguém tão especial, que consegue conciliar de forma tão harmônica competência e doçura! A Senhora sempre estará no meu coração!

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia ICB/UFMG, na pessoa do seu atual coordenador Prof. Marcos Linardi.

À Rosangela e à Soraia por cuidarem com tanto carinho do laboratório de Biologia de *Leishmania* e pela ajuda inestimável em todo o trabalho.

Ao Prof. Mauro Texeira pela colaboração na discussão sobre as citocinas e aos seus alunos Ester, Caio e Daniel pelo apoio.

À Prof. Marilene por abrir as portas do Laboratório de Sorologia de *Leishmania* permitindo a realização das técnicas de sorologia e por me acolher com tanto carinho.

Ao Prof. Wagner Tafuri e aos seus alunos Eliane, Weverton, Ferdinan, Felipe, Wanderson e Marta que me ensinaram a importância de se trabalhar em equipe. Sem vocês este trabalho não seria possível... e também não seria tão prazeroso!

Ao Prof. Evanguedes Kalapothakis e aos seus alunos pela gentileza com que me acolherem em seu laboratório e pela imprescindível colaboração na realização das clonagens e sequenciamento.

Ao Prof. Oscar Bruña Romero pela constante disponibilidade e pela imensa colaboração nas PCRs em tempo real.

Ao Departamento de Bioquímica e Imunologia por disponibilizar o aparelho *ABI Prism 7900 Sequence Detection System*.

Ao Departamento de Biofísica e Fisiologia e ao aluno Sérgio pela disponibilização do aparelho *ABI Prism 7000 Sequence Detection System* no momento mais crítico deste trabalho.

À Prof. Cidinha pela gentileza em disponibilizar o espectrofotômetro.

Ao Dr. Antônio Totola pelas correções dos resultados da PCR em tempo real.

Ao Weder pelo auxílio na manipulação dos cães e por tornar estes momentos mais agradáveis.

À Sr^a. Elza pela colaboração nos testes sorológicos.

À Sumara pelo carinho e cuidado com todos os alunos.

À Vera, Márcia, Geni e Zuleica por alegrarem meus almoços.

Ao Sr. Nery pelo carinho diário.

Ao Prof. Ricardo e à Rosa, Geane, Carol, Adriana e Blima que me acolheram tão bem nesta casa.

Aos professores Nelder e Marcos Horácio e a seus alunos pela disponibilização do freezer à -80°C.

À Mirian pelas sugestões na realização da PCR em tempo real.

Aos colegas Adriana, Arthur, Daniella, Geane, Jorge, Lívio, Marcelo, Rodolfo, Rodrigo e Weverton que me acompanharam no início desta jornada.

Às colegas Ângela e Janaína pelo companheirismo e carinho, por estarem sempre ao meu lado e pelo apoio na execução deste trabalho.

À Eloísa por me propiciar a oportunidade de descobrir como é bom amar os animais.

Ao Raul pela grande ajuda na coleta dos materiais dos cães experimentais e pelo exemplo de serenidade e gentileza.

Aos adoráveis professores Cleyder e Sandra pela oportunidade de conviver com pessoas tão especiais.

Ao querido amigo Sydnei pelo companheirismo e pelo exemplo de profissionalismo e dedicação.

À doce Lara pelo carinho, pela amizade e pelo exemplo de simplicidade e espontaneidade. Você é um anjinho que veio iluminar nossas vidas!

À querida amiga Belinha, irmã de caminhada, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos. Muito obrigada pelo apoio incondicional, pelos inúmeros conselhos e pelo exemplo de garra e de retidão de caráter! É muito bom poder sempre contar com a sua amizade!

À minha amada Mãe, exemplo de dedicação à família, de força e de coragem! Obrigada pelo amor incondicional! Obrigada pelo esforço na minha educação e pelo carinho diários! Seu bom humor, sua energia e sua alegria contagiantes tornam todos os meus dias especiais... Você é a melhor Mãe e a melhor Amiga do mundo!!! Te amo!!!

Aos meus irmãos Celminha, Cibele e Juninho eternos e verdadeiros amigos. Vocês são a razão da minha vida!!!

Ao meu irmão de coração André que trouxe tanta felicidade para minha família. Obrigada pelo carinho e pelo exemplo de bondade e generosidade.

Ao meu amigo Floquinho que torna o regresso diário para minha casa um momento tão especial. Obrigada por me transformar em um ser humano um pouco melhor!

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho!

Muito obrigada!!!

*"Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal,
ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante."*

Albert Schweitzer

Colaboradores

Este trabalho contou com os seguintes colaboradores:

Prof.^a. Dr.^a. MARILENE SUZAN MARQUES MICHALICK do Laboratório de Sorologia do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG;

Prof. Dr. WAGNER LUIZ TAFURI do Laboratório de Neuroimunologia Experimental (NIPE) do ICB-UFMG;

Prof. Dr. EVANGUEDES KALAPOTHAKIS do Departamento de Biologia Geral do ICB-UFMG;

Prof. Dr. OSCAR BRUÑA ROMERO do Laboratório de Agentes Recombinantes do Departamento de Microbiologia do ICB-UFMG.

Financiadores

Este trabalho foi parcialmente financiado por recursos da Comunidade Econômica Européia através do projeto *Leishmaniasis Epidemiology Network South America* e pelo CNPq através do fornecimento de bolsa de estudo.

Resumo

A leishmaniose visceral americana, considerada a forma mais grave da doença, é uma zoonose no Novo Mundo, onde o cão doméstico é o principal reservatório da infecção.

O desenvolvimento de uma vacina contra a doença canina parece ser a medida mais adequada para o controle da doença. No entanto, os aspectos da resposta imune efetiva na infecção canina são pouco conhecidos, sendo que, este conhecimento é fundamental para que possam ser feitas intervenções nestes mecanismos para auxiliarem o hospedeiro na eliminação do parasito.

Dessa forma, os objetivos principais deste trabalho foram avaliar o perfil de citocinas e determinar o parasitismo tecidual no baço, fígado, linfonodo cervical superficial, medula óssea e pele de orelha de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, com e sem expressão clínica de doença.

Para a realização destes objetivos, 18 cães sem raça definida foram incluídos neste estudo, devidamente autorizado pelo CETEA/UFMG (protocolo nº. 121/04) sendo subdivididos em três grupos: cães controle não infectados (n= 6) e cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, com (n= 6) e sem (n= 6) expressão clínica da doença. Para a determinação desses grupos, a presença de sinais clínicos compatíveis com a doença foi investigada de forma sistemática. A infecção foi confirmada por testes sorológicos (RIFI e ELISA) e parasitológicos (exame direto e cultivo de material de punção medular). Também foram realizados exames hematológicos e bioquímicos em todos os cães.

Após esses exames preliminares, todos os cães foram eutanasiados e necropsiados. Foram coletados fragmentos dos órgãos de interesse para a realização de estudos histopatológico e imunoistoquímico e para a avaliação do perfil de citocinas (IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-10, TGF- β e TNF- α) e quantificação da carga parasitária, ambos pela PCR em tempo real.

Todos os cães naturalmente infectados tiveram a confirmação da infecção por testes sorológicos e parasitológicos.

Os sinais clínicos observados em maior frequência nos cães com expressão clínica da doença foram a linfadenopatia, observada em todos os animais, seguida por alterações cutâneas. Os cães desse grupo apresentaram maior parasitismo em

todos os órgãos pesquisados, tanto pela imunistoquímica quanto pela PCR em tempo real.

A pesquisa de imunoglobulinas das subclasses IgG1 e IgG2 demonstrou maiores títulos de IgG2 que de IgG1, nos grupos de cães sem e com expressão clínica da doença, indicando que essas subclasses não são bons marcadores da evolução da doença.

A avaliação da expressão de citocinas revelou diferentes padrões nos órgãos estudados. O linfonodo cervical superficial foi o único órgão que apresentou uma clara dicotomia, com a expressão mais elevada de citocinas do tipo Th1 nos cães sem expressão clínica e de citocinas regulatórias nos cães com expressão clínica da doença.

Nos baços e medulas óssea, dos cães naturalmente infectados, TNF- α mostrou-se associado à resistência e TGF- β associado à progressão da doença. Já no fígado, a expressão de IL-4 e IL-10 mostrou-se associada à progressão da doença e à proliferação do parasito.

Um balanço na produção de citocinas Th1 e citocinas regulatórias foi observado na pele de orelha dos animais, revelando que os mecanismos, envolvidos na resposta imune celular na leishmaniose visceral canina, são mais complexos que aqueles verificados no modelo murino e também na doença humana.

Palavras chaves: citocinas, leishmaniose visceral, reação em cadeia da polimerase e PCR em tempo real.

Abstract

The leishmaniasis includes a spectrum of diseases due to great variability and biological complexity of the parasite, hosts and vectors. The American visceral leishmaniasis is considered the most severe form of the disease. It is a zoonosis in the New World with the dog considered the main reservoir of the parasite.

The development of a vaccine against the canine infection seems to be the most appropriate control measure of the disease. However, studies on the immunology of canine visceral leishmaniasis are scarce and the knowledge about immune aspects in dogs infected with *L. chagasi* is essential for interventions in the mechanism to eliminate the parasite.

The main objectives of this work went to determine the cytokines profile and the parasite load in the spleen, liver, lymph node, bone marrow and skin of ear of dogs naturally infected by *L. chagasi*, with and without clinical expression of the disease.

Dogs were classified after serologic, parasitological and physical assessment, also, hematological and biochemical analysis were accomplished in all of them. Eighteen dogs were included in this study, properly authorized by CETEA/UFMG (protocol no. 121/04) and were subdivided in three groups: no infected dogs (n= 6) and dogs naturally infected by *L. chagasi*, with (n= 6) and without (n= 6) clinical expression of the disease.

After those preliminary exams, all dogs were sacrificed. Fragments of the organs were collected for the histological and immunohistochemical studies, and for the determination of cytokines profile (IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-10, TGF- β and TNF- α) and quantification of parasite load, both using real time PCR.

The serological and parasitological assessments confirmed the infection of the dogs naturally infected with *L. chagasi*.

The clinical signs of the disease observed in higher frequency in the dogs were the lymphadenopathy and cutaneous lesions. The dogs with clinical expression of the disease showed higher parasite load on all organs studied for both immunohistochemical and real time PCR.

Immunoglobulin of the subclasses IgG1 and IgG2 demonstrated higher titles of IgG2 than IgG1, in the groups of infected dogs without and with clinical expression

of the disease, indicating that those subclasses are not good markers for the evolution of the disease.

The determination of cytokine profiles revealed different patterns in the studied organs. The lymph node was the only organ that presented a dichotomy, with highest expression of Th1 type cytokines in the dogs without clinical expression and of regulatory cytokines in the dogs with clinical expression of the disease.

In the spleen and bone marrow of naturally infected dogs, transcript for level of TNF- α was shown associate to the resistance and TGF- β associate of the progression of the disease. However IL-4 as well as IL-10 were significantly elevated in dogs with clinical signs and high load of parasites.

A balance in the Th1 and regulatory cytokines production was observed in the skin of ear in the animals, revealing that the mechanisms involved in the immunology of canine visceral leishmaniasis are more complex than those observed in murine model and different of that observed in the human disease.

Key words: cytokines, visceral leishmaniasis, polymerase chain reaction and real time PCR.

Lista de Ilustrações

GRÁFICO 1	Média dos valores de absorvância para a determinação de IgG nos soros dos cães dos grupos controle não infectados (NI), e naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> sem (SEC) e com expressão clínica (CEC) da doença, pela técnica de ELISA. *Grupo difere dos demais ao nível de 5% de probabilidade pela análise de variância. "Cut off" = 0,042, representado no gráfico pela linha tracejada vermelha.	94
GRÁFICO 2	Títulos das subclasses de imunoglobulinas IgG1 e IgG2 nos soros dos cães naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> , sem (SEC) e com expressão clínica (CEC) da infecção. A) Comparação das medianas dos títulos de IgG1 e IgG2 no grupo de cães SEC. B) Comparação das medianas dos títulos de IgG1 e IgG2 no grupo de cães CEC. C) Comparação dos títulos de IgG1 entre os grupos SEC e CEC. D) Comparação dos títulos de IgG2 entre os grupos SEC e CEC. "Cut off" para IgG1=0,109, "cut off" para IgG2 = 0,051. *Grupos diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Mann-Whitney.	96
GRÁFICO 3	Alterações histopatológicas observadas no baço dos cães não infectados (NI) e naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> , sem (SEC) e com expressão clínica (CEC) da doença. Critérios adotados para avaliação da intensidade das alterações: 1- Ausência de alteração; 2- Alteração discreta; 3- Alteração moderada; 4- Alteração intensa. *Grupos de cães diferem entre si, no critério avaliado, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Mann-Whitney.	100
GRÁFICO 4	Alterações histopatológicas observadas no fígado dos cães não infectados (NI) e naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> , sem (SEC) e com expressão clínica (CEC) da doença. Critérios adotados para avaliação da intensidade das alterações: 1- Ausência de alteração; 2- Alteração discreta; 3- Alteração moderada; 4- Alteração intensa. *Grupos de cães diferem entre si, no critério avaliado, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Mann-Whitney.	102
GRÁFICO 5	Alterações histopatológicas observadas no linfonodo cervical superficial dos cães não infectados (NI) e naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> , sem (SEC) e com expressão clínica (CEC) da doença. Critérios adotados para avaliação da intensidade das alterações: 1- Ausência de alteração; 2- Alteração discreta; 3- Alteração moderada; 4- Alteração intensa. *Grupos de cães diferem entre si, no critério avaliado, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Mann-Whitney.	104
GRÁFICO 6	Alterações histopatológicas observadas na pele de orelha dos cães não infectados (NI) e naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> , sem (SEC) e com expressão clínica (CEC) da doença. Critérios adotados para avaliação da intensidade das	106

alterações: 1- Ausência de alteração; 2- Alteração discreta; 3- Alteração moderada; 4- Alteração intensa. *Grupos de cães diferem entre si, no critério avaliado, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Mann-Whitney.

GRÁFICO 7	Número de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> encontradas em 20 campos examinados no estudo imunoistoquímico de cortes de: A) fígado, B) baço, C) linfonodo cervical superficial e D) pele de orelha, dos cães dos grupos: controle não infectados (NI), e dos cães naturalmente infectados por <i>L.chagasi</i> : sem expressão clínica (SEC) e, com expressão clínica (CEC). *Grupos diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t não pareado.109
GRÁFICO 8	Comparação da densidade parasitária obtida em 20 campos examinados no estudo imunoistoquímico de cortes dos órgãos: fígado, baço, linfonodo cervical superficial e pele de orelha nos grupos dos cães: A) sem expressão clínica (SEC) e B) com expressão clínica (CEC). a, b, c: grupos marcados com letras minúsculas distintas, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t não pareado.110
GRÁFICO 9	Correlação entre os títulos de IgG1 nos soros dos cães naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> e a densidade parasitária determinada pelo exame de 20 campos no estudo imunoistoquímico de cortes de: A) baço, B) fígado, C) linfonodo cervical superficial e D) pele de orelha destes cães. Os resultados foram plotados individualmente para cada cão e a linha contínua ilustra os índices de correlação positiva e negativa. Os índices de correlação de Pearson (r) e os valores p, para cada órgão, são mostrados nos gráficos.112
GRÁFICO 10	Correlação entre os títulos de IgG2 nos soros dos cães naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> e a densidade parasitária determinada pelo exame de 20 campos no estudo imunoistoquímico de cortes de: A) baço, B) fígado, C) linfonodo cervical superficial e D) pele de orelha destes cães. Os resultados foram plotados individualmente para cada cão e a linha contínua ilustra os índices de correlação positiva e negativa. Os índices de correlação de Pearson (r) e os valores p, para cada órgão, são mostrados nos gráficos.113
GRÁFICO 11	Média da relação Albumina/Globulina nos grupos de cães controle não infectados (NI), e cães naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> sem expressão clínica (SEC) e com expressão clínica (CEC). *grupo difere dos demais ao nível de 5% de probabilidade pela análise de variância.118
GRÁFICO 12	Avaliação da expressão de citocinas em amostras de baços dos cães do grupo controle não infectados (NI) e dos cães naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> dos grupos sem expressão clínica (SEC) e com expressão clínica (CEC). Logaritmo do número de moléculas de mRNA de: A) IFN- γ , B) IL-12, C) IL-4, D) IL-10, E) TGF- β e F) TNF- α . *†: Grupo difere dos demais ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Kruskal-Wallis.135

GRÁFICO 13	Avaliação da expressão de citocinas em amostras de fígados dos cães do grupo controle não infectados (NI) e dos cães naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> dos grupos sem expressão clínica (SEC) e com expressão clínica (CEC). Logaritmo do número de moléculas de RNA mensageiro de: A) IFN- γ , B) IL-12, C) IL-4, D) IL-10, E) TGF- β e F) TNF- α . * Grupo difere dos demais ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Kruskal-Wallis.137
GRÁFICO 14	Avaliação da expressão de citocinas em amostras de linfonodos cervicais superficiais dos cães do grupo controle não infectados (NI) e dos cães naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> dos grupos sem expressão clínica (SEC) e com expressão clínica (CEC). Logaritmo do número de moléculas de RNA mensageiro de: A) IFN- γ , B) IL-12, C) IL-4, D) IL-10, E) TGF- β e F) TNF- α . */†: Grupo difere dos demais ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Kruskal-Wallis.140
GRÁFICO 15	Avaliação da expressão de citocinas em amostras de medulas ósseas dos cães do grupo controle não infectados (NI) e dos cães naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> dos grupos sem expressão clínica (SEC) e com expressão clínica (CEC). Logaritmo do número de moléculas de RNA mensageiro de: A) IFN- γ , B) IL-12, C) IL-4, D) IL-10, E) TGF- β e F) TNF- α . * Grupo difere dos demais ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Kruskal-Wallis.143
GRÁFICO 16	Avaliação da expressão de citocinas em amostras de peles de orelha dos cães do grupo controle não infectados (NI) e dos cães naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> dos grupos sem expressão clínica (SEC) e com expressão clínica (CEC). Logaritmo do número de moléculas de RNA mensageiro de: A) IFN- γ , B) IL-12, C) IL-4, D) IL-10, E) TGF- β e F) TNF- α . */†: Grupo difere dos demais ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Kruskal-Wallis.145
GRÁFICO 17	Quantificação da carga parasitária em amostras de: A) baços, B) fígados, C) linfonodos cervicais superficiais, D) medulas ósseas e, E) peles de orelha, dos cães naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> dos grupos sem expressão clínica (SEC) e com expressão clínica (CEC). A quantificação foi realizada pela técnica de PCR em tempo real com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene de cópia única da DNA polimerase de <i>Leishmania chagasi</i> . *Grupo difere dos demais ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t não pareado.147
GRÁFICO 18	Comparação da carga parasitária, determinada pela técnica de PCR em tempo real com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene de cópia única da DNA polimerase de <i>Leishmania chagasi</i> , entre amostras de baço, fígado, linfonodo cervical superficial, medula óssea e pele de orelha, nos grupos de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> : A) sem expressão clínica (SEC) e, B) com expressão clínica (CEC). a, b, c: grupos marcados com letras minúsculas distintas, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t não pareado.148

GRÁFICO 19	Correlação entre a carga parasitária determinada pela imunoistoquímica e pela PCR em tempo real com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene de cópia única da DNA polimerase de <i>Leishmania chagasi</i> em amostras de: A) baço, B) fígado, C) linfonodo cervical superficial e D) pele de orelha dos cães naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> . Os resultados foram plotados individualmente para cada cão e a linha contínua ilustra os índices de correlação. Os índices de correlação de Pearson (r) e os valores p , para cada órgão, são mostrados nos respectivos gráficos.150
GRÁFICO 20	Correlação entre os títulos de IgG1 nos soros dos cães naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> e a carga parasitária determinada pela PCR em tempo real com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene de cópia única da DNA polimerase de <i>Leishmania chagasi</i> em amostras de: A) baço, B) fígado, C) linfonodo cervical superficial e D) medula óssea e E) pele de orelha dos cães. Os resultados foram plotados individualmente para cada cão e a linha contínua ilustra os índices de correlação positiva e negativa. Os índices de correlação de Pearson (r) e os valores p , para cada órgão, são mostrados nos gráficos.152
GRÁFICO 21	Correlação entre os títulos de IgG2 nos soros dos cães naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> e a carga parasitária determinada pela PCR em tempo real com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene de cópia única da DNA polimerase de <i>Leishmania chagasi</i> em amostras de: A) baço, B) fígado, C) linfonodo cervical superficial e D) medula óssea e E) pele de orelha dos cães. Os resultados foram plotados individualmente para cada cão e a linha contínua ilustra os índices de correlação positiva e negativa. Os índices de correlação de Pearson (r) e os valores p , para cada órgão, são mostrados nos gráficos.153
QUADRO 1	Valores hematológicos de referência do hemograma para cães segundo BISTNER et al. (2002).65
QUADRO 2	Valores bioquímicos de referência para cães segundo BISTNER et al. (2002).66
QUADRO 3	Critérios físico-químicos para urinas normais de cães segundo BISTNER et al. (2002).66
QUADRO 4	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR convencional e na PCR em tempo real para a amplificação dos cDNAs de β -actina e das citocinas de interesse. Os ciclos, as temperaturas de anelamento e os tempos de extensão se referem à PCR convencional.78
QUADRO 5	Concentração dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR em tempo real para a amplificação dos cDNAs de β -actina86

e das citocinas de interesse.

QUADRO 6	Inserto de β -actina, das citocinas estudadas e do gene da DNA polimerase de <i>Leishmania chagasi</i> com seus respectivos números de pares de bases.129
FIGURA 1	Mapa do vetor pCR [®] 2.1-TOPO. A seqüência representada mostra a região de clonagem, os sítios para enzimas de restrição e os sítios de ligação para os iniciadores M13 direto e reverso, utilizados no sequenciamento.80
FIGURA 2	Gel de poliacrilamida a 5%, corado pela prata, representativo da PCR convencional com os iniciadores LV1 e LV2 para o complexo <i>Leishmania donovani</i> , que amplificam um fragmento de 100pb. Canaletas 1-6: amostras de sangue colhidas em papel filtro dos cães do grupo controle não infectados; PM=padrão de massa molecular de 100 pb; BH46= 1ng de DNA de promastigotas de <i>L. chagasi</i> (MHOM/BR/1967/BH46); B=controle sem DNA; BP=papel sem DNA; CP=papel com sangue de cão positivo para <i>L. chagasi</i> e CN=papel com sangue de cão negativo.93
FIGURA 3	Reação imunoistoquímica em corte de pele de orelha de cão naturalmente infectado por <i>Leishmania chagasi</i> (440X). Inúmeras amastigotas imuno-marcadas podem ser observadas, como a destacada na ponta da seta.110
FIGURA 4	Gel de poliacrilamida a 5%, corado pela prata, representativo da amplificação por PCR convencional, dos cDNAs clonados de: β -actina (ACT), interleucina-10 (IL-10), interferon- γ (IFN- γ), interleucina-4 (IL-4), interleucina-12 (IL-12), fator de necrose tumoral (TNF- α) e fator de crescimento transformante (TGF- β) respectivamente, com os iniciadores específicos descritos no quadro 4. PM= padrão de massa molecular de 100 pares de bases.120
FIGURA 5	Gel de poliacrilamida a 5%, corado pela prata, representativo da amplificação por PCR convencional de 10^6 a 10^0 moléculas de DNA clonado do gene de cópia única da DNA polimerase de <i>Leishmania chagasi</i> com iniciadores específicos. Produtos de amplificação com 90pb. PM= padrão de massa molecular de 100 pares de bases.120
FIGURA 6	Resultado da análise de alinhamento da seqüência clonada de β -actina canina com seqüência depositada no banco de dados do GenBank utilizando o programa "Basic Local Alignment Search Tool Program for Nucleotides"- BLAST. Os oligonucleotídeos iniciadores, direto e reverso, estão sublinhados e em negrito.121

FIGURA 7	Resultado da análise de alinhamento da seqüência clonada de IFN- γ canino com seqüência depositada no banco de dados do GenBank utilizando o programa “Basic Local Alignment Search Tool Program for Nucleotides”- BLAST. Os oligonucleotídeos iniciadores, direto e reverso, estão sublinhados e em negrito.122
FIGURA 8	Resultado da análise de alinhamento da seqüência clonada de IL-12 canina com seqüência depositada no banco de dados do GenBank utilizando o programa “Basic Local Alignment Search Tool Program for Nucleotides”- BLAST. Os oligonucleotídeos iniciadores, direto e reverso, estão sublinhados e em negrito.123
FIGURA 9	Resultado da análise de alinhamento da seqüência clonada de IL-4 canina com seqüência depositada no banco de dados do GenBank utilizando o programa “Basic Local Alignment Search Tool Program for Nucleotides”- BLAST. Os oligonucleotídeos iniciadores, direto e reverso, estão sublinhados e em negrito.124
FIGURA 10	Resultado da análise de alinhamento da seqüência clonada de IL-10 canina com seqüência depositada no banco de dados do GenBank utilizando o programa “Basic Local Alignment Search Tool Program for Nucleotides”- BLAST. Os oligonucleotídeos iniciadores, direto e reverso, estão sublinhados e em negrito.125
FIGURA 11	Resultado da análise de alinhamento da seqüência clonada de TGF- β canino com seqüência depositada no banco de dados do GenBank utilizando o programa “Basic Local Alignment Search Tool Program for Nucleotides”- BLAST. Os oligonucleotídeos iniciadores, direto e reverso, estão sublinhados e em negrito.126
FIGURA 12	Resultado da análise de alinhamento da seqüência clonada de TNF- α canino com seqüência depositada no banco de dados do GenBank utilizando o programa “Basic Local Alignment Search Tool Program for Nucleotides”- BLAST. Os oligonucleotídeos iniciadores, direto e reverso, estão sublinhados e em negrito.127
FIGURA 13	Resultado da análise de alinhamento da seqüência clonada de <i>Leishmania infantum</i> (sin. <i>Leishmania chagasi</i>) com seqüência depositada no banco de dados do GenBank utilizando o programa “Basic Local Alignment Search Tool Program for Nucleotides”- BLAST. Os oligonucleotídeos iniciadores, direto e reverso, estão sublinhados e em negrito.128
FIGURA 14	Curva-padrão de β -actina construída a partir de amostras com concentrações conhecidas do fragmento do cDNA de β -actina canina ligado ao vetor, variando entre 10^9 a 10^1 moléculas. A) Figura do programa <i>Sequence Detection System</i> (SDS) representativa da plotagem do log das concentrações das amostras X Ct. B) Figura do programa SDS representativa da plotagem das amostras em seus respectivos poços X Ct.130

Lista de Tabelas

TABELA 1	Resultados dos testes sorológicos: RIFI e ELISA; parasitológicos: exame direto e cultura de material puncionado de medula óssea; e PCR específica para o complexo <i>Leishmania donovani</i> de sangue periférico dos cães controle não infectados e dos cães naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> sem expressão clínica (SEC) e com expressão clínica (CEC) da infecção.92
TABELA 2	Ocorrência dos sinais clínicos de leishmaniose visceral no grupo de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> com expressão clínica (CEC) da doença. Valores absolutos (n) e percentagens (%).97
TABELA 3	Média do peso relativo (peso órgão/peso cão) dos baços, fígados e linfonodos cervicais superficiais dos cães controles não infectados e dos cães naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> dos grupos sem e com expressão clínica.98
TABELA 4	Média dos valores hematológicos dos cães não infectados (NI) e naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> sem expressão clínica (SEC) e com expressão clínica (CEC). *grupos diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pela análise de variância.115
TABELA 5	Média dos valores bioquímicos dos cães não infectados (NI) e naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> sem (SEC) e com expressão clínica (CEC) da leishmaniose visceral. *grupos diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pela análise de variância.117

Lista de Abreviaturas e Siglas

ALT = Alanina aminotransferase

AST = Aspartato aminotransferase

BLAST = *Basic Local Alignment Search Tool Program for Nucleotides*

CCZ = Centro de Controle de Zoonoses

cDNA = DNA complementar

CEC = Com expressão clínica

CETEA = Comitê de Ética em Experimentação Animal

Ct = Ciclo *threshold*

DAB = Diaminobenzidina

DTT = *dithiothreitol*

EDTA = Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA = Ensaio imunoenzimático

FA = Fosfatase alcalina

g = Gravidade

HE = Hematoxilina e eosina

IL = Interleucina

IL-10R = Receptor para IL-10

IL-10^{-/-} = Geneticamente deficientes para IL-10

iNOS = Óxido nítrico sintase induzível

KDa = Kilodáton

LIT = *Liver infusion tryptose*

LV = Leishmaniose visceral

LVC = Leishmaniose visceral canina

L VH = Leishmaniose visceral humana

α MEM = *Minimum essential medium*

μ L = Microlitro

μ g = Micrograma

M = Molar

mL = Mililitro

mm = Milímetro

M-MLV = *Moloney murine leukemia Virus*
ng = Nanograma
NNN = Meio de cultura Novy, McNeal e Nicolle
OPD = *Orthophenylenediamine*
pb = Pares de base
PBS = Solução de fosfato tamponada
PCR = Reação em cadeia da polimerase
pmol = Picomol
q.s.p. = quantidade suficiente para
RNase = Ribonuclease
RIFI = Reação de Imunofluorescência Indireta
RT-PCR = Transcrição reversa- PCR
SDS = *Sequence Detection System*
SEC = Sem expressão clínica
SFM = Sistema fagocitário mononuclear
TBE = Tris-Borato-EDTA
TNF- α = Fator de necrose tumoral alfa
TGF- β = Fator de crescimento transformante beta
WHO = World Health Organization (OMS)

Sumário

1. INTRODUÇÃO	27
1.1. Leishmania e Leishmanioses	27
1.2. Leishmaniose Visceral Canina	32
1.3. Controle da Leishmaniose Visceral	34
1.4. Imunologia das Leishmanioses	37
2. JUSTIFICATIVA	48
3. OBJETIVOS	51
3.1. Objetivo Geral	51
3.2. Objetivos Específicos	51
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	54
4.1. Avaliação do Perfil de Citocinas em Cães Naturalmente Infectados por <i>L. chagasi</i>	54
5. MATERIAL E MÉTODOS	56
5.1. Animais	56
5.2. Acompanhamento dos Animais	57
5.2.1. Colheita e preparação de material para análise	58
5.2.1.1. Sangue e soro	58
5.2.1.2. Medula óssea	59
5.2.1.3. Urina	59
5.2.2. Exames sorológicos	60
5.2.2.1. Antígenos	60
5.2.2.2. RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta)	61
5.2.2.3. ELISA (Ensaio Imunoenzimático)	62
5.2.3. Exames parasitológicos	64
5.2.3.1. Esfregaço por extensão	64
5.2.3.2. Isolamento em cultura	64
5.2.4. Análises laboratoriais	65
5.2.4.1. Hemograma, análises bioquímicas e urinálise	65
5.3. Eutanásia	67
5.3.1. Colheita e preparação de material para análise	67
5.3.1.1. Pele da orelha	67
5.3.1.2. Fígado, baço e linfonodo cervical superficial	68
5.3.2. Histologia convencional	68
5.3.3. Imunoistoquímica – Técnica da estreptoavidina-peroxidase para detecção de formas amastigotas	69
5.3.4. PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	71
5.3.4.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida	72
5.4. Avaliação da expressão de mRNA de IFN-γ, IL-12, IL-10, IL-4, TGF-β, TNF-α e β-actina	73
5.4.1. RT-PCR (Transcrição Reversa- Reação em Cadeia da Polimerase)	74
5.4.1.1. Extração de RNA total	74
5.4.1.2. Transcrição Reversa	76
5.4.1.3. Amplificação dos produtos da transcrição reversa por PCR convencional	77
5.4.2. Clonagem dos produtos de amplificação	78
5.4.2.1. Purificação dos produtos de amplificação	78
5.4.2.2. Clonagem	79
5.4.2.3. Transformação	81
5.4.2.4. Purificação dos vetores por lise alcalina	81
5.4.3. Sequenciamento dos produtos clonados	82

5.4.4. PCR em tempo real	84
5.4.4.1. Construção de curvas-padrão para a PCR em tempo real	84
5.4.4.2. PCR em tempo real	85
5.5. Quantificação da carga parasitária por PCR em tempo real	87
5.5.1. Extração de DNA dos tecidos	88
5.6. Análise estatística	89
6. Resultados	91
6.1. Determinação dos grupos experimentais	91
6.2. Pesquisa de IgG e das subclasses IgG1 e IgG2 pela técnica de ELISA	93
6.2.1. Titulação de IgG1 e IgG2	94
6.3. Sinais clínicos de leishmaniose visceral encontrados no grupo de cães com expressão clínica	97
6.4. Histologia	98
6.4.1. Baço	99
6.4.2. Fígado	101
6.4.3. Linfonodo cervical superficial	103
6.4.4. Pele de orelha	105
6.5. Imunoistoquímica	107
6.5.1. Correlação: imunoistoquímica X subclasses de IgG	111
6.6. Hemograma, análise bioquímica e urinálise	114
6.7. Clonagem e sequenciamento	119
6.7.1. β -actina canina	121
6.7.2. Interferon- γ canino	122
6.7.3. Interleucina-12 canina	123
6.7.4. Interleucina-4 canina	124
6.7.5. Interleucina-10 canina	125
6.7.6. Fator de crescimento transformante- β canino	126
6.7.7. Fator de necrose tumoral- α canino	127
6.7.8. <i>Leishmania chagasi</i>	128
6.8. Construção das curvas-padrão	129
6.9. PCR em tempo real: Determinação do perfil de citocinas	131
6.9.1. Baços	133
6.9.2. Fígados	136
6.9.3. Linfonodos cervicais superficiais	138
6.9.4. Medulas ósseas	141
6.9.5. Peles de orelha	144
6.10. PCR em tempo real: Quantificação da carga parasitária	146
6.10.1. Correlação: imunoistoquímica X PCR em tempo real	149
6.10.2. Correlação: parasitismo X subclasses de IgG	151
7. DISCUSSÃO	155
7.1. Determinação dos grupos experimentais	155
7.2. Hematologia, função hepática e função renal	160
7.3. Pesquisa de IgG e das subclasses IgG1 e IgG2 pela técnica de ELISA	166
7.4. Quantificação da carga parasitária: Imunoistoquímica e PCR em tempo real	168
7.5. PCR em tempo real	172
7.5.1. Determinação do perfil de citocinas	174
8. CONCLUSÕES	183

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	187
ANEXO 1	200
ANEXO 2	201
ANEXO 3	202
ANEXO 4	203
ANEXO 5	205
ANEXO 6	206

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Leishmania* e Leishmanioses

As leishmanioses compreendem um espectro de doenças que atingem tanto humanos quanto animais, sendo largamente distribuídas em 88 países, em cinco continentes (WHO, 2008). Os agentes etiológicos das leishmanioses são espécies de protozoários intracelulares obrigatórios, pertencentes ao gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), à família Trypanosomatidae e à ordem Kinetoplastida.

Os hospedeiros mamíferos das espécies de *Leishmania* incluem animais, que vão desde roedores, edentatos, carnívoros até primatas. A transmissão da infecção, para esses hospedeiros, ocorre através da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) que estão amplamente distribuídas na natureza, nos mais diferentes nichos ecológicos (SHAW, 2003). As formas infectantes das leishmanias, que são transmitidas aos hospedeiros vertebrados pelos vetores, são as promastigotas metacíclicas. O parasito também apresenta as formas paramastigotas e promastigotas não metacíclicas que se multiplicam no trato digestivo dos vetores e as formas amastigotas que são parasitos obrigatórios das células do sistema fagocitário mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado.

Em todo o mundo, estima-se que a leishmaniose acometa cerca de 12 milhões de indivíduos. Aproximadamente dois milhões de novos indivíduos são infectados anualmente (WHO, 2008).

Em função da diversidade e complexidade biológica do parasito, dos vetores e dos hospedeiros, a leishmaniose apresenta um caráter espectral de manifestações clínicas. Dessa forma, é considerada, não uma doença simples e sim, um complexo de doenças. A WHO (2008) divide a leishmaniose em três formas clínicas distintas: cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV).

A forma cutânea da doença resulta da multiplicação do parasito em células do SFM da pele. No Novo Mundo é causada principalmente por *L. braziliensis*, mas *L. amazonensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis* também são encontradas parasitando o homem. No Velho Mundo, a principal espécie responsável pela LC é *L. major* (GRIMALDI & TESH, 1993). A LC normalmente é de evolução benigna. A lesão típica aparece, inicialmente, como uma pápula eritematosa no sítio da picada, que corresponde ao ponto de inoculação do parasito, evoluindo para uma úlcera que pode persistir por meses ou anos. A infecção crônica evolui, muitas vezes, para cura espontânea. A LC ainda pode se apresentar de modo difuso, quando as lesões características são nódulos não ulcerados, onde é verificada a presença de macrófagos intensamente parasitados e escassa resposta linfoproliferativa. Esta forma é causada normalmente pela espécie *L. aethiopica* no Velho Mundo e *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. venezuelensis*, no Novo Mundo. Neste caso, a infecção está associada a um quadro de anergia do hospedeiro, em relação ao parasito. Em vários casos, pacientes com esta forma clínica da doença são resistentes ao tratamento (ASHFORD, 2000).

A forma mucocutânea da doença é causada por espécies pertencentes ao complexo *braziliensis* como *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis*, além de outras espécies, em menor proporção. Nesta forma da doença, as mucosas das cavidades nasal e bucal são comprometidas, causando degeneração das cartilagens

e tecidos moles. Estas lesões são, normalmente, desfigurantes e não é incomum a morte do indivíduo devido a infecções bacterianas secundárias e a desnutrição. A forma mucocutânea tem como característica uma resposta imune intensa, com hipersensibilidade retardada e as células do SFM das mucosas são encontradas normalmente pouco parasitadas (TAVARES et al., 2003; CUNNINGHAM, 2002; ASHFORD, 2000).

A LV pode ser considerada a forma mais grave da doença, estando associada à elevada mortalidade, quando não tratada. Esta forma acomete cerca de 500.000 novos indivíduos a cada ano (ALVAR et al., 2006; WHO, 2008), sendo responsável por cerca de 59.000 óbitos anuais. Esta taxa de mortalidade só é superada, pelas mortes causadas por malária, no caso das doenças parasitárias (ALVAR et al., 2006; DESJEUX, 2004). Alguns autores acreditam que o número de óbitos anuais devido à LV é subestimado, uma vez, que a doença é de notificação compulsória apenas em 32 dos 88 países em que ocorre (DESJEUX, 2004).

A LV humana (LVH) também conhecida como Kala-Azar é causada por três espécies do complexo *Leishmania (Leishmania) donovani*: O agente etiológico *L. (Leishmania) donovani* (LAVERAN & MESNIL, 1903) é responsável pela doença na Índia, Paquistão, China Oriental, Bangladesh, Nepal, Sudão e Kênia. Nestas regiões, o homem atua como reservatório do parasito e a doença apresenta um perfil antroponótico (TAVARES et al., 2003). Já a espécie *L. (L.) infantum* (NICOLLE, 1908) é o agente etiológico da LV zoonótica presente na região sudoeste e central da Ásia, nordeste da China, norte da África e Europa Mediterrânea. No Novo Mundo, a espécie *L. (L.) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937) é o agente da LV que também apresenta um caráter zoonótico. Estudos utilizando técnicas bioquímicas e

moleculares consideram a *L. chagasi* e *L. infantum* como sendo uma única espécie (MAURÍCIO et al., 2000).

A espécie de flebotomíneo *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* é considerada a principal vetora de *L. chagasi*, no Novo Mundo, embora as espécies *L. evansi* (ZULUETA et al., 1999; TRAVI et al., 1990) e *L. cruzi* (DOS SANTOS et al., 1998) tenham sido implicadas como possíveis vetoras em áreas restritas. No Brasil, a espécie *L. cruzi*, foi recentemente incriminada como vetora no estado de Mato Grosso do Sul (ELKHOURY, 2005).

O principal reservatório doméstico de *L. chagasi* é o cão (*Canis familiaris*). No ambiente silvestre, os principais reservatórios são também canídeos, destacando-se as raposas *Cerdocyon thous* e *Lycalopex vetulus* (SHAW, 2003). Gambás – *Didelphis marsupialis* (CORREDOR et al., 1989; ZULUETA et al., 1999) e ratos – *Rattus rattus* (ZULUETA et al., 1999) foram encontrados naturalmente infectados por *L. chagasi*, sendo também incriminados como reservatórios silvestres da LV no Novo Mundo.

A *L. chagasi* é transmitida ao homem através da picada da fêmea de *L. longipalpis* infectada. A LVH é normalmente precedida por uma lesão seca ou ulcerada no local da picada (ASHFORD, 2000). Os sinais sistêmicos da doença, que são observados após a visceralização da infecção, são febre intermitente de longa duração, perda de peso, linfadenopatia, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia, leucopenia, hipergamaglobulinemia, edema e caquexia (TAVARES et al., 2003; ASHFORD, 2000). Caso a doença não seja devidamente tratada, pode evoluir para o óbito.

A LV constitui, na atualidade, um importante problema de saúde pública, sendo observada uma expansão da área de abrangência da infecção devido,

sobretudo a fatores demográficos e ecológicos (WHO, 2008). Na América do Sul, principalmente em países como Brasil, Venezuela e Colômbia, o êxodo rural e a urbanização crescentes têm grande contribuição para a expansão desta enfermidade (PROFETA DA LUZ et al., 2001; SILVA et al. 2001a). A maciça migração da população rural para os centros urbanos, que tem sido verificada nestes países, leva ao crescimento desordenado destes centros, que é acompanhado por sérios problemas sócio-econômicos. A falta de saneamento básico e as condições de pobreza, verificadas nos subúrbios das cidades, favorecem o estabelecimento do ciclo de transmissão do parasito nestas localidades. Os migrantes normalmente levam consigo cães, porcos e galinhas que são mantidos no peridomicílio, criando nestes ambientes condições propícias para a proliferação do vetor.

Neste contexto, o cão apresenta grande importância na manutenção do ciclo do parasito, por representar o principal reservatório doméstico de *L. chagasi*, estando a ocorrência da infecção humana, fortemente associada à LVC. A infecção canina geralmente precede o aparecimento de casos humanos, sendo ainda, mais prevalente que a doença humana (CAMPINO, 2003). Os cães preenchem as condições necessárias para serem reservatórios de *L. chagasi*, por serem altamente susceptíveis à infecção, por apresentarem intenso parasitismo cutâneo e também pelo seu convívio junto ao homem (DANTAS-TORRES et al., 2006).

1.2. Leishmaniose Visceral Canina

Os cães são considerados a parte mais vulnerável no ciclo de transmissão de *L. chagasi*. Estes animais, quando infectados, apresentam intenso parasitismo cutâneo, fato que os torna excelentes fontes de infecção para o vetor. A infecção, no entanto, não significa necessariamente doença ativa (MORENO et al., 2002).

No caso dos cães que desenvolvem a doença, ocorre uma depleção das regiões de células T dos seus órgãos linfóides, enquanto as zonas de células B destes órgãos proliferam. A excessiva proliferação de células B e macrófagos resulta em hepatomegalia, linfadenopatia generalizada e hipergamaglobulinemia (STRAUSS-AYALI et al., 2000). O aumento da produção de imunoglobulinas, no entanto, não conduz à proteção. Além disso, é potencialmente prejudicial para o animal. Um importante dano, que é causado pela hipergamaglobulinemia, é a produção de grande quantidade de imunocomplexos circulantes que, uma vez depositados na parede dos vasos sanguíneos, resulta em vasculites, poliartrites, uveítes e glomerulonefrites (LOPEZ et al., 1996). Estas manifestações são acompanhadas por alterações hematológicas e bioquímicas como anemia normocítica e normocrômica, trombocitopenia, leucopenia e aumento das proteínas totais do soro com inversão da taxa albumina/globulina. Eletroforese de proteínas revela um decréscimo significativo na concentração de albumina e um aumento combinado de β e γ globulinas (BURILLO et al., 1994; CAMPINO, 2003).

Os eventos sistêmicos descritos acima e seus mecanismos são também verificados na LVH. No entanto, na LVC é observada ainda, a ocorrência de manifestações clínicas específicas, como lesões na pele do animal, destacando-se

dermatite esfoliativa, alopecia, ulcerações cutâneas, sobretudo nas orelhas, focinho e ponta da cauda, onicogribose e hiperkeratose nasal e digital (ALVAR, 2004; CIARAMELLA et al., 1997).

Dessa forma, os primeiros sinais clínicos observados na LVC são a hipertrofia dos linfonodos poplíteos e a ocorrência de uma dermatite descamante periorbital e nasal, que se dissemina. O pêlo do animal torna-se opaco e inicia-se a alopecia, sendo acompanhada por onicogribose e edema das patas. Podem ainda ocorrer febre, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal e em casos mais graves, atrofia muscular com paresia das patas posteriores, anorexia, perda de peso e caquexia (REIS et al., 2006a).

Cerca de 50% dos animais, no entanto, mesmo na presença de infecção, não apresentam sinais clínicos da LVC (ALVAR et al., 2004; BANETH, 2006), tornando impossível o diagnóstico puramente clínico. Dessa forma, o diagnóstico da doença é complexo e deve se fundamentar em informações relativas ao estado clínico do animal, epidemiologia da área, achados parasitológicos, sorológicos e moleculares, sendo que todos os dados devem ser considerados em conjunto (ALVAR et al., 2004).

Um fator de particular importância na epidemiologia da LVC é que parte dos animais infectados, mesmo na ausência de manifestações clínicas da doença, apresenta parasitismo cutâneo, sendo potencialmente infectantes para o vetor (MORENO et al., 2002). Assim, os cães, como reservatórios domésticos da *L. chagasi*, apresentam importante participação para o controle da LV.

1.3. Controle da Leishmaniose Visceral

No Programa de Controle da LV, preconizado pelo Ministério da Saúde, a vigilância epidemiológica é um dos seus componentes, cujos objetivos são reduzir as taxas de letalidade e o grau de morbidade, além de combater o vetor e os reservatórios da doença.

Assim, as estratégias de controle, até então utilizadas, estão centradas e dirigidas verticalmente no diagnóstico e tratamento adequado dos casos humanos; controle do reservatório canino através de inquérito sorológico e eutanásia dos animais sororreagentes; bem como aplicação de inseticidas de ação residual para combate ao vetor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

A WHO recomenda a eutanásia dos cães portadores da infecção, apesar de ser pouco aceita, por questões éticas, emocionais e econômicas. Além disso, estudos, realizados em países onde a eutanásia é adotada como medida de controle, mostram resultados pouco satisfatórios (PALATINIK-DE-SOUSA et al., 2001; ASHFORD et al., 1998). Esta prática leva a diminuição da transmissão da LV na área de cobertura com duração apenas de médio prazo, sendo que algum tempo após sua interrupção, a incidência e a prevalência da infecção voltam a atingir os antigos níveis (MORENO et al., 2002).

Desta forma, a eutanásia dos cães infectados demonstra não ser uma forma efetiva de controle da LV, já que a grande maioria dos proprietários mostra-se resistente e os dados epidemiológicos indicam que não ocorre um declínio efetivo e duradouro da prevalência da infecção (DITZE et al., 1997).

A proporção de casos de humanos infectados, comparada aos casos caninos nos diferentes focos, é muito variável, embora, segundo o Ministério da

Saúde, a enzootia canina tenha sempre precedido a infecção no homem, apresentando prevalência mais elevada.

Do ponto de vista epidemiológico, a LVC é considerada, no Brasil, mais importante do que a doença humana. Entretanto, o processo de expansão geográfica e urbanização da LV têm levado à necessidade de se estabelecer medidas mais eficazes de controle (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

O tratamento humano há mais de 60 anos vem sendo realizado principalmente, com antimoniais pentavalente. O antimoniato de N-metil glucamina-Glucantime[®] e o estibogluconato de sódio-Pentostan[®] são os medicamentos de primeira escolha para o tratamento (BANETH et al., 2002). Estes medicamentos, no entanto, são tóxicos e nem sempre efetivos, sendo aplicados em esquemas prolongados. O mecanismo de ação dos antimoniais não está totalmente elucidado, mas, sabe-se que atuam nas formas amastigotas do parasito, inibindo sua atividade glicolítica e a via oxidativa dos ácidos graxos (LAMOTHE, 1999). Dados recentes indicam que a resistência aos antimoniais tem se tornado um problema na Índia e Sudão. No Brasil, ainda não existe documentação da presença de cepas de *L. chagasi* resistentes *in vitro* aos antimoniais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Entretanto, a atual perspectiva da quimioterapia da LV está mais promissora que há alguns anos atrás, com novas formulações de medicamentos sendo comercializadas. O desenvolvimento de anfotericina B encapsulada em lipossomas (AmBisome[®]) tem mostrado bons resultados, com cura de 90 a 95% dos casos de LVH na Índia. O miltefosine, uma droga desenvolvida como agente antitumoral, mostrou 95% de cura efetiva no calazar indiano (PRASAD et al., 2004).

No Brasil, como tratamento alternativo aos antimoniais, vem sendo utilizado o desoxicolato sódico de anfotericina B e suas formulações lipossomais

(anfotericina-B-lipossomal e anfotericina-B-dispersão coloidal), as pentamidinas (sulfato e mesilato) e os imunomoduladores (interferon gama e GM-CSF). Com exceção das duas primeiras drogas, as demais se encontram em fase de investigação. Todas elas só devem ser administradas em hospitais de referência (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Os cães domésticos com LV são tratados com os mesmos medicamentos utilizados na LVH. Os antimoniais pentavalentes são os medicamentos mais largamente utilizados, na atualidade, também no tratamento LVC. O tratamento de cães, no entanto, não é uma medida recomendada pela saúde pública para o controle da LV. O uso rotineiro de drogas anti-*Leishmania* em cães, induz a remissão temporária dos sinais clínicos, mas não previne a ocorrência de recidivas, por não levar a cura parasitológica, podendo acarretar duas sérias conseqüências epidemiológicas: o desenvolvimento de cepas com resistência às drogas e a recorrência do risco de transmissão (BANETH et al., 2002; MORENO et al., 2002).

Além dos antimoniais, o alopurinol (KOUTINAS et al., 2001), a anfotericina B e outros medicamentos como a aminosidina (VEXENAT et al., 1998), a pentamidina (RHALEM et al., 1999), as alkilfosfocolinas e alguns antifúngicos (BANETH et al., 2002) têm sido testados no tratamento da LVC. Nenhum deles, no entanto, mostrou-se capaz de promover a cura parasitológica dos animais, mostrando ação semelhante à dos antimoniais.

Neste contexto, o desenvolvimento de uma vacina para a LVC parece representar a principal ferramenta para o controle da infecção. A imunização bem sucedida de cães poderia significativamente reduzir a incidência da LVH. No entanto, embora existam abundantes informações sobre a imunologia da LV em humanos e no modelo murino, pouco se sabe sobre a resposta imune dos cães para *Leishmania*

(SANTOS-GOMES et al., 2002). O estudo dos aspectos imunológicos de cães infectados com *L. chagasi* é essencial para que possam ser feitas intervenções nestes mecanismos para auxiliarem o hospedeiro na eliminação do parasito.

1.4. Imunologia das Leishmanioses

Cães, infectados por *L. chagasi*, tendem a desenvolver acentuada resposta imune humoral caracterizada por uma hipergamaglobulinemia policlonal (FERRER et al., 1995) que, no entanto, não apresenta efeito protetor quanto à progressão da doença (LOPEZ et al., 1996). A elevada produção de IgG anti-*Leishmania*, embora não protetora, permite ampla utilização de técnicas sorológicas no diagnóstico da LVC (CANÁVATE et al., 2005). Os exames mais empregados são a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) (GRIMA, 2005).

Quatro subclasses de IgG anti-*Leishmania* (IgG1-IgG4) têm sido descritas em cães (MAZZA et al., 1993). Atualmente, alguns autores procuram associar a presença de determinado subtipo de IgG aos diferentes quadros clínicos de LVC, buscando assim, a determinação de marcadores sorológicos de proteção ou de progressão da doença. A discussão entre autores, sobre a presença de uma determinada subclasse e a conseqüente predisposição à manifestação ou não de sinais clínicos em cães infectados, é ainda controversa (BARBIÉRI, 2006). Enquanto, alguns autores associam a presença de sinais clínicos de LVC a altos níveis de IgG1 (DEPLAZES et al., 1995; QUINNELL et al., 2003; INIESTA et al.,

2005) outros relacionam o subtipo IgG2 a manifestação clínica da doença (LEANDRO et al., 2001; REIS et al., 2006b; COSTA-VAL et al., 2007).

Todos estes trabalhos, ao compararem as subclasses de IgG, utilizam os valores de absorvância obtidos em reações de ELISA para os soros dos cães em estudo. No entanto, as leituras de absorvância sofrem influências de algumas variáveis como a variação das concentrações de peroxidase em cada conjugado ou a temperatura e tempo de incubação em que cada etapa da reação se processa, não correspondendo a uma quantificação fidedigna da subclasse em estudo, não permitindo assim uma correta comparação entre estas subclasses.

A alta produção de imunoglobulinas na LVC é potencialmente danosa para os animais acometidos, sobretudo pela deposição de imunocomplexos em diferentes tecidos (LOPEZ et al., 1996).

A imunidade efetiva para *Leishmania sp.* é mediada por células e resulta na morte do parasito por macrófagos ativados. Em macrófagos, o óxido nítrico produzido a partir do precursor L-arginina, pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), é uma das mais importantes moléculas responsáveis pela morte do parasito, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (BOGDAN, 2001; SISTO et al., 2001).

Em humanos e especialmente em camundongos, caracterizou-se que a resistência à infecção está associada a uma resposta Th1 com a produção de citocinas IL-12, IFN- γ e TNF- α enquanto a suscetibilidade deve-se a uma resposta regulatória com a produção de IL-4, IL-10 e TGF- β (BARRAL et al., 1993; BOGDAN, 2001; KANE et al., 2001; MURRAY et al., 2002; TRINCHIERI et al., 2003; TRINCHIERI et al., 2007).

A IL-12 é uma citocina produzida por células do sistema fagocitário mononuclear e está implicada na indução da produção de IFN- γ (BRUNDA, 1994).

IFN- γ é produzido por células T, células dendríticas, macrófagos e células “natural killer” (NK) e tem a função de induzir a síntese de óxido nítrico, ativando funções microbidas (TRINCHIERI et al., 1993; REINER et al., 1995). Esta citocina limita o crescimento de *Leishmania sp.* em macrófagos murinos e humanos, limitando assim a progressão da doença (MURRAY et al., 1992). Nestes modelos, a modulação local ou sistêmica dos níveis de IFN- γ é um determinante crítico na resolução da infecção. Também foi constatado que o fator de necrose tumoral (TNF- α) que é produzido, sobretudo por macrófagos, além de células T e células NK, age juntamente com IFN- γ , induzindo a produção de óxido nítrico e conseqüentemente a morte de amastigotas no interior de macrófagos (LIEW et al., 1993).

A IL-4 produzida, sobretudo por linfócitos T, demonstrou sua ação moduladora do sistema imune em modelo murino, por regular a secreção ou os efeitos de proteção de citocinas específicas da resposta Th1 como IFN- γ e IL-12, sendo relacionada ao desenvolvimento de doença ativa neste modelo (MIRALLES et al., 1994).

Outras citocinas, assim como o IL-4, apresentam atividade imunorreguladora. O fator de crescimento transformador- β (TGF- β), produzido por várias células incluindo linfócitos B e T além de células NK e macrófagos ativados, suprime a capacidade microbida de macrófagos, inibindo sua capacidade de controle intracelular de crescimento do parasito (BARRAL et al., 1993).

Também em modelo murino e em humanos, estudos vêm demonstrando o efeito imunomodulador da IL-10 na leishmaniose. Esta citocina suprime muitas funções de células NK e de células T por inibir a apresentação de antígenos e a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IFN- γ . Muitos tipos celulares podem produzir IL-10 incluindo fagócitos, células dendríticas, células T e B e células

NK. IL-10 foi originalmente descrita como uma citocina produzida especificamente por células CD4⁺Th2, porém, estudos posteriores mostraram que IL-10 pode ser secretada tanto por células Th2 quanto Th1 (TRINCHIERI, 2007). Esta citocina também é produzida por células CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺ chamadas células T regulatórias naturais (nT_{reg}) e células regulatórias T induzíveis (iT_{reg}) (TRINCHIERI, 2007). As células T_{reg}, através da produção de citocinas moduladoras como IL-10 e TGF-β, limitam os danos teciduais causados por vigorosas respostas inflamatórias, mas também limitam a magnitude das respostas efectoras contra patógenos, resultando em falha no controle da infecção. Estas células vêm sendo objeto de estudo de alguns autores sobre a persistência de vários patógenos e de doenças autoimunes (BELKAID et al., 2005; O'GARRA et al., 2004.)

GASIM et al. (1998) constataram que durante a LV em humanos e camundongos causada por *L. donovani*, IFN-γ é amplamente produzido, mas, falha em controlar a infecção. Uma produção concomitante de IL-10 foi identificada. Esta citocina foi então, associada à progressão da doença por exercer um papel imunorregulador, inibindo os efeitos do IFN-γ e conseqüentemente a eliminação do parasito.

KANE et al. (2001), visando determinar o papel da IL-10 na progressão da leishmaniose, examinaram o desenvolvimento da lesão após infecção por *L. major* em camundongos BALB/c geneticamente deficientes para a produção de IL-10 (IL-10^{-/-}). Camundongos BALB/c normais são geneticamente susceptíveis à infecção por *L. major*. Neste estudo, os autores observaram que, enquanto os camundongos normais desenvolveram lesões progressivas que não se curaram no período de acompanhamento, apresentando elevada carga parasitária, os animais IL-10^{-/-} controlaram a progressão da lesão e a multiplicação do parasito. Ainda neste

estudo, em um ensaio realizado *in vitro*, a IL-10 produzida por macrófagos infectados inibiu a ativação dos macrófagos e diminuiu a produção de IL-12 e IFN- γ por estas células, prevenindo a morte dos parasitos.

BELKAID et al. (2001) também demonstraram que a IL-10 é requerida para a sobrevivência e persistência de *L. major*. Camundongos deficientes em IL-10 e camundongos tipo selvagem, tratados com anticorpo anti-receptor para IL-10, alcançaram imunidade estéril não apresentando risco de reativação da doença.

MURRAY et al. (2002) visando avaliar a importância da IL-10 na LV, trataram camundongos BALB/c infectados com *L. donovani*, com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor para IL-10 (IL-10R). Estes autores verificaram que o bloqueio deste receptor induzia a morte do parasito, e que em animais tratados inicialmente com anti-IL-10R e em seguida com antimônio, observaram que a atividade deste medicamento foi acentuada na ausência de IL-10. A demonstração de que anti-IL-10R foi ativa em associação com o antimônio, no tratamento da infecção murina, indica uma importante direção para testes de imunoquimioterapia.

A associação entre a progressão da leishmaniose e a produção de IL-10, também foi constatada em pacientes humanos. BORREAU et al. (2001) analisaram a expressão intralesional de citocinas em 65 pacientes com leishmaniose cutânea, antes do tratamento com isotionato de pentamidina. Neste estudo, observaram que a expressão local de IL-10 foi significativamente maior em pacientes que não responderam bem ao tratamento, do que em pacientes que apresentaram regressão da lesão após o tratamento.

GAMA et al. (2004) ao estudarem o perfil de citocinas em crianças do estado do Maranhão, Brasil, apresentando a forma subclínica da LV, verificaram a produção tanto de citocinas tipo Th1 (IFN- γ , IL-2 e IL-12) quanto de citocinas

regulatórias como IL-10 e TGF- β . A detecção de ambas citocinas explicaria a evolução da doença com discretas alterações, observada nesta fase, devido provavelmente a um equilíbrio exercido pelo efeito imunorregulatório da IL-10.

Os estudos que determinam o perfil de citocinas em cães com LVC apresentando as diferentes formas clínicas da doença são escassos e a participação da IL-10 na progressão da doença não está clara.

ANDRADE et al. (1999) demonstraram que a resposta linfoproliferativa para *Leishmania* foi detectada apenas em cães naturalmente infectados com *L. chagasi* apresentando as formas assintomática e oligossintomática da doença, não sendo evidenciada em cães sintomáticos. A produção de IFN- γ também foi detectada no sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico, apenas, de animais assintomáticos ou oligossintomáticos. Outras citocinas não foram estudadas neste experimento.

Em um estudo realizado por PINELLI et al. (1999), a expressão de RNA mensageiro de IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10 foi qualitativamente determinada em células mononucleares do sangue periférico de cães infectados com *L. infantum*. Verificou-se, em um animal sem sinais clínicos da infecção, a detecção da expressão de todas as citocinas avaliadas, enquanto que, em quatro animais que apresentaram sintomatologia da LVC, apenas a expressão de IL-4 ou IL-10 foi detectada, indicando uma possível participação destas citocinas no desenvolvimento de manifestações clínicas da doença.

No entanto, em trabalho realizado por QUINNELL et al. (2001), não foi constatado o papel imunossupressor da IL-10 na LVC. Cães naturalmente infectados por *L. chagasi* foram comparados com controles não infectados. Verificou-se maior expressão de IFN- γ nos cães infectados, sendo que, não foi observado aumento da

expressão de IL-4, IL-18 e IL-10 nestes animais, em relação aos animais não infectados.

Em estudo realizado por SANTOS-GOMES et al. (2002), com cães infectados experimentalmente com *L. infantum* resultados semelhantes aos de QUINNELL et al. (2001) foram verificados, não sendo possível estabelecer uma correlação entre a severidade da doença e a expressão de IL-10.

CHAMIZO et al. (2005) avaliaram de forma semi-quantitativa a expressão de citocinas em células mononucleares do sangue periférico de cães assintomáticos infectados experimentalmente com *L. infantum* comparados a cães controle não infectados. A expressão de TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-10 e IL-18 foi semelhante nos dois grupos. Apenas IL-4 foi detectada em níveis inferiores no grupo de cães assintomáticos. Para esta semi-quantificação, foi realizada a técnica da transcriptase reversa-PCR com iniciadores específicos para cada citocina e os produtos foram corridos em gel de agarose corado com brometo de etídeo. A intensidade dos sinais obtidos foi analisada em programa de computador, permitindo uma quantificação relativa.

CORRÊA et al. (2007) avaliaram de forma quantitativa a produção de IFN- γ , TGF- β e IL-10 em extratos de baço e fígado de cães assintomáticos e sintomáticos através de técnica de ELISA de captura. Neste trabalho, altos níveis de IL-10 foram encontrados em ambos os grupos de cães. TGF- β foi verificado em níveis mais elevados no grupo de cães assintomáticos. IFN- γ foi encontrado em níveis semelhantes nos dois grupos em estudo, porém em concentrações significativamente inferiores as de IL-10 e TGF- β . Este estudo mostrou-se particularmente interessante, uma vez que avaliou a produção de citocinas em órgãos de grande importância na infecção por *Leishmania chagasi*, já que a maioria

dos estudos até então realizados avaliaram a presença de citocinas, sobretudo em amostras de sangue periférico.

LIMA et al. (2007) também utilizando a técnica de ELISA de captura, dosaram IL-6 e TNF- α no soro de cães sintomáticos com infecção natural por *L. chagasi* e cães controle não infectados. TNF- α foi encontrada em níveis semelhantes nos cães dos dois grupos enquanto que IL-6 foi encontrada em níveis estatisticamente superiores em cães com LV ativa.

A técnica utilizada por CORRÊA et al. (2007) e LIMA et al. (2007), limita estudos mais abrangentes do perfil de citocinas em cães, sobretudo pela escassez de reagentes canino e elevado preço daqueles disponíveis.

LAGE et al. (2007) avaliaram de forma semi-quantitativa o perfil de citocinas em células de baço de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. Para isso, empregaram a técnica de RT-PCR, de forma semelhante à utilizada por CHAMIZO et al. (2005). Neste estudo, verificaram que não houve diferença significativa na expressão de IL-12, IL-4, IL-10, IFN- γ e TNF- α em cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Houve, no entanto, um acúmulo significativo de IL-10 em cães que apresentaram maior carga parasitária no baço, independente do grupo clínico a que pertenciam. Estes resultados sugeriram uma produção balanceada de citocinas Th1 e de citocinas regulatórias.

Em trabalho realizado por BRACHELENTE et al. (2005), foi pesquisada de forma quantitativa a expressão local de citocinas em biópsias parafinadas de pele de cães infectados com *L. infantum*. Para isso, foi realizada a técnica de PCR em tempo real utilizando como molde o cDNA produzido por RT-PCR a partir de RNA total extraído das biópsias de pele. Neste estudo, as biópsias dos cães infectados foram comparadas com material de cães normais e de cães apresentando flebite. Os

cães infectados não foram classificados clinicamente, sendo possível, apenas, a diferenciação do perfil de citocinas na pele destes animais em relação aos dois grupos controle. No grupo de cães naturalmente infectados, a expressão de IL-4, IFN- γ e TNF- α foi significativamente superior em relação aos grupos controles. Também se constatou que, cães com alta carga de amastigotas apresentaram níveis de expressão de IL-4 significativamente superiores aos demais cães em estudo. Outras citocinas não foram pesquisadas neste estudo.

A técnica de PCR em tempo real também foi utilizada na detecção e quantificação de *Leishmania* sp. em tecidos de camundongo (NICOLAS et al., 2002) e na quantificação de citocinas em hamster infectados (IÑIGUEZ et al., 2006). Também foi empregada no diagnóstico da infecção humana em diferentes materiais como sangue (MARY et al., 2004) e lesões de pele (WORTMANN et al., 2004). Nestes estudos, a PCR em tempo real mostrou-se mais sensível que o exame direto ou cultura do mesmo material. Esta técnica apresenta vantagens em relação a PCR convencional. Como não apresenta os vários passos de manipulação pós-amplificação requeridos pela técnica convencional, minimiza os riscos de contaminação do material, além de permitir de forma simultânea a detecção, medida e comparação do número de parasitos em diferentes amostras (VITALE et al., 2004; NICOLAS et al., 2002).

A PCR em tempo real também se mostrou mais sensível que a técnica de PCR convencional no diagnóstico e monitoração da infecção canina. FRANCINO et al. (2006) verificaram que enquanto a PCR convencional foi negativa para amostras que apresentaram menos que 30 parasitos por mililitro de sangue periférico ou medula óssea, a PCR em tempo real apresentou sensibilidade de 0,001 parasitos, semelhante aos resultados encontrados por MARRY et al. (2004) em humanos. Esta

sensibilidade elevada é de particular importância no acompanhamento da infecção canina, uma vez que, uma importante característica da doença no cão é a presença de parasitos residuais ou latentes após o tratamento. A abordagem quantitativa é importante não somente para elucidar o “status” de positividade de cães em áreas endêmicas, mas também para monitorar o número de parasitos no pós-tratamento ou em triagens de quimioterápicos (FRANCINO et al., 2006).

MANNA et al. (2006) utilizaram a PCR em tempo real para determinar o perfil de citocinas em amostras de sangue periférico de 40 cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Estes cães eram no início do estudo assintomáticos, sendo que 20 deles permaneceram assim nos dois anos de acompanhamento do estudo, enquanto 20 evoluíram para a manifestação da doença. Estes autores verificaram que no período de acompanhamento, os cães que permaneceram assintomáticos tiveram predomínio da expressão de citocinas do tipo Th1, enquanto que aqueles que desenvolveram sinais clínicos expressaram, sobretudo, citocinas regulatórias.

Os estudos do perfil de citocinas em cães, realizados até então, não avaliam a resposta imune celular de forma compartimentalizada. A maioria deles é realizada em amostras de sangue periférico, não sendo possível avaliar a resposta celular nos órgãos implicados na infecção e comparar estas respostas.

Dessa forma, verifica-se que os estudos das diferenças no perfil de citocinas em diferentes órgãos de cães apresentando as formas assintomática, oligossintomática ou sintomática da LVC são inconclusivos, uma vez que, os resultados encontrados até então são contraditórios. A realização de estudos mais elaborados se faz necessária para a obtenção de informações que possam ser utilizadas no desenvolvimento de vacinas, bem como imunoterápicos.

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

A leishmaniose visceral é, na atualidade, um importante problema de saúde pública em vários países, incluindo o Brasil. O controle desta enfermidade, que se apresenta como uma zoonose se faz necessário, uma vez que, os cães são o principal reservatório doméstico do parasito. No entanto, nenhuma medida eficaz de controle vem sendo adotada. Os tratamentos, dos animais infectados não promovem a erradicação do parasito e o sacrifício dos mesmos não leva à eliminação efetiva e duradoura do ciclo de transmissão.

Os aspectos da resposta imune dos cães na infecção natural por *L. chagasi* são pouco conhecidos. Os trabalhos até então realizados não são conclusivos, uma vez que revelam somente uma descrição parcial da resposta imune celular na infecção canina e não refletem necessariamente o que ocorre nos órgãos afetados. Pouco se sabe sobre o perfil de citocinas que é expresso nas diferentes formas clínicas da doença. A determinação deste perfil, assim como da participação da IL-10 na progressão da doença seria de grande utilidade na confecção de vacinas, que poderiam acentuar a expressão de citocinas relacionadas à resistência à infecção ou bloquear a expressão de citocinas relacionadas à progressão da doença. Esta abordagem poderia também, ser utilizada para melhorar o desempenho dos atuais medicamentos que são utilizados no tratamento da LVC e que se mostram ineficazes em promover a cura efetiva da infecção.

A utilização de técnicas que permitam a monitorização da carga parasitária em diferentes órgãos de cães infectados também se faz necessária, já que o

conhecimento quantitativo do grau de parasitismo nestes animais pode estar relacionado ao prognóstico da doença.

Desta forma, torna-se importante a realização de estudo detalhado da expressão de citocinas em diferentes órgãos, na infecção natural de cães por *L. chagasi*, com diferentes formas clínicas da doença.

Acredita-se que cães, com expressão clínica bem definida da doença, apresentam parasitismo tecidual mais elevado e um perfil de produção de citocinas, em resposta a infecção, distintos dos cães sem manifestações clínicas de leishmaniose visceral. Assim, para este estudo, foram selecionados grupos de animais bem definidos clinicamente, apresentando formas polares da doença, para tentar comprovar esta hipótese.

Os termos *assintomático* e *sintomático* usados rotineiramente na literatura, para descreverem cães sem expressão clínica da infecção e cães que expressam clinicamente a infecção, respectivamente, não serão adotados neste estudo, visto serem considerados inadequados.

Como é descrito no dicionário médico da *United States National Library of Medicine*, o termo sintoma significa: “evidência subjetiva de doença ou desordem física **observada pelo paciente**”, enquanto o termo sinal significa “uma evidência objetiva de doença ou desordem física, **observada e interpretada pelo clínico**”.

Tendo em vista estes conceitos, o termo sintoma não se aplica a animais, conseqüentemente, não sendo consideradas apropriadas, suas derivações *assintomático* e *sintomático* quando utilizadas para cães.

Dessa forma, para referência a estes dois grupos distintos, será adotada, ao longo do trabalho, a terminologia: **sem expressão clínica** e **com expressão clínica** da infecção.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- ✓ Avaliar o perfil de citocinas e quantificar a carga parasitária em diferentes órgãos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, com e sem expressão clínica da leishmaniose visceral, através da reação em cadeia da polimerase em tempo real.

3.2. Objetivos Específicos

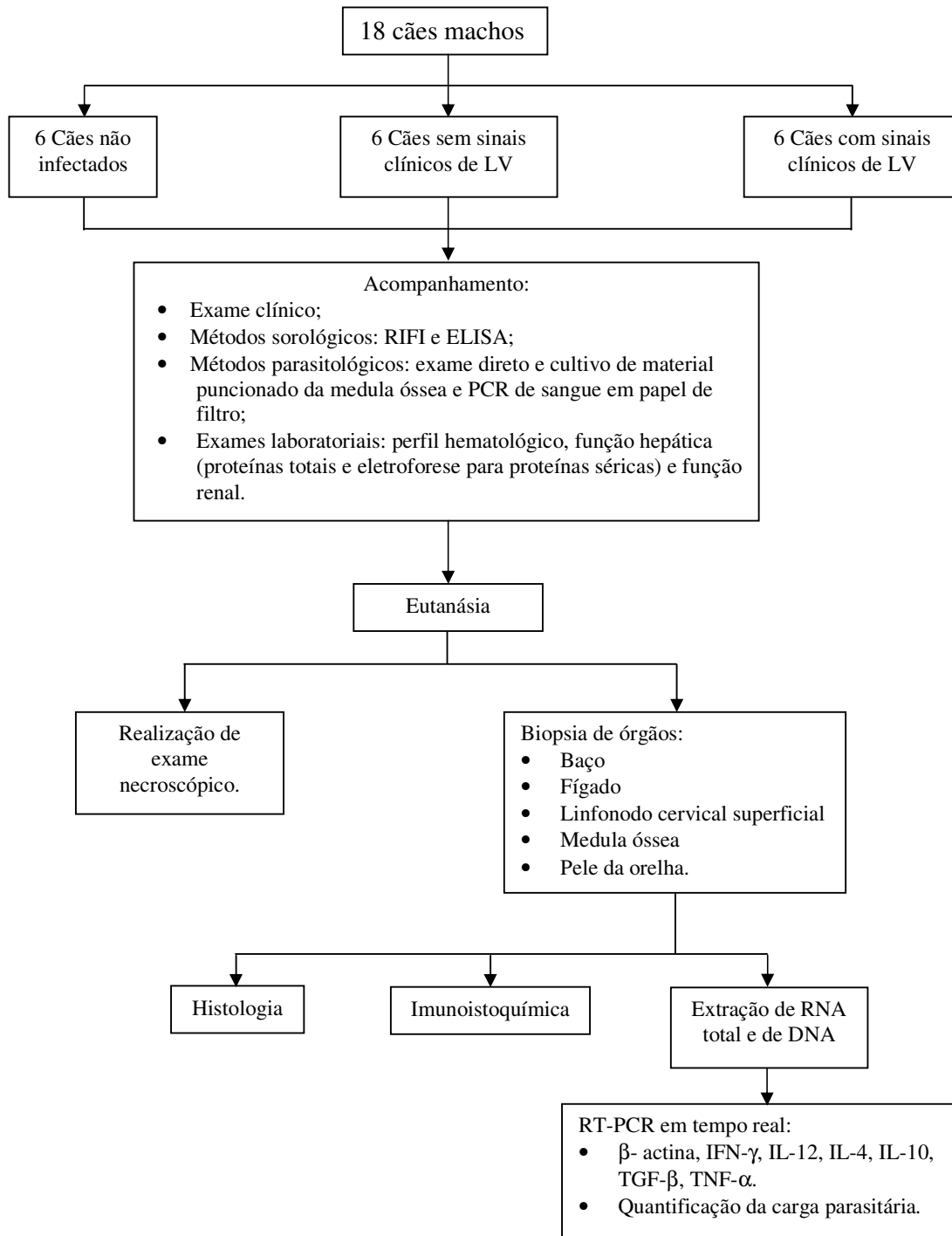
- ✓ Determinar a expressão de IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-10, TGF- β e TNF- α no baço, fígado, linfonodo cervical superficial, medula óssea e pele de orelha de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* e de cães controle não infectados;
- ✓ Comparar a expressão de IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-10, TGF- β e TNF- α no baço, fígado, linfonodo cervical superficial, medula óssea e pele de orelha entre os cães controle não infectados e os cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, apresentando expressão clínica da leishmaniose visceral e cães que não apresentam expressão clínica da doença;

- ✓ Determinar o parasitismo no baço, fígado, linfonodo cervical superficial, medula óssea e pele de orelha de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, com e sem expressão clínica de leishmaniose visceral, pelas técnicas de PCR em tempo real e de imunohistoquímica;
- ✓ Determinar as principais alterações histopatológicas no baço, fígado, linfonodo cervical superficial e pele de orelha de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, com e sem expressão clínica de leishmaniose visceral;
- ✓ Avaliar a produção de imunoglobulinas da classe IgG e das subclasses IgG1 e IgG2 nos soros dos cães controle não infectados e dos cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, com e sem expressão clínica de leishmaniose visceral;
- ✓ Comparar os títulos das subclasses IgG1 e de IgG2 entre os cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, com e sem expressão clínica de leishmaniose visceral;
- ✓ Avaliar a associação entre os títulos das subclasses de imunoglobulinas IgG1 e IgG2 e o “status” clínico dos cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*.

Delineamento Experimental

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.1. Avaliação do Perfil de Citocinas em Cães Naturalmente Infectados por *L. chagasi*



Material e Métodos

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

Dezoito cães machos, sem raça definida, pesando entre 6kg e 18kg, destinados à eutanásia, foram obtidos no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Prefeitura Municipal de Santa Luzia, MG. Esses animais foram diagnosticados para leishmaniose através dos métodos sorológicos e parasitológicos descritos no item 5.2, e submetidos a exame clínico completo. Os animais foram divididos em três grupos experimentais:

- um grupo formado por seis cães livres de infecção por *L. chagasi*;
- um segundo grupo com seis cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, sem expressão clínica da doença;
- e um terceiro grupo com seis animais também naturalmente infectados por *L. chagasi*, com expressão clínica da doença.

Foram utilizados cães machos para a uniformidade das amostras. Esses animais foram mantidos em canis coletivos com tela à prova de flebotomíneos e receberam água e ração comercial “ad libitum”, durante o período de acompanhamento.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA, UFMG), processo N°. 121/04 (ANEXO 1).

5.2. Acompanhamento dos Animais

A confirmação da infecção natural por *L. chagasi* foi realizada por métodos sorológicos e parasitológicos.

Os métodos sorológicos utilizados foram a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para a pesquisa de imunoglobulinas IgG anti-*Leishmania* e o ELISA (Ensaio imunoenzimático) para a detecção de imunoglobulinas da classe IgG e das subclasses IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania*.

Para todas as reações sorológicas, foram utilizados antígenos preparados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* cepa MHOM/BR/1967/BH46.

O diagnóstico parasitológico foi realizado em material obtido de punção medular, pelo exame direto de esfregaço por extensão, corado pelo método panótico rápido (Bioclin, Brasil) e cultivo em meio de cultura bifásico NNN (Novy, McNeal e Nicolle) enriquecido com meio α MEM (Minimum Essential Medium, Gibco, EUA).

Para os animais que tiveram os exames sorológicos e parasitológicos negativos, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) de sangue colhido em papel de filtro FTA[®] (Dialab Diagnósticos, Brasil) para a confirmação da ausência do DNA de parasito.

Nos testes parasitológicos, os resultados foram expressos de forma qualitativa (positivo ou negativo).

Os cães foram submetidos a exame clínico detalhado e os dados foram anotados em fichas individuais (ANEXO 2). Aqueles cães com infecção por *L. chagasi* comprovada pelos testes sorológicos e parasitológicos foram divididos em grupos com formas polares da doença: um grupo sem nenhum sinal clínico (SEC) e outro com expressão clínica (CEC) bem definida da doença. Os sinais clínicos

pesquisados para a classificação clínica dos cães foram: linfadenopatia local ou generalizada, alopecia local ou generalizada, hiperkeratose, onicogrifose, dermatite, perda de peso, úlceras na pele e lesões oculares.

O perfil hematológico, de todos os animais, foi obtido pela realização de hemograma completo e contagem de plaquetas.

A função hepática foi avaliada por meio da realização de proteinograma que compreendeu a determinação das concentrações de albumina e globulina além da determinação das concentrações séricas de fosfatase alcalina (FA), de alanina amino transferase (ALT), aspartato amino transferase (AST) e bilirrubina total.

A função renal foi avaliada pelas determinações séricas de uréia e de creatinina e ainda pela realização de urinálise completa.

Os protocolos das técnicas citadas aqui estão detalhadamente descritos nos sub-ítem seguintes.

5.2.1. Colheita e preparação de material para análise

5.2.1.1. Sangue e soro

Durante o período de acompanhamento, que foi o tempo suficiente para a realização dos exames preliminares, amostras de sangue de cada animal foram colhidas por punção da veia jugular, em frascos com anticoagulante (EDTA- Ácido Etilenodiaminotetracético) de capacidade de 9mL (Monovet, Sarsted, Alemanha), para realização do hemograma completo. Em seguida, outra amostra foi colhida em frasco sem anticoagulante (Monovet, Sarsted, Alemanha) de nove mililitros de capacidade para realização dos testes bioquímicos e para os testes sorológicos. O soro foi obtido após centrifugação destas amostras a 200g por 10min. Após a

separação do soro, o mesmo foi dividido em alíquotas de um mililitros em tubos de microcentrífuga de 1,5mL de capacidade, que foram congeladas a -20°C até o momento da execução dos testes.

5.2.1.2. Medula óssea

A punção de medula óssea foi realizada com os animais sedados. Os animais foram contidos, sedados e pré-anestesiados com cloridrato de xilazina (1mg/kg) (Vetbrands, Brasil), cloridrato de cetamina (10mg/kg) (Agener, Brasil) e diazepam (1mL/10kg) (Hipolabor, Brasil) por via intramuscular. Foi feita a depilação total da região do joelho dianteiro direito dos cães com máquina de tosa e lâmina 40 (Oster, EUA). A área depilada foi então, submetida a procedimentos assépticos de preparação cirúrgica. Uma agulha de 40 gauges, acoplada a uma seringa de 10mL foi introduzida na tíbia flexionada do animal, seguindo-se a aspiração da medula óssea. Parte do material obtido por aspiração foi colocada em meio de cultura NNN/ α MEM e uma gota foi utilizada para confeccionar um esfregaço por extensão. Aproximadamente 250 μ L, do material puncionado da medula óssea, foram acondicionados em tubo de microcentrífuga de 1,5mL, em gelo e em seguida, processados para a extração do RNA total, para a determinação do perfil de citocinas neste órgão.

5.2.1.3. Urina

Foi realizada a limpeza do prepúcio do cão com gaze umedecida com solução fisiológica, estando o animal sedado e em decúbito lateral. Uma sonda de calibre adequado ao tamanho do cão (Sanobiol, Brasil) foi então introduzida pela

uretra, até a obtenção da urina, recolhida em frasco próprio para a análise (Monovet, Sarsted, Alemanha).

5.2.2. Exames sorológicos

5.2.2.1. Antígenos

Todos os antígenos foram produzidos a partir de formas promastigotas de *L. chagasi*, cepa MHOM/BR/1967/BH46, já rotineiramente utilizados no Laboratório de Sorologia de *Leishmania* do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG.

Antígeno para reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Os parasitos foram mantidos em fase logarítmica de crescimento em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*). Após três dias de cultivo, os parasitos foram fixados em formalina a 5% por 30 minutos e em seguida lavados em PBS pH 7,4, por centrifugação a 250g por 10min a 4°C (Hermle Z323K, Alemanha). O sedimento foi ressuspenso na mesma solução e submetido à novas centrifugações por três vezes, para lavagem dos parasitos. O sedimento final foi ressuspenso em PBS e uma gota foi colocada em lâmina, sob lamínula (24 X 24mm) para contagem de promastigotas. Após a determinação de 16 a 32 promastigotas por campo de microscópio ótico em objetiva de 40X, 10µL da suspensão foram colocados em cada local delimitado de uma lâmina própria para imunofluorescência, que foi secada com o auxílio de um ventilador. Por fim, as lâminas foram embrulhadas em papel absorvente, revestidas com papel alumínio e conservadas a -20°C até o momento do uso.

Antígeno para ensaio imunoenzimático (ELISA)

Após cinco dias de cultivo em meio LIT, as promastigotas em fase logarítmica de crescimento, foram lavadas três vezes em PBS pH 7,4 por centrifugação a 250g por 10min a 4°C (Hermle Z323K, Alemanha). Em seguida, foram ressuspensas em PBS e submetidas à ruptura por ultra-som a 25 hertz por 45s, cinco vezes (BRANSON 1510[®], Branson Ultrasonics Co., EUA). A concentração de proteína deste antígeno foi dosada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). O antígeno foi então, alíquotado e armazenado a -20°C até o momento do uso.

5.2.2.2. RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta)

Os soros dos cães em estudo foram submetidos à reação de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos IgG segundo a técnica descrita por Camargo (1966), com as seguintes modificações:

Para a obtenção do título, os soros a serem testados foram diluídos na razão dois, a partir de 1:40 até 1:640, em PBS. Foram colocados 25µL da solução obtida sobre cada região demarcada de uma lâmina fixada com o antígeno. Após a incubação das lâminas em câmara úmida por 30 min em estufa a 37°C, estas foram lavadas e cobertas com PBS por 5 min, lavadas em água destilada e secadas sob ventilação artificial. Em seguida, em cada região demarcada da lâmina foram acrescentados 25µL do conjugado diluído a seu título em azul de Evans (EVANS BLUE[®], Sigma Aldrich, EUA) a 1:5000, sendo o azul de Evans previamente preparado em PBS Tween 80 (Tween[®] 80, Merck, Alemanha) a 2%. Este conjugado (Bethyl Lab. Inc., EUA), marcado com isotiocianato de fluoresceína é específico anti-IgG de cão. Após a adição do conjugado, as lâminas foram incubadas por 30 min, à 37°C, seguindo-se lavagem e secagem. A lâmina foi, então, coberta com glicerina

tamponada e lamínula, e a leitura procedida em microscópio de luz ultravioleta (Olympus BX41, Japão).

Soros conhecidamente positivos e negativos foram usados na mesma lâmina como controles da reação. As soluções para a execução da técnica de RIFI foram preparadas como descrito no ANEXO 3.

5.2.2.3. ELISA (Ensaio Imunoenzimático)

A detecção de anticorpos IgG e das frações IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania* pelo método ELISA nos soros dos cães em estudo, foi realizada segundo técnica de VOLLER et al. (1979), com modificações.

Foram utilizados os conjugados anti-IgG de cão obtido a partir de soro imune de coelho (Sigma/EUA) no título de 1/10000; anti-IgG1 de cão obtido de soro imune de cabra (Bethyl/EUA) foi utilizado no título 1/5000 e anti-IgG2 de cão, obtido a partir de soro imune de ovelha (Bethyl/EUA) no título de 1/25000, sendo todos marcados com Peroxidase VI. Estes títulos foram determinados por DE AMORIM (2007).

As reações foram realizadas em microplacas de polietileno (Falcon®, BD Lab., EUA) de 96 orifícios e fundo plano. Cada orifício foi sensibilizado com 2µg do antígeno diluído em 100µL de tampão carbonato. As placas foram, em seguida, incubadas por 24h a 4°C. Após a sensibilização, o excesso de antígeno foi lavado com solução de lavagem. Foram adicionados 150µL por orifício de solução para bloqueio de sítios inespecíficos, seguindo-se de incubação por 30 min a 37°C. O excesso de solução de bloqueio foi retirado por duas lavagens sucessivas. Os soros dos animais em estudo foram diluídos em tampão de incubação e 100µL dessa solução foram aplicados em cada orifício. Em seguida, foi realizada uma incubação

por 45 min a 37°C e retirado o excesso do soro diluído por uma série de cinco lavagens. O conjugado foi diluído a seu título e 100µL, desta diluição, acrescentados em cada orifício. Após nova incubação por 45 min a 37°C, o excesso de conjugado foi retirado por nova série de cinco lavagens. A solução do substrato foi então preparada e 100µL acrescentados em cada orifício. O cromógeno utilizado foi o *orthophenylenediamine* (OPD, Sigma Aldrich, EUA). A reação ocorreu por 10min em temperatura ambiente e no escuro, quando então foi interrompida pela adição de 25µL de H₂SO₄ 4N (Merck, Alemanha), por orifício. Em todas as etapas, após cada lavagem, as placas foram secadas por inversão sobre papel absorvente.

Para cada placa, o ponto de corte “cut off” foi estabelecido a partir da média das leituras de absorbância de oito soros de cães não infectados procedentes de região não endêmica da doença, mais duas vezes o desvio padrão.

Para a pesquisa de IgG total, foram realizadas reações em duplicatas de todos os soros na diluição de 1:400, sendo considerados positivos todos aqueles que apresentaram valores de absorbância superiores ao “cut off”. Já para a pesquisa de IgG1 e IgG2 os soros de todos os animais em estudo foram diluídos sucessivamente na razão de 1 para 2 a partir da diluição de 1:100 até 1:819200. Para cada diluição foram realizadas reações em duplicata. O título, ou seja, a maior diluição de cada soro que apresentou reatividade (absorbância acima do “cut off”), de cada soro foi selecionado e plotado em gráficos de dispersão para comparação dos títulos de IgG1 e IgG2.

As reações foram lidas em leitor de ELISA (BioRad modelo 550, Brasil) a 495nm e os resultados expressos em valores de absorbância. As soluções para a execução da técnica foram preparadas como descrito no ANEXO 4.

5.2.3. Exames parasitológicos

5.2.3.1. Esfregaço por extensão

O esfregaço por extensão foi realizado da seguinte forma: uma gota de material puncionado de medula óssea foi depositada em lâminas de vidro (Invicta, Brasil) limpas e desengorduradas e o esfregaço obtido por extensão com outra lâmina. Em seguida, os esfregaços foram corados pelo método panótico rápido. Brevemente, as lâminas foram submergidas durante 20s, sob discreta agitação, na solução fixadora (Triarilmetano 0,1%). Foram então escorridas e submergidas por 20s sob agitação na solução de corante básico (xantenos 0,1%) e escorridas. Por fim, foram submergidas também por 20s sob agitação na solução de corante ácido (tiazinas 0,1%) e em seguida lavadas em água corrente e secadas à temperatura ambiente, estando prontas para o exame direto ao microscópio ótico sob objetiva de imersão.

5.2.3.2. Isolamento em cultura

Parte das amostras, obtidas na punção de medula óssea de todos os animais, foi semeada em duplicata em meio de cultura bifásico NNN (Novy, McNeal e Nicolle) enriquecido com meio α MEM (Minumum Essential Medium, Gibco, EUA) e mantidos a $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ em estufa biológica (FANEM, Brasil). A cada dez dias, todas as culturas foram examinadas para avaliação da presença de formas promastigotas do parasito e aquelas negativas foram repicadas por até três vezes e examinadas em intervalos de 10 dias.

5.2.4. Análises laboratoriais

5.2.4.1. Hemograma, análises bioquímicas e urinálise

Os valores de referência utilizados para a avaliação dos resultados dos hemogramas, das análises bioquímicas e urinálise foram àqueles descritos por BISTNER et al. (2002), e são apresentados nos QUADROS 1, 2 e 3. Todos estes testes foram realizados no laboratório TECSA Diagnósticos Pet. Os materiais coletados foram imediatamente enviados para o laboratório para o processamento.

QUADRO 1

Valores hematológicos de referência do hemograma para cães segundo BISTNER et al. (2002).

Parâmetro (unidade)	Valores normais para cães
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5,5-8,5
Hemoglobina (g/dL)	12-18
Hematócrito (%)	37-55
Leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	5,5-16,5
Neutrófilos segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	3,5-12,5
Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1,5-5,0
Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,1-1,2
Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,1-1,2
Plaquetas ($\times 10^5/\mu\text{L}$)	1,5-5,0

QUADRO 2

Valores bioquímicos de referência para cães segundo BISTNER et al. (2002).

Parâmetro (unidade)	Valores normais para cães
ALT (UI/L)	10-88
AST (UI/L)	10-88
Fosfatase alcalina (UI/l)	10-80
Bilirrubina total (mg/dL)	0,1-0,6
Proteínas totais (g/dL)	5,30-7,80
Albumina (g%)	2,3-3,8
Globulinas (g%)	2,3-5,2
Creatinina (mg/dL)	0,5-1,5
Uréia (mg/dL)	10-25

QUADRO 3

Critérios físico-químicos para urinas normais de cães segundo BISTNER et al. (2002).

Parâmetros	Características normais para cães
Coloração	Amarela
Aspecto	Límpido/ discretamente turvo
Densidade	>1.015
pH	5,0-7,5
Hemoglobina	Ausente
Proteína	Ausente
Bilirrubina	Ausente
Urobilinogênio	Ausente
Cetonas	Ausentes
Nitrito	Ausente
Glicose	Ausente

5.3. Eutanásia

Após os exames iniciais, os cães dos três grupos experimentais foram contidos, sedados e pré-anestesiados com cloridrato de xilazina (1mg/kg) (Vetbrands, Brasil), cloridrato de cetamina (10mg/kg) (Agener, Brasil) e diazepam (1mL/10kg) (Hipolabor, Brasil) por via intramuscular. Em seguida, todos os animais foram eutanasiados por aplicação de Tiopental Sódico (Laboratório Cristália, Brasil) diluído a 2,5%, em quantidade suficiente para a obtenção de parada cardíaca e respiratória.

Em cada animal, foi realizado exame necroscópico, sendo todas as observações anotadas em fichas individuais. O baço, fígado, linfonodo cervical superficial foram pesados e fragmentos destes órgãos e de pele de orelha foram colhidos. Parte destes materiais coletados foi processada em seguida, para a extração do RNA total, e outra parte fixada em formol tamponado para realização de estudos histológico e imunoistoquímico.

5.3.1. Colheita e preparação de material para análise

5.3.1.1. Pele da orelha

Após a eutanásia, fragmentos de pele de orelha foram coletados com bisturi, limpos em papel de filtro para a retirada do excesso de sangue e fixados em formalina tamponada a 10% para estudos histológicos e imunoistoquímicos.

Um fragmento de pele de orelha foi pesado e 30mg foram acondicionados em tubo de microcentrífuga de 1,5mL, em gelo e imediatamente processados para

extração de RNA total, utilizado para a determinação do perfil de citocinas. Outros três fragmentos de mesmo peso foram estocados em freezer a -80°C para a realização da extração de DNA para a quantificação da carga parasitária e se necessário, para repetir algum experimento.

5.3.1.2. Fígado, baço e linfonodo cervical superficial

Imediatamente após a eutanásia, foram coletados dos animais, de forma asséptica, fragmentos de 30mg do fígado, baço e linfonodo cervical superficial que foram acondicionados em tubos de microcentrífuga de 1,5mL, em gelo. Estes fragmentos foram, em seguida, processados para a extração do RNA total para a avaliação da expressão do mRNA das citocinas de interesse. Fragmentos de mesmo peso foram estocados a -80°C para a realização da extração de DNA para a quantificação da carga parasitária e se necessário, para repetir algum experimento.

Outros fragmentos destes órgãos foram coletados, limpados em papel filtro para a retirada do excesso de sangue e fixados em formalina tamponada a 10% para estudos histológicos e imunoistoquímicos.

5.3.2. Histologia convencional

Fragmentos de órgãos obtidos durante a necropsia foram fixados em formalina tamponada e posteriormente submetidos às preparações rotineiras para análise histológica com coloração pela hematoxilina-eosina: os cortes foram hidratados, diafanizados, submetidos aos corantes hematoxilina e eosina, desidratados, montados em bálsamo e estudados morfológicamente em microscópio ótico.

As alterações histopatológicas avaliadas foram as seguintes:

- Baço: espessamento e inflamação da cápsula, hiperplasia e hipertrofia da polpa branca e da polpa vermelha, congestão, deposição de hemossiderina e depleção de áreas T dependentes na polpa branca;
- Fígado: presença de granulomas, inflamação portal, fenômenos degenerativos, inflamação da cápsula, congestão sinusoidal, hipertrofia e hiperplasia das células de Küpffer e deposição de hemossiderina.
- Linfonodo cervical superficial: linfadenite capsular, inflamação dos seios subcapsulares, hiperplasia e hipertrofia dos nódulos linfóides e dos macrófagos, congestão e presença de hemossiderina.
- Pele de orelha: processo inflamatório plasmohistiolinfocitário, acantose, hiperqueratose, pérolas córneas, paraceratose, fenômenos degenerativos.

Todas as alterações histopatológicas foram avaliadas de forma semi-quantitativa, levando-se em consideração a extensão das alterações em todo o corte histológico, sendo assim classificadas:

- (1) Ausência de alteração;
- (2) Alteração discreta;
- (3) Alteração moderada;
- (4) Alteração intensa.

5.3.3. Imunoistoquímica - Técnica da estreptoavidina-peroxidase para detecção de formas amastigotas

Fragmentos de tecidos foram também submetidos à técnica de imunoistoquímica, para a visualização e contagem das formas amastigotas. Utilizou-se a técnica segundo TAFURI et al. (2004).

As lâminas, contendo cortes parafinados de tecidos, foram desparafinadas em xilol por 20min, hidratadas em solução de álcoois decrescentes (álcool absoluto,

90°, 80° e 70° respectivamente) e submetidas a um banho em PBS (Solução de Tampão Fosfato - pH 7,2, 0,01M) a 10%. Em seguida, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena adicionando-se ao banho de PBS, peróxido de hidrogênio (30 volumes diluídos a 4% em PBS), por 30min à temperatura ambiente. As lâminas foram cobertas com solução de bloqueio (12g de leite em pó desnatado diluído em 200mL PBS) e incubadas em câmara úmida por 30 min à temperatura ambiente. Logo após, o anticorpo primário (soro de cão infectado com *L. chagasi*, na diluição de 1/100 em BSA-soro albumina) foi adicionado em quantidade suficiente para recobrir os fragmentos, sendo as lâminas incubadas por 18 a 24 horas em câmara úmida a 4°C. Adicionou-se então o anticorpo secundário biotilado (anti-soro de coelho biotilado anti-camundongo IgG1) na diluição de 1/100 (DAKO- LSAB 2 System, Peroxidase- K0675), sendo as lâminas novamente incubadas em câmara úmida por 30min à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se o complexo estreptoavidina peroxidase, e incubou-se por 30min em câmara úmida à temperatura ambiente. A reação foi revelada utilizando-se solução de Diaminobenzina (DAB) a 0,024% em PBS, acrescida de solução de peróxido de hidrogênio 40 volumes a 0,16% em PBS, por 5min à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e foi realizada uma contra-coloração com Hematoxilina de Harris. As lâminas foram então desidratadas em álcoois crescentes, diafanizadas em xilol e montadas com bálsamo do Canadá.

Para cada bateria de 20 lâminas, utilizou-se um controle negativo e um positivo. Como controle negativo, foi utilizado soro de cão normal na diluição de 1:100 em PBS, em substituição aos anticorpos primários. Como controle positivo foi utilizada uma lâmina com corte histológico de baço de um cão naturalmente infectado.

Para a quantificação do parasitismo nos órgãos investigados foram examinados 20 campos com objetiva de 40X e o número de amastigotas encontrados em cada lâmina foi anotado em fichas individuais.

5.3.4. PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Para os animais que apresentaram resultados negativos no exame direto e na cultura de material puncionado de medula óssea, foi realizada PCR de sangue periférico, coletado em papel de filtro (FTA Cards, Dialab, Brasil), segundo a técnica descrita por SILVA et al. (2004) com modificações:

Amostras de sangue, dos animais em estudo, obtidas por punção da veia jugular sem anticoagulante, foram distribuídas em papel filtro e secadas naturalmente à temperatura ambiente. Estes papéis foram então processados para a remoção de contaminantes enzimáticos e citotóxicos. Uma porção do papel de filtro, contendo sangue de cada animal, foi removida com “punch” de três milímetros de diâmetro e colocada em tubo de microcentrífuga de 1,5mL. Adicionou-se 200µL de reagente para lise de células heme (Dialab, Brasil). O tubo foi agitado em vórtex e deixado em repouso à temperatura ambiente durante 5min. O sobrenadante foi então descartado e esta operação repetida mais duas vezes. O papel foi então lavado com 200µL de tampão TE 1X (Tris-HCl 10mM pH 8,0 e EDTA 1mM pH 8,0) agitado em vórtex e deixado em repouso por 5 min. O sobrenadante foi descartado e este procedimento repetido mais duas vezes.

Após a realização deste protocolo, o DNA presente nas amostras estava fixado no papel de filtro e pronto para ser utilizado na PCR.

Os controles de cada reação foram constituídos por sangue de cão sabidamente positivo e sangue de cão sabidamente negativo para LV, proveniente de área não endêmica coletados em papel filtro, além de 1ng de DNA extraído de cultura de *L. chagasi*, cepa MHOM/BR/1967/BH46. Foram utilizados iniciadores específicos para o kDNA de espécies do complexo *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani*, que amplificam um fragmento de 100 pares de bases (pb) (PIARROUX et al., 1993).

As reações foram realizadas em um volume final de 10µL contendo um fragmento de papel de filtro com DNA, 50mM de KCl, 0,2mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs) (Promega, EUA), 1,5mM de MgCl₂, 10mM de Tris-HCl pH 8,3, 1U de Taq DNA polimerase (Centro de Biotecnologia-CENBIOT, RS, Brasil) e 10pmoles de cada iniciador: LV1(5' ACGAGGTCAGCTCCACTCC 3') e LV2 (5'CTGCAACGCCTGTGTCTACG 3') (PIARROUX et al., 1993).

As reações foram feitas em um termociclador PTC-100 (MJ Research, EUA) sendo as condições ótimas para a amplificação do DNA as seguintes: desnaturação inicial a 96°C por 5min, seguida por 35 ciclos consistindo em desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 59°C por 30s, extensão a 72°C por 30s, e extensão final a 72°C por 2min (PIARROUX et al., 1993).

Evitou-se a contaminação da reação pelo uso de diferentes ambientes para o processamento das amostras, amplificação e análise dos produtos amplificados, além dos processos rotineiros de descontaminação das áreas de trabalho.

5.3.4.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos amplificados pela PCR foram analisados por eletroforese em géis de poliacrilamida não desnaturante na concentração de 5%, corados pelo

nitrato de prata (SAMBROOK et al., 1982). Um marcador de massa molecular de 100pb (Promega, EUA) foi utilizado, sendo consideradas positivas as amostras que apresentaram bandas de 100pb.

Uma alíquota de três microlitros do produto de amplificação, diluída em mesmo volume de tampão da amostra 2X (0,5% de azul de bromofenol, 0,5% de Xileno-cianol, 60% de glicerol), foi aplicada em cada canaleta. A corrida eletroforética foi realizada a 80-100volts cerca de três horas, com migração de dois centímetros do corante.

Após a eletroforese, os géis foram transferidos para a solução fixadora (etanol absoluto 10%, ácido acético 0,5%) durante 10min e revelados pela coloração com 0,1% de nitrato de prata diluído em solução fixadora por 10min sob agitação lenta. Posteriormente, foram lavados em água destilada, seguido da redução dos sais de prata com 3% (p/v) de hidróxido de sódio e 0,3% de formaldeído a 37%, até a visualização das bandas. Quando completa, a revelação foi interrompida com a solução fixadora e os géis fotografados para documentação.

5.4. Avaliação da expressão de mRNA de IFN- γ , IL-12, IL-10, IL-4, TGF- β , TNF- α e β -actina

A expressão de RNA mensageiro que codifica para IFN- γ , IL-12, IL-10, IL-4, TGF- β , TNF- α e β -actina foi avaliada pela técnica de RT-PCR em tempo real (MURTA et al, 2006). Esta expressão foi determinada em amostras de baço, fígado,

linfonodo cervical superficial, medula óssea e pele de orelha de todos os cães dos três grupos experimentais.

5.4.1. RT-PCR (Transcrição Reversa- Reação em Cadeia da Polimerase)

A técnica de RT-PCR foi realizada para obtenção de cDNA a partir de RNAm. O cDNA foi utilizado como molde na técnica de PCR em tempo real com o objetivo de determinar o perfil de expressão das citocinas de interesse, nos diferentes órgãos dos animais dos três grupos experimentais.

O gene da β -actina de cão foi utilizado para verificar a integridade dos cDNAs, além de ser utilizado como normalizador das reações para padronizar as concentrações iniciais de cDNA de todas as amostras, uma vez que, é expresso de forma constitutiva em todas as células. Para a realização da RT-PCR, inicialmente, foi realizada a extração do RNA total dos tecidos coletados.

5.4.1.1 Extração de RNA total

A extração de RNA total de baço, fígado, linfonodo cervical superficial, medula óssea e pele de orelha foi realizada com o kit *SV total RNA Isolation System* (Promega, EUA) seguindo as orientações do fabricante.

Para isso, 30mg de tecido foram homogeneizados com 175 μ L de *RNA Lysis Buffer*, com auxílio de pistilo, em tubo de microcentrífuga de 1,5mL de capacidade. Ao lisado obtido, foram adicionados 350 μ L de *RNA Dilution Buffer* e as amostras foram incubadas a 70°C por 3min, seguindo centrifugação a 13000g por 10min. Os sobrenadantes contendo o RNA total foram transferidos para novo tubo

de microcentrífuga contendo 200 μ L de etanol 95% (Merk, Alemanha). Após homogeneização, as amostras foram transferidas para uma coluna de filtração e foram centrifugadas a 13000g por 1min. O RNA total retido no filtro foi lavado com 600 μ L de *RNA Wash Solution*. Após centrifugação a 13000g por 1min, foi adicionado diretamente sobre as membranas das colunas de filtração o mix de DNase contendo: 40 μ L de *Yellow Core Buffer*, 5 μ L de $MnCl_2$ 0,09M e 5 μ L de *DNase I enzyme*, seguindo incubação por 15min a 25°C. Foram então adicionados 200 μ L de *DNase Stop Solution* sobre as membranas e as amostras foram centrifugadas a 13000g por 1min. Mais uma vez, as membranas foram lavadas com 600 μ L de *RNA Wash Solution* e centrifugadas a 13000g por 1min. As colunas foram então transferidas para novos tubos de microcentrífuga e o RNA total foi eluído com 100 μ L de água livre de nucleases, com centrifugação a 13000 por 1min.

O RNA total obtido de todas as amostras foi dosado em espectrofotômetro GeneQuant RNA/DNA Calculator (Biochrom, RU) a 260 e 280nm, estando as amostras diluídas a 1:200, e as concentrações de RNA total em μ g/ μ L foram determinadas. Estas amostras foram aliquotadas e estocadas a -70°C, até o momento da realização da transcrição reversa do RNAm.

Para a verificação da integridade do RNA total extraído, 3 μ L de cada amostra foram aplicados em gel de agarose 1%, contendo 10% de MOPS (3-[N-Morpholino] propanesulfonic acid) (Sigma-Aldrich, EUA) 10X e 20% de formaldeído 12,3M. As cubas utilizadas na corrida do gel foram tratadas por duas horas em NaOH 0,1M e toda a vidraria foi submetida a 350°C em forno elétrico para eliminação de contaminantes com RNases (SAMBROOK et al., 1982).

Antes da transcrição reversa, as amostras de RNA foram submetidas à ação da enzima RQ1 RNase-free DNase (Promega, EUA). Esta reação foi realizada para

um volume final de 10 μ L contendo 1 μ L de RNA, 1 μ L de tampão RQ1 10X, 1 μ L de enzima e 7 μ L de água livre de nucleases. A reação foi incubada a 37°C por 30min, quando foi interrompida pela adição de 1 μ L de solução de parada e incubação a 65°C por 10min.

Após este tratamento o RNA total foi submetido à transcrição reversa.

5.4.1.2. Transcrição Reversa

A transcrição reversa para a síntese do cDNA a partir do RNAm foi realizada segundo GERARD et al. (1997), com modificações.

Foram utilizados para cada reação os seguintes reagentes: 2 μ g de RNA total, dNTPs numa concentração final de 10mM, 4 μ L de M-MLV RT tampão 5X (Invitrogen, EUA), 2 μ L de dithiothreitol (DTT) 100mM (Promega, EUA), 8unidades de RNAsin inhibitor (Promega, EUA), 0,5 μ g de iniciadores oligo dT (Promega, EUA), 200unidades de transcriptase reversa M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Vírus*, Invitrogen, EUA). As etapas para a transcrição foram: 5 min a 37°C, 60min a 42°C, 20min a 70°C e por último, 5min a 4°C. Os produtos finais desta reação foram diluídos para 60 μ L de água livre de nucleases. O cDNA diluído foi utilizado como molde da PCR em tempo real, empregando iniciadores específicos para cada citocina em estudo.

O cDNA obtido a partir de RNA extraído do baço de um cão escolhido aleatoriamente, foi utilizado para a realização de PCR convencional para cada citocina de interesse. Este procedimento foi necessário para a obtenção de material para clonagem e posterior construção de curvas-padrão da PCR em tempo real.

5.4.1.3. Amplificação dos produtos da transcrição reversa por PCR convencional

Para o ajuste das reações de PCR, para cada citocina de interesse, foram feitas reações-piloto que permitiram a determinação das concentrações ótimas dos reagentes e das condições adequadas de reação que propiciassem melhores resultados.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram obtidos a partir das seqüências das citocinas em estudo depositadas no *GenBank*, com o auxílio do programa *Primer Express* (Applied Biosystems, EUA).

As reações, para cada citocina em estudo, foram realizadas para um volume final de 10µL contendo 1,0µL de cDNA diluído, 10pmol de cada iniciador, 0,2mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs) (Promega, EUA), 1,5mM de MgCl₂, 1,0µL de tampão 10X e 0,25 unidades de Ampli Taq Gold (Applied Biosystems, EUA).

As reações foram realizadas em um termociclador PTC-100 (MJ Research, EUA).

Foi realizada uma desnaturação inicial por 3min a 95°C. As demais desnaturações foram a 94°C por 1min. As temperaturas de anelamento com os iniciadores variaram para cada citocina em estudo e estão listadas no QUADRO 4. O tempo de anelamento foi de 1min para todas as citocinas. A extensão foi realizada a 72°C com duração que variou para cada citocina. O número de ciclos para cada reação está descrito no QUADRO 4. Foi realizada uma extensão final de 7min a 72°C para todas as reações. Os produtos da PCR foram revelados em gel de poliacrilamida a 5%, corado pela prata (SAMBROOK et al., 1982).

QUADRO 4

Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR convencional e na PCR em tempo real para a amplificação dos cDNAs de β -actina e das citocinas de interesse. Os ciclos, as temperaturas de anelamento e os tempos de extensão se referem à PCR convencional.

Alvo	Iniciadores	Ciclos	Temperatura anelamento (°C)	Tempo de extensão	Produto (pb)
β -actina	5'CTTCTACAACGAGCTGCGCG 3' 5'TCATGAGGTAGTCGGTCAGG 3'	30	54	1min e 30s	307
IFN- γ	5'GGAAGACATGCTTGGCAAGTTC 3' 5'GGTGAGAGATCATTTCATCACTTTGA 3'	35	57	30s	147
IL-12	5'ACCTGCAGCTGAAGCCATTG 3' 5'GTCTTGTCCACGCAGAGTCT 3'	35	55	1min	163
IL-4	5'CCTCACAGCGAGAAACGACTC 3' 5'CAGTACAGTAGCAGCTCT 3'	35	56	30s	111
IL-10	5'ACCACGACCCAGACATCAAGA 3' 5'CCTGGAGCTTACTAAATGCGCT 3'	35	55	30s	153
TGF- β	5'AGTTAAAAGCGGAGCAGCATGTGG 3' 5'GATCCTTGCGGAAGTCAATGTAGAGC 3'	35	54	2min	438
TNF- α	5'GCCGCAGTACAGTAGCAGCTCT 3' 5'GTTGACCTTTGTCTGGTAGGAGACGG 3'	35	55	1min e 30s	367

5.4.2. Clonagem dos produtos de amplificação

Os produtos de amplificação, obtidos a partir da PCR convencional com a utilização de iniciadores específicos para cada citocina, foram clonados e seqüenciados para a obtenção dos padrões necessários para a técnica de PCR em tempo real.

5.4.2.1. Purificação dos produtos de amplificação

Antes da clonagem, os produtos de amplificação foram purificados para a remoção de impurezas ou produtos indesejáveis. Para isso, foram realizadas reações de PCR convencional como descrito no item 5.4.1.3, em um volume final de

100µL. Todo o produto final de cada reação foi aplicado em um gel de agarose a 1,5% (SAMBROOK et al., 1982). As bandas de interesse foram cortadas de cada gel com lâminas de bisturi estéreis e transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5mL.

A purificação foi realizada com o kit Wizard[®] PCR Preps DNA Purification System (Promega, EUA), seguindo as recomendações do fabricante, com algumas modificações. Dessa forma, 1mL de resina de purificação foi adicionado ao tubo de microcentrífuga de 1,5mL, contendo a banda cortada do gel de agarose que foi agitado até que toda a agarose fosse dissolvida e então transferida para um banho-maria a 50°C durante 10min. A solução foi então passada por uma minicoluna que reteve o DNA ligado à resina. Para eliminação de impurezas, o filtro foi lavado três vezes com isopropanol 80% (Merck, Alemanha), sendo então, acoplado a um tubo de microcentrífuga e centrifugado três vezes a 12000g por 5min, para a retirada do excesso de isopropanol. O filtro foi transferido para uma estufa a 37°C durante 20min para sua completa secagem. Para a eluição do DNA aderido à resina, ao filtro acoplado a um novo tubo de microcentrífuga, foram adicionados 40µL de água livre de nucleases, à 50°C. O filtro foi deixado em repouso durante 5min e em seguida foi centrifugado à 12000g durante 10min. Foi feito um gel de agarose 1,5% com 0,5µL de cada produto de purificação para verificar a qualidade do processo.

5.4.2.2. Clonagem

Os produtos da PCR de cada citocina, depois de purificados, foram clonados utilizando-se o kit TOPO TA Cloning[®] (Invitrogen, RU). Para isto, 4µL do produto de amplificação foram misturados a 1µL do vetor *pCR[®]2.1-TOPO* e 1µL da

solução salina. A mistura ficou em repouso durante 20min a 25°C, quando então foi colocada em gelo.

A FIG. 1 mostra o mapa deste vetor, com sua região de clonagem, sítios de enzimas de restrição e sítios de ligação para os iniciadores M13.

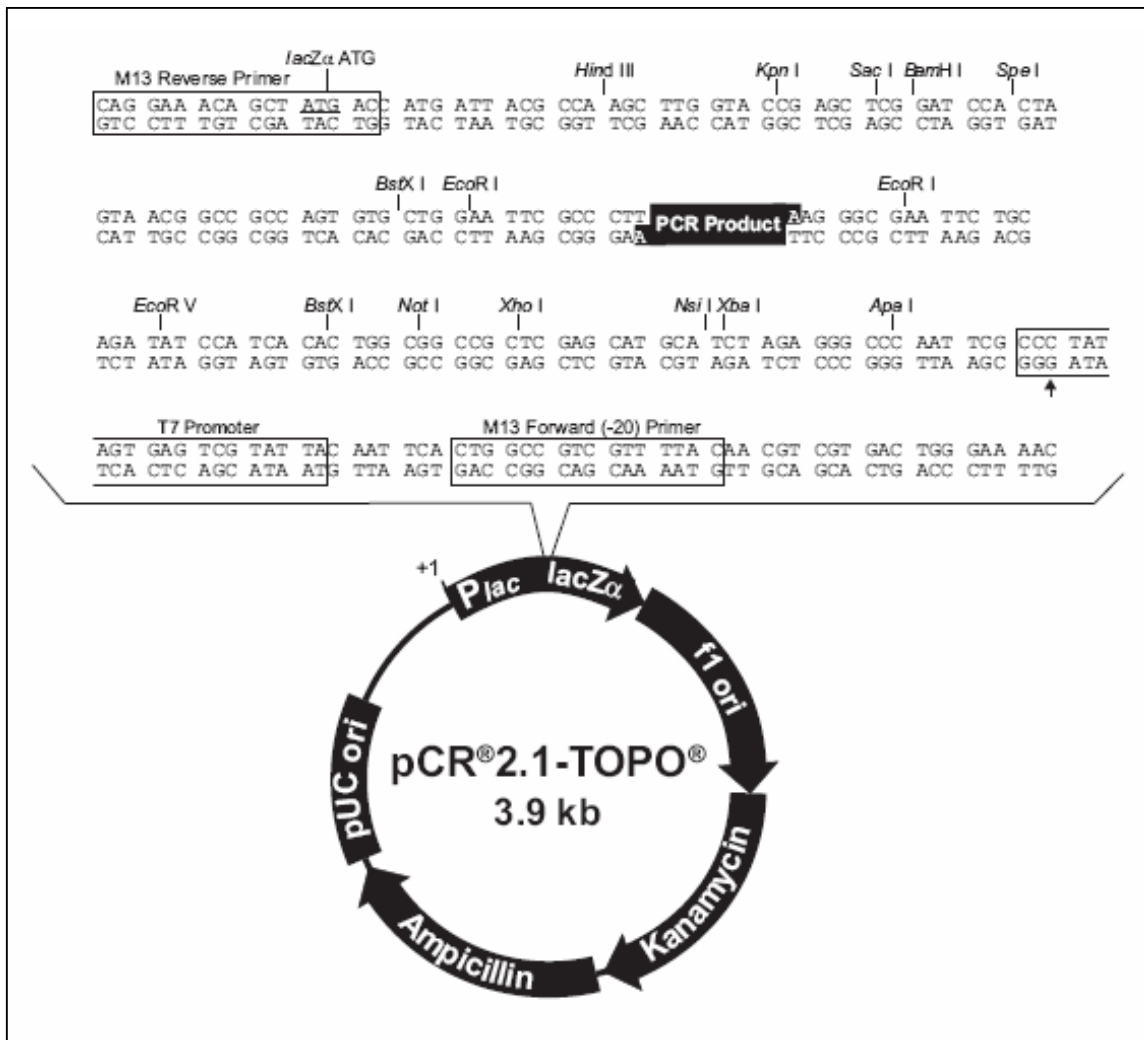


FIGURA 1- Mapa do vetor pCR®2.1-TOPO. A sequência representada mostra a região de clonagem, os sítios para enzimas de restrição e os sítios de ligação para os iniciadores M13 direto e reverso, utilizados no sequenciamento.

5.4.2.3. Transformação

Após a ligação ao vetor, foi realizada uma transformação em bactérias por eletroporação. Utilizou-se o eletroporador Micro Pulser™ (BioRad, EUA), com um programa que consiste em um único pulso com uma voltagem de 2,5KV, em uma cubeta de 0,2mm.

Para a transformação, uma alíquota de 100µL de bactérias TOPO10 foi retirada do freezer a -80°C . Depois de descongeladas, as bactérias foram cuidadosamente misturadas a 2µL do inserto ligado ao vetor. Após incubação por 5min em gelo, esta suspensão foi transferida para a cubeta, que foi imediatamente colocada no eletroporador. Após o pulso, 1mL de meio LB caldo (ANEXO 5) foi adicionado à cubeta e toda a suspensão foi cuidadosamente transferida para um tubo de 1,5mL que ficou incubado a 37°C durante uma hora. Após o período de incubação, 200µL e 100µL da suspensão de bactérias foram plaqueados em duas placa contendo 20mL de agar LB, acrescido de 20µL de ampicilina 100mg/mL. Estas placas foram incubadas em estufa BOD, a 37°C durante toda a noite.

No dia seguinte, foram selecionadas, aleatoriamente, oito colônias de cada placa. Estas colônias foram “pescadas” com palitos estéreis e transferidas para tubos de centrífuga de 45mL contendo 10mL de meio LB caldo e 10µL de ampicilina 100mg/mL. Estes tubos foram incubados a 37°C , sob agitação, durante a noite. No dia seguinte, os vetores foram purificados.

5.4.2.4. Purificação dos vetores por lise alcalina

A purificação dos vetores foi realizada segundo o método de lise alcalina-SDS (SAMBROOK et al., 1982).

Os tubos, após o período de incubação, foram centrifugados a 10000g durante 5min e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspensionado em 300µL da Solução de purificação I (ANEXO 6) e transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5mL. Foram adicionados 300µL da solução II (ANEXO 6) e o tubo agitado e mantido a temperatura ambiente durante 5min. Foram adicionados então, 300µL da solução III (ANEXO 6) e o tubo foi agitado e mantido no gelo por 5min. A amostra foi centrifugada a 12000g por 5min e o sobrenadante foi transferido para outro tubo de microcentrífuga de 1,5mL. Ao sobrenadante foram adicionados 500µL de etanol 100%. Esta solução foi misturada e deixada em repouso durante 15min à temperatura ambiente. O tubo foi centrifugado a 12000g durante 20min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1mL de etanol 70%. O etanol foi descartado, o tubo foi deixado aberto à temperatura ambiente para secar e o vetor foi ressuspensionado em 50µL de água livre de nucleases. Esta solução foi tratada com RNase na concentração de 50µg/mL, 30min à 37°C.

Para comprovar a presença de cada inserto de interesse nos vetores, foram realizadas PCR convencionais com os iniciadores específicos para cada citocina e foi feito o sequenciamento deste material. O resultado da PCR foi verificado em gel de poliacrilamida a 5% corado pela prata (SAMBROOK et al., 1982).

5.4.3. Sequenciamento dos produtos clonados

As reações de sequenciamento foram realizadas segundo método descrito originalmente por SANGER et al. (1977), utilizando-se o *DYEnamicTMET dye terminator kit MegaBACETM* (Amershan Biosciences, EUA), em tubos de microcentrífuga de 0,5mL com um volume final de 10µL contendo 0,5µL do iniciador

M13 direto (5'CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC3') ou reverso (5'TCACACAGGAAACAGCTATGAC3') (FIG. 1) , 200ng de DNA plasmidial, 4µL de Etkit (premix para sequenciamento) e água ultrapura suficiente para completar o volume.

As reações foram realizadas em um termociclador (Mastercycler®-Eppendorf) com 30 ciclos a 95°C por 20s, 50°C por 15s e 60°C por 1min. Posteriormente, os nucleotídeos não incorporados foram precipitados pela adição de 1µL de acetato de amônio (7,5M) e 25µL de etanol 95% (Merck, Alemanha). Após incubação a 25°C por 15min, seguido de centrifugação a 4000g por 45min a 25°C O sobrenadante foi descartado e 150µL de etanol 70% (Merck, Alemanha) adicionados às amostras seguindo-se de uma centrifugação a 4000g por 15min a 25°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado por agitação em vórtex com 10µL do tampão de resuspensão contendo 70% de formamida e 1mM de EDTA.

Os produtos do sequenciamento foram submetidos à leitura no seqüenciador automático capilar *Mega BACE 1000TM sequencing system* (Molecular Dynamics & Amersham Life Science) com uma injeção de 2KV por 100 segundos e corrida de 6KV por 230 segundos.

As seqüências de ácidos nucléicos obtidas foram analisadas usando o programa ChromasPro version 3.1 Software. Depois de editadas, as seqüências foram comparadas com seqüências previamente depositadas no GenBank, utilizando-se o programa "Basic Local Alignment Search Tool Program for Nucleotides"- BLAST-GenBank (ALTSCHUL et al., 1990).

5.4.4. PCR em tempo real

A determinação do perfil de expressão de citocinas, dos cães em estudo, foi realizada utilizando-se a técnica de PCR em tempo real conforme descrito por MURTA et al., (2006), com modificações.

5.4.4.1. Construção de curvas-padrão para a PCR em tempo real

Os vetores contendo os insertos de cada citocina de interesse e de β -actina foram utilizados para a confecção das curvas-padrão. Para isto foram dosados em espectrofotômetro GeneQuant RNA/DNA Calculator (Biochrom, RU) a 260 e 280nm, após diluição 1:1000. A partir desta dosagem, calculou-se a concentração de DNA em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, levando-se em consideração que neste comprimento de onda, a densidade óptica igual a um, corresponde a $50\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA de fita dupla, segundo os seguintes cálculos:

$$[\text{DNA}] = \frac{\text{leitura em } 260\text{nm} \times 50 \times \text{fator de diluição}}{1000} = \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

Esta concentração em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ foi convertida em $\text{pmol}/\mu\text{L}$ utilizando-se a fórmula que se segue:

$$\text{pmol}/\mu\text{L} = \mu\text{g}/\mu\text{L} \times \frac{10^6 \text{pg}}{1\mu\text{g}} \times \frac{1\text{pmol}}{660\text{pg}} \times \frac{1}{N}$$

Onde;

- ✓ N é o número de nucleotídeos (plasmídeo e inserto);
- ✓ 660pg é a massa molecular média de um ácido nucléico.

Levando-se em consideração o número de Avogadro: $1\text{mol} = 6,02 \times 10^{23}$ moléculas, e sabendo-se a concentração de cada solução de plasmídeo + insertos

de interesse em pmol/ μ L, foi possível determinar o número de moléculas presentes por microlitro de cada amostra.

Depois de realizados estes cálculos, as amostras foram diluídas sucessivamente, sendo que aquelas contendo de 10^9 até 10^1 moléculas foram utilizadas para a construção das curvas-padrão. Para isto, em cada placa de PCR em tempo real, foram feitas, reações em duplicata para cada citocina pesquisada, com estas amostras nestas concentrações conhecidas. Este procedimento também foi realizado com a β -actina, que foi pesquisada em todas as amostras em estudo, para se comprovar a integridade dos cDNAs obtidos a partir dos diferentes órgãos e para normalizar a concentração inicial dos cDNAs de todas as amostras.

5.4.4.2. PCR em tempo real

As reações foram realizadas em placas de 96 poços- *MicroAmp[®] Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode*, cobertas com adesivos ópticos- *Optical Adhesive Covers* (Applied Biosystems, RU) e processadas pelo *ABI Prism 7900 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, RU) do Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB-UFMG e pelo *ABI Prism 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, RU) do Departamento de Biofísica e Fisiologia/ICB-UFMG.

As curvas-padrão atuaram como controles positivos de cada placa e dois poços contendo água destilada ao invés de cDNA foram os controles negativos.

As condições ótimas da PCR foram as seguintes: uma desnaturação inicial a 95°C por 10min, seguida por 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1min (MURTA et al., 2006). Ao final das reações a temperatura da máquina foi elevada gradualmente, até que todas as fitas duplas de material amplificado se

dissociassem, para a verificação de possível contaminação dos cDNAs, em estudo, com DNA genômico ou com dímeros dos iniciadores.

Foram realizados testes pilotos para a determinação das concentrações ideais de cada iniciador, sendo selecionadas aquelas concentrações em que ocorria amplificação sem formação de dímeros ou de produtos inespecíficos (QUADRO 5). As reações foram feitas em um volume final de 25µL contendo: 5µL de cDNA; 1µL de cada iniciador nas concentrações descritas no QUADRO 5; 2,5µL de Syber buffer 10×; 3µL de MgCl₂ 25mM; 2µL de dNTP (10mM) e 0,1µL de AmpliTaq Gold® 5U/µL (Applied Biosystems, RU). O volume final foi completado com água livre de nucleases.

QUADRO 5

Concentração dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR em tempo real para a amplificação dos cDNAs de β-actina e das citocinas de interesse.

Alvo	Iniciadores	Concentração (pmol//µL)	Produto (pb)
β-actina	5' CTTCTACAACGAGCTGCGCG 3' 5' TCATGAGGTAGTCGGTCAGG 3'	1,67	307
IFN-γ	5' GGAAGACATGCTTGGCAAGTTC 3' 5' GGTGAGAGATCATTCATCACTTTGA 3'	10	147
IL-12	5' ACCTGCAGCTGAAGCCATTG 3' 5' GTCTTGTCCACGCAGAGTCT 3'	1	163
IL-4	5' CCTCACAGCGAGAAACGACTC 3' 5' CAGTACAGTAGCAGCTCT 3'	10	111
IL-10	5' ACCACGACCCAGACATCAAGA 3' 5' CCTGGAGCTTACTAAATGCGCT 3'	50	153
TGF-β	5' AGTTAAAAGCGGAGCAGCATGTGG 3' 5' GATCCTTGCGGAAGTCAATGTAGAGC 3'	10	438
TNF-α	5' GCCGCAGTACAGTAGCAGCTCT 3' 5' GTTGACCTTTGTCTGGTAGGAGACGG 3'	10	367

Para a quantificação do número de moléculas de cDNA nas amostras em estudo, o programa *Sequence Detection System* (SDS) determinou para cada poço o número de ciclos em que a fluorescência cruzava uma linha limiar arbitrária *threshold* (Ct). A quantidade de cópias de cada citocina, nas diferentes amostras, foi determinada a partir de uma regressão linear usando os valores do Ct da curva padrão gerada com quantidades conhecidas do plasmídeo com os insertos de interesse.

Estes valores foram corrigidos com um fator obtido para cada amostra, a partir da amplificação do cDNA de β -actina. Para isso, após a amplificação de β -actina para todas as amostras em cada órgão, o menor valor obtido foi selecionado e os demais foram divididos por este menor valor. Os resultados obtidos constituíram os fatores utilizados para a normalização das quantidades de cDNA para todas as citocinas em estudo.

5.5. Quantificação da carga parasitária por PCR em tempo real

A carga parasitária no baço, fígado, linfonodo cervical superficial, medula óssea e pele de orelha, foi determinada através da técnica de PCR em tempo real como descrito no item 5.4.4.

Os iniciadores utilizados para estas reações (direto: 5' TGT CGC TTG CAG ACC AGA TG 3', e reverso: 5'GCA TCG CAG GTG TGA GCA C 3') foram descritos por BRETAGNE et al. (2001) e têm como alvo o gene da DNA polimerase de *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) (acesso no GenBank: AF009147) que é um gene de cópia única e amplificam um fragmento de 90pb.

Para a construção da curva-padrão, o produto de amplificação específico obtido com estes iniciadores foi clonado e seqüenciado conforme as técnicas descritas no item 5.4.2 e 5.4.3, e a concentração foi determinada.

5.5.1. Extração de DNA dos tecidos

Para a extração do DNA dos tecidos em estudo foi utilizado o kit *PUREGENE[®] DNA Isolation kit* (Gentra, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

Fragmentos de 10mg de tecido congelado de cada órgão, de todos os animais em estudo, foram homogeneizados em 300µL de *Cell Lysis Solution* em tubos de microcentrífuga de 1,5mL com auxílio de pistilos. O lisado obtido foi incubado durante 12h a 55°C com 1,5µL de *Proteinase K Solution* (20mg/ml) para que todo o tecido fosse particulado. Ao lisado foram adicionados 1,5µL de *RNAse Solution* (4mg/mL) que foi incubado a 37°C por 60min. Em seguida, as amostras foram resfriadas em gelo por 3min, adicionadas de 100µL de *Protein Precipitation Solution* e vigorosamente homogeneizadas para posterior centrifugação a 13000g por 3min. O sobrenadante obtido, contendo o DNA, foi vertido em um novo tubo de microcentrífuga, contendo 300µL de isopropanol 100%. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 13000g por 5min, o sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado com 300µL de etanol 70%. Após centrifugação a 16000g por 1min, o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi completamente seco em temperatura ambiente e diluído em 20µL de água livre de nucleases.

Algumas diluições destas amostras foram testadas para a amplificação do gene constitutivo de β -actina pela PCR em tempo real e a que apresentou melhores resultados foi a diluição de 1:10, sendo portanto selecionada para as quantificações.

Para todas as amostras dos diferentes órgãos, antes da amplificação do gene de *L. chagasi*, foram realizadas reações de amplificação do gene constitutivo para testar a integridade do DNA e para padronizar as quantidades de DNA em todas as amostras.

5.6. Análise estatística

Os métodos estatísticos foram escolhidos de acordo com a natureza dos dados: aqueles paramétricos foram avaliados por análise de variância ou pelo teste T não-pareado, enquanto que os não paramétricos foram submetidos aos testes Mann & Whitney ou Kruskal-Wallis. Nos estudos de correlação foi realizada a análise de correlação de Pearson.

Para a realização destas análises e construção dos gráficos foi utilizado o programa Graph Pad Prism 4.

Resultados

6. Resultados

6.1. Determinação dos grupos experimentais

Cães sem raça definida, machos, e de porte médio (pesos entre 6kg e 18kg) provenientes do CCZ do município de Santa Luzia-MG, passaram pelos exames sorológicos e parasitológicos cujos resultados são apresentados na TAB. 1.

Seis animais, que apresentaram todos os testes negativos- sorológicos, parasitológicos e PCR específica para o complexo *Leishmania donovani*, (FIG.2), e que estavam em um bom estado físico, foram selecionados para formarem o grupo de cães controle não infectados (NI) por *L. chagasi*.

Aqueles animais, que apresentaram os testes sorológicos positivos, foram submetidos aos testes parasitológicos. O encontro de formas amastigotas, no exame direto de esfregaço de medula óssea (MO) ou o encontro de formas promastigotas no exame de cultura de MO, permitiram a confirmação parasitológica da infecção por *L. chagasi*, não sendo necessária a realização da PCR para estes cães. Estes animais, sorológica e parasitologicamente positivos, foram então, examinados e classificados clinicamente. Seis deles, que não apresentavam sinais clínicos compatíveis com LV canina, foram selecionados para o grupo de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, sem expressão clínica (SEC) e seis, que apresentavam sinais de LV canina, foram selecionados para o grupo de cães com expressão clínica (CEC).

Dentre os animais com testes sorológicos positivos, apenas um, sendo ele do grupo de cães CEC, apresentou exame direto de esfregaço de MO positivo. Os

demais tiveram a confirmação parasitológica da infecção através de resultados positivos na cultura de material puncionado da medula óssea. Todos os animais SEC e CEC foram positivos ao exame de cultura de material de punção de medula óssea.

TABELA 1

Resultados dos testes sorológicos: RIFI e ELISA; parasitológicos: exame direto e cultura de material puncionado de medula óssea; e PCR específica para o complexo *Leishmania donovani* de sangue periférico dos cães controle não infectados e dos cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* sem expressão clínica (SEC) e com expressão clínica (CEC) da infecção.

Grupo	Cão	RIFI	ELISA IgG	Punção de medula óssea		PCR
				Esfregaço por extensão	Cultura	
Cães controle não infectados	1	NR ¹	0,008	-	-	-
	2	NR	0,032	-	-	-
	3	NR	0,001	-	-	-
	4	NR	0,014	-	-	-
	5	NR	0,006	-	-	-
	6	NR	0,012	-	-	-
Cães SEC	7	1:40	0,077	-	+	
	8	1:40	0,330	-	+	
	9	1:40	0,284	-	+	
	10	1:160	0,295	-	+	
	11	1:40	0,213	-	+	
	12	1:40	0,100	-	+	
Cães CEC	13	1:160	0,123	-	+	
	14	1:160	0,462	-	+	
	15	1:160	0,126	-	+	
	16	1:160	0,343	+	+	
	17	1:40	0,324	-	+	
	18	1:40	0,407	-	+	

RIFI: valores de títulos $\geq 1:40$ considerados positivos. ELISA: valores superiores ao "cut off" = 0,042, considerados positivos. 1) NR= Soro não reativo. Os testes parasitológicos tiveram resultados qualitativos.

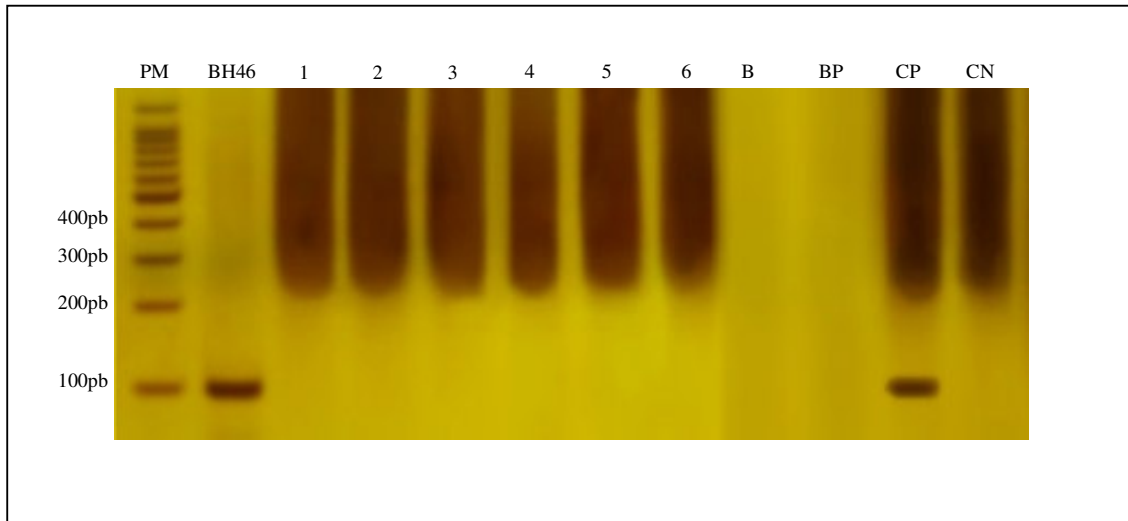


FIGURA 2- Gel de poliacrilamida a 5%, corado pela prata, representativo da PCR convencional com os iniciadores LV1 e LV2 para o complexo *Leishmania donovani*, que amplificam um fragmento de 100pb. Canaletas 1-6: amostras de sangue colhidas em papel filtro dos cães do grupo controle não infectados; PM=padrão de massa molecular de 100 pb; BH46= 1ng de DNA de promastigotas de *L. chagasi* (MHOM/BR/1967/BH46); B=controle sem DNA; BP=papel sem DNA; CP=papel com sangue de cão positivo para *L. chagasi* e CN=papel com sangue de cão negativo.

6.2. Pesquisa de IgG e das subclasses IgG1 e IgG2 pela técnica de ELISA

A pesquisa de IgG pela técnica de ELISA revelou que, todos os animais naturalmente infectados por *L. chagasi*, tanto do grupo SEC quanto CEC, apresentaram valores de absorvância positivos (superiores ao "cut off"= 0,042) e significativamente superiores aos encontrados no grupo controle não infectados ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) (GRÁF. 1). No entanto, as médias destes valores não foram significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$), embora tenha sido observada uma tendência de médias de absorvância superiores no grupo CEC em relação ao grupo SEC.

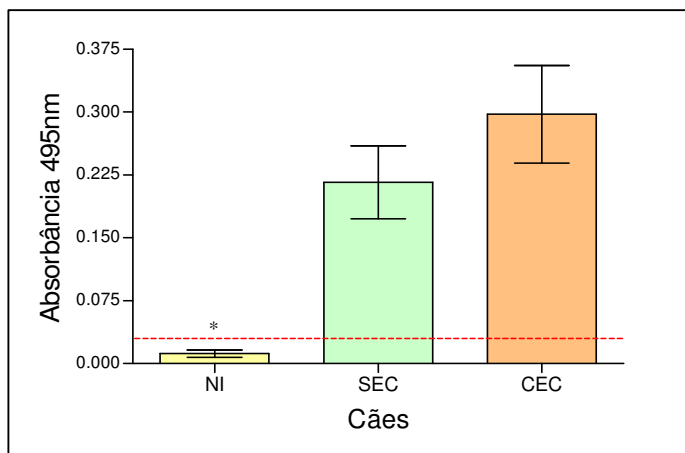


GRÁFICO 1- Média dos valores de absorvância para a determinação de IgG nos soros dos cães dos grupos controle não infectados (NI), e naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* sem (SEC) e com expressão clínica (CEC) da doença, pela técnica de ELISA. *Grupo difere dos demais ao nível de 5% de probabilidade pela análise de variância. “Cut off”= 0,042, representado no gráfico pela linha tracejada vermelha.

6.2.1. Titulação de IgG1 e IgG2

Os soros dos cães, naturalmente infectados por *L. chagasi*, foram diluídos sucessivamente a partir de 1/100 até 1/819200 e os títulos de IgG1 e IgG2, ou seja, as maiores diluições de cada soro que apresentaram reatividade para estas subclasses de imunoglobulinas, foram plotados nos GRÁF. 2A-D e comparados dentro de cada grupo.

As medianas dos títulos de IgG2 foram significativamente superiores às de IgG1 tanto no grupo de cães sem expressão clínica ($p=0,0022$) (GRÁF. 2A), quanto no grupo de animais com expressão clínica ($p=0,0081$) (GRÁF. 2B), não sendo possível estabelecer associação entre uma determinada subclasse e a manifestação de sinais clínicos da infecção.

Os títulos de cada subclasse de imunoglobulina também foram comparados entre os dois grupos de cães infectados. Embora tenha sido constatada uma

tendência de títulos de IgG1 superiores no grupo de cães SEC em relação aos cães CEC (GRÁF. 2C), quando as medianas destes títulos foram estatisticamente comparadas, não houve diferença significativa entre estes dois grupos ($p=0.2586$). Foi verificada também, uma tendência de títulos de IgG2 superiores no grupo de cães CEC em relação ao grupo SEC (GRÁF. 2D). No entanto, as diferenças das medianas dos títulos de IgG2 entre estes dois grupos, não apresentaram diferença significativa ($p=0.9999$).

Os soros dos animais do grupo controle não infectados, também foram sucessivamente diluídos, e como era esperado nenhuma diluição apresentou reatividade.

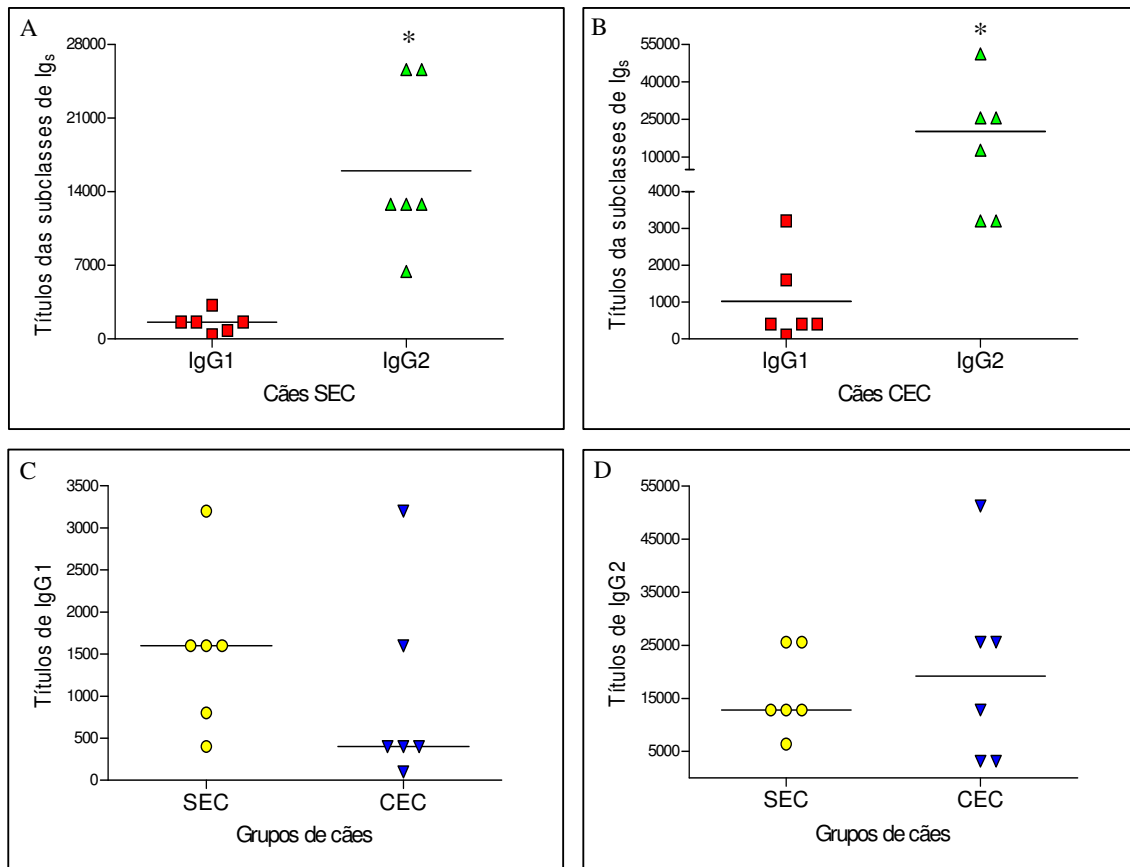


GRÁFICO 2- Títulos das subclasses de imunoglobulinas IgG1 e IgG2 nos soros dos cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, sem (SEC) e com expressão clínica (CEC) da infecção. A) Comparação das medianas dos títulos de IgG1 e IgG2 no grupo de cães SEC. B) Comparação das medianas dos títulos de IgG1 e IgG2 no grupo de cães CEC. C) Comparação dos títulos de IgG1 entre os grupos SEC e CEC. D) Comparação dos títulos de IgG2 entre os grupos SEC e CEC. “Cut off” para IgG1=0,109, “cut off” para IgG2 = 0,051. *Grupos diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Mann-Whitney.

6.3. Sinais clínicos de leishmaniose visceral encontrados no grupo de cães com expressão clínica

Os animais do grupo controle e do grupo SEC não apresentaram nenhum sinal clínico compatível com leishmaniose visceral.

Os achados clínicos encontrados no grupo CEC estão listados na tabela 2. O achado clínico mais freqüente foi linfadenopatia generalizada com 100% dos animais acometidos. Os sinais cutâneos verificados, em maior freqüência, foram alopecia local ou generalizada e hiperkeratose, em 67% dos cães CEC, seguidos por dermatite furfurácea (50%), onicogribose (33%), e lesões ulceradas na pele (33%). Metade dos animais CEC apresentavam-se caquéticos, enquanto os demais estavam em um bom estado físico. Ainda neste grupo, 33% dos cães apresentaram lesão ocular bilateral.

TABELA 2

Ocorrência dos sinais clínicos de leishmaniose visceral no grupo de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* com expressão clínica (CEC) da doença. Valores absolutos (n) e percentuais (%).

Sinais clínicos	n	%
Linfadenopatia	6	100
Alopecia	4	67
Hiperkeratose	4	67
Dermatite furfurácea	3	50
Caquexia	3	50
Úlceras na pele	2	33
Onicogribose	2	33
Lesões oculares	2	33

6.4. Histologia

Os dados obtidos em relação ao peso relativo do baço, fígado e linfonodo cervical superficial dos animais do grupo controle não infectados e dos cães naturalmente infectados por *L. chagasi* dos grupos SEC e CEC estão demonstrados na TABELA 3.

Não houve diferença estatística em relação ao peso relativo destes órgãos entre os grupos NI e SEC ($p>0,05$). No entanto, as médias dos pesos relativos de baço, fígado, e linfonodo dos cães CEC foram significativamente superiores em relação aos demais grupos ($p<0,05$).

TABELA 3

Média do peso relativo (peso órgão/peso cão) dos baços, fígados e linfonodos cervicais superficiais dos cães controle não infectados e dos cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* dos grupos sem e com expressão clínica da infecção.

Grupos de cães	Média do peso relativo dos baços \pm dp	Média do peso relativo dos fígados \pm dp	Média do peso relativo dos linfonodos \pm dp
Controle não infectados	0,85 \pm 0,26	3,31 \pm 0,63	0,022 \pm 0,008
Sem expressão clínica	0,79 \pm 0,40	2,79 \pm 0,63	0,017 \pm 0,005
Com expressão clínica	1,57 \pm 0,51*	5,67 \pm 0,69*	0,064 \pm 0,014*

*Na comparação das médias do peso relativo do mesmo órgão, o grupos difere dos demais ao nível de 5% de probabilidade pela análise de variância.

6.4.1. Baço

As alterações histopatológicas observadas no baço dos cães SEC e CEC foram o espessamento e inflamação da cápsula, a hiperplasia e hipertrofia da polpa branca e da polpa vermelha, a congestão da polpa vermelha e a deposição de pigmentos de hemossiderina. Estas alterações estão descritas no GRÁF. 3.

Todos os cães tanto do grupo SEC quanto do grupo CEC apresentaram espessamento da cápsula, com intensidade variando de discreta a moderada. Quando esse parâmetro foi comparado entre estes dois grupos de cães naturalmente infectados, não foi evidenciada diferença significativa ($p>0,05$).

A intensidade da inflamação da cápsula variou nos cães dos dois grupos de discreta a moderada sendo que, não houve diferença significativa quando as médias deste achado foram comparadas entre os cães SEC e CEC ($p>0,05$).

Quando a intensidade da hiperplasia e hipertrofia da polpa branca do baço foi comparada entre os grupos de cães naturalmente infectados, as médias dos cães CEC foram significativamente superiores em relação aos cães SEC ($p<0,05$) (GRÁF. 3). A maioria dos cães SEC apresentou uma discreta hipertrofia da polpa branca enquanto todos os animais CEC apresentaram tanto hipertrofia quanto hiperplasia da polpa branca, exibindo característicos centros germinativos, com intensidade variando entre moderada e intensa. Em alguns cães CEC ainda foi evidenciada a ocorrência de discreta depleção de áreas T da polpa branca.

Todos os cães SEC e CEC apresentaram hiperplasia e hipertrofia da polpa vermelha variando entre discreta a intensa. Apenas um cão SEC não apresentou congestão de polpa vermelha, enquanto os demais deste grupo apresentaram esta alteração variando entre discreta a moderada. Já os animais CEC apresentaram

congestão variando entre discreta e intensa. Não houve diferença significativa das alterações de polpa vermelha quando comparadas entre cães SEC e CEC, embora tenha sido verificada uma tendência de baços mais congestionados no grupo de cães CEC ($p>0,05$).

Os cães naturalmente infectados dos dois grupos experimentais apresentaram deposição de hemossiderina em intensidade que variou entre discreta a intensa. Embora tenha sido constatada uma maior deposição de hemossiderina nos baços dos cães CEC em relação aos cães SEC, não houve diferença significativa entre esses dois grupos ($p>0,05$).

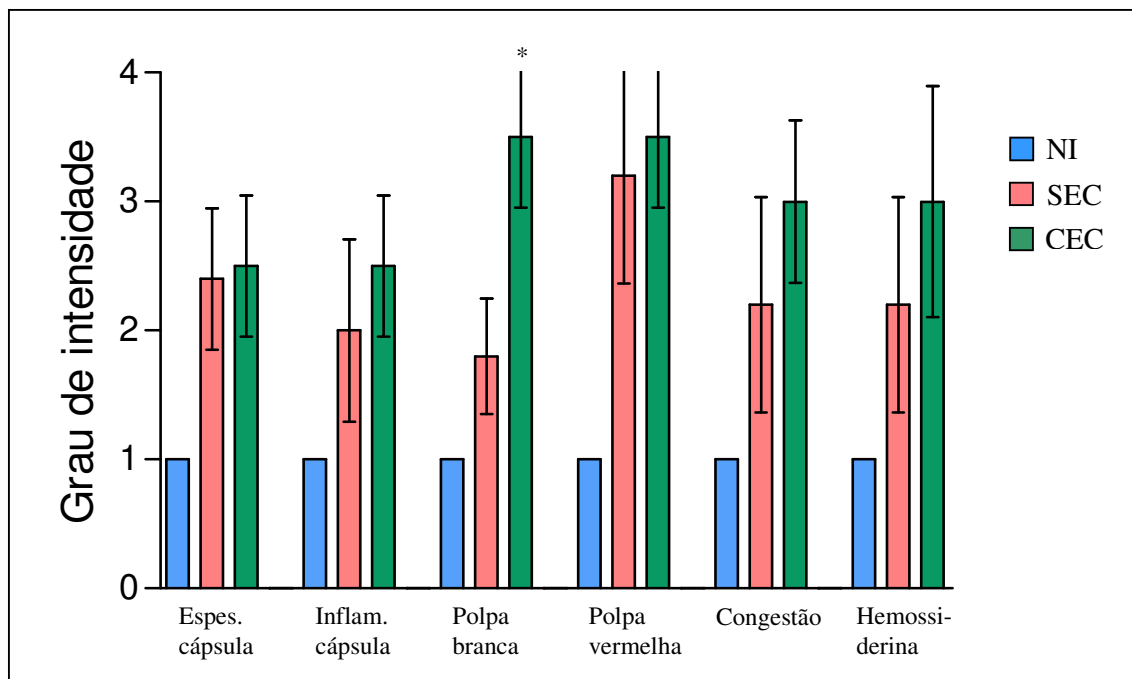


GRÁFICO 3- Alterações histopatológicas observadas no baço dos cães não infectados (NI) e naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, sem (SEC) e com expressão clínica (CEC) da doença. Critérios adotados para avaliação da intensidade das alterações: 1- Ausência de alteração; 2- Alteração discreta; 3- Alteração moderada; 4- Alteração intensa. *Grupos de cães diferem entre si, no critério avaliado, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Mann-Whitney.

6.4.2. Fígado

As alterações avaliadas, no estudo histopatológico dos fígados dos cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, foram a presença de granulomas, a ocorrência de inflamação do sistema porta e da cápsula do órgão, a presença de congestão dos sinusóides, a deposição de hemossiderina, a ocorrência de fenômenos degenerativos e de hipertrofia e hiperplasia das células de Küpffer, que estão descritas no GRÁF. 4.

Quando as médias das alterações foram comparadas entre os grupos SEC e CEC constatou-se que a inflamação do sistema porta, a congestão sinusoidal, a deposição de hemossiderina e a degeneração foram significativamente mais intensas no grupo de cães CEC ($p < 0,05$). Os demais achados não apresentaram diferença entre os diferentes grupos clínicos

Em dois cães SEC não foi evidenciada a presença de granulomas. Nos demais cães, naturalmente infectados, foram encontrados granulomas organizados em grau que variou de discreto a intenso.

A inflamação da cápsula do fígado foi ausente em dois cães SEC e um CEC. Nos demais animais destes dois grupos, essa alteração foi evidenciada de forma discreta.

A inflamação portal foi verificada em todos os animais naturalmente infectados, sendo que variou entre discreta e moderada nos cães SEC e entre moderada e intensa nos cães CEC. Nesses dois grupos, a inflamação do sistema-porta apresentou um predomínio de células mononucleares, com um padrão plasmohistiolinfocitário. Apenas dois cães SEC apresentaram hepatócitos com discreta degeneração hidrópica enquanto todos os cães CEC apresentaram esta

alteração variando de discreta a moderada. Um animal CEC apresentou a ocorrência de necrose hepatocitária moderada.

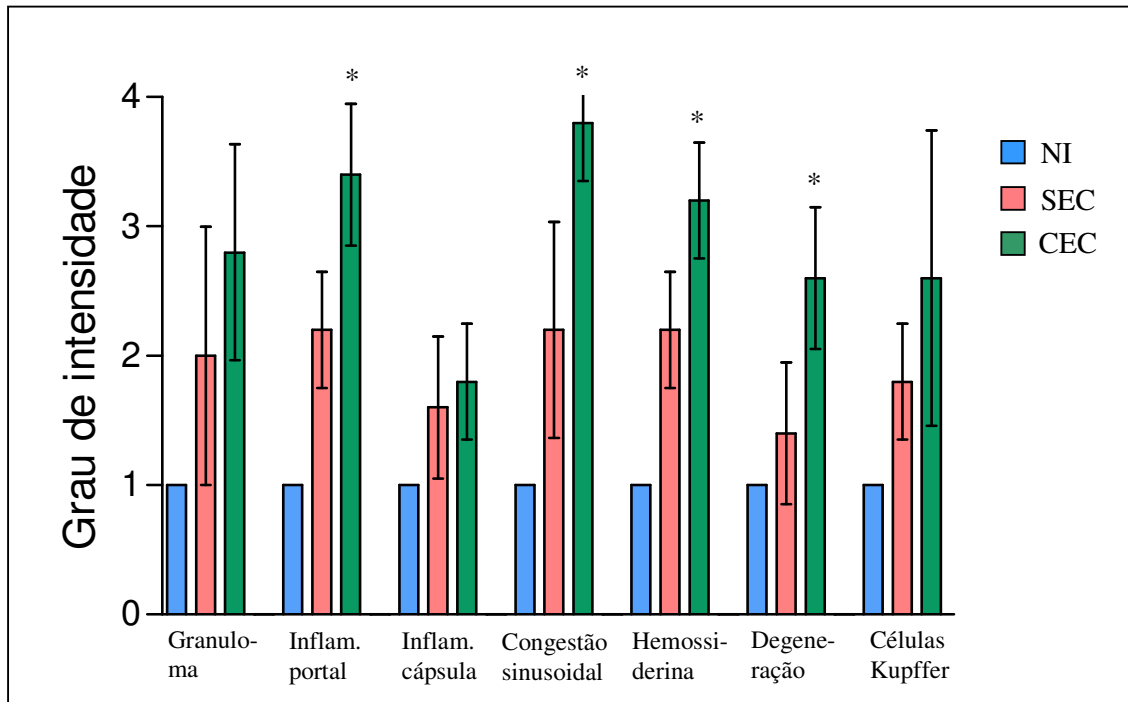


GRÁFICO 4- Alterações histopatológicas observadas no fígado dos cães não infectados (NI) e naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, sem (SEC) e com expressão clínica (CEC) da doença. Critérios adotados para avaliação da intensidade das alterações: 1- Ausência de alteração; 2- Alteração discreta; 3- Alteração moderada; 4- Alteração intensa. *Grupos de cães diferem entre si, no critério avaliado, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Mann-Whitney.

6.4.3. Linfonodo cervical superficial

As alterações, mais marcantes e que foram avaliadas nos linfonodos cervicais dos cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, foram a linfadenite capsular, a inflamação dos seios subcapsulares, a hiperplasia e hipertrofia dos nódulos linfóides, a congestão e presença de pigmentos de hemossiderina (GRÁF.5).

A inflamação dos seios subcapsulares e a deposição de hemossiderina foram significativamente superiores nos cães CEC em relação aos SEC ($p < 0,05$). Os demais achados não apresentaram diferença estatística entre os dois grupos ($p > 0,05$).

Tanto a linfadenite capsular quanto a inflamação dos seios capsulares apresentaram um padrão predominantemente plasmohistiolinfocitário, em todos os cães naturalmente infectados, sendo que, a intensidade dessas alterações variou entre esses animais.

A hipertrofia e hiperplasia dos nódulos linfóides variaram de discreta a intensa nos cães naturalmente infectados SEC e CEC, sendo observada a formação de centros germinativos em alguns animais, sobretudo naqueles que apresentaram alteração intensa.

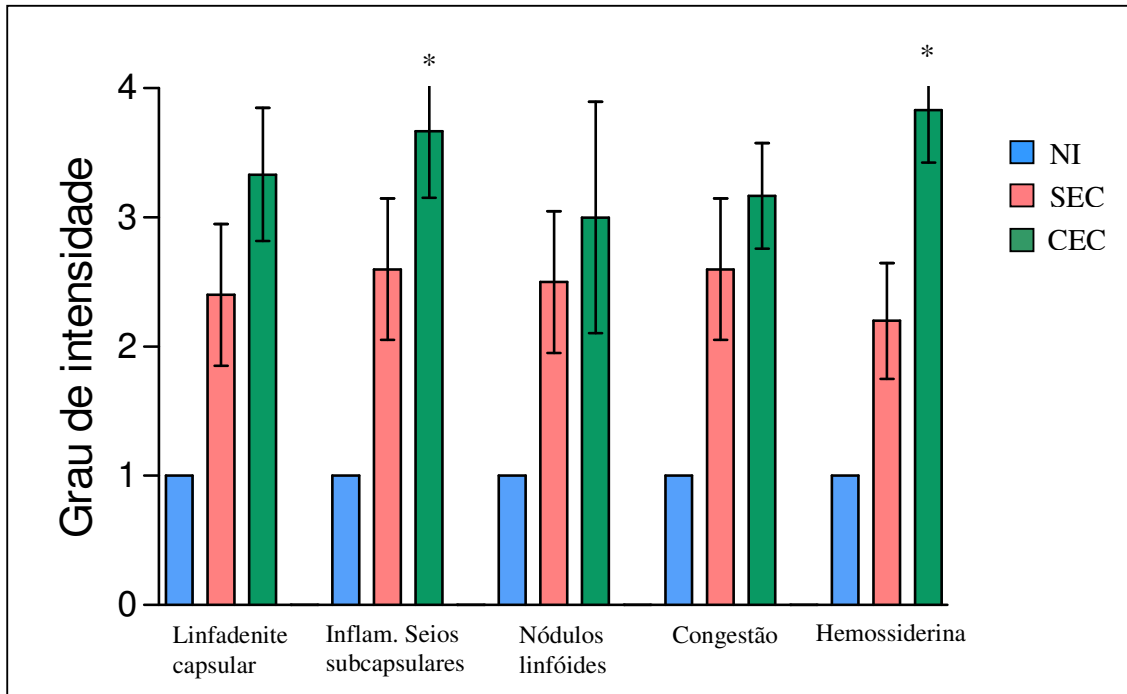


GRÁFICO 5- Alterações histopatológicas observadas no linfonodo cervical superficial dos cães não infectados (NI) e naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, sem (SEC) e com expressão clínica (CEC) da doença. Critérios adotados para avaliação da intensidade das alterações: 1- Ausência de alteração; 2- Alteração discreta; 3- Alteração moderada; 4- Alteração intensa. *Grupos de cães diferem entre si, no critério avaliado, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Mann-Whitney.

6.4.4. Pele de orelha

As alterações histopatológicas avaliadas nas peles dos cães naturalmente infectados por *L. chagasi* foram a inflamação na derme, ocorrência de acantose, hiperqueratose, pérolas córneas, paraceratose, fenômenos degenerativos e a presença de células gigantes (GRÁF. 6).

O único achado que apresentou diferença significativa entre cães SEC e CEC foi a ocorrência de acantose que foi significativamente superior nos cães CEC ($p < 0,05$).

A inflamação na derme variou de discreta a moderada nos cães SEC e de discreta a intensa nos cães CEC. O padrão inflamatório, observado em todos os cães naturalmente infectados, embora tenha variado em intensidade, entre os animais, foi predominantemente plasmohistiocitário em todos eles. Em geral, a distribuição do exsudato inflamatório era difusa na derme e focal ao redor dos vasos e anexos.

Não foram verificados fenômenos degenerativos nos cães dos dois grupos experimentais e dois cães CEC apresentaram extensas áreas de ulceração.

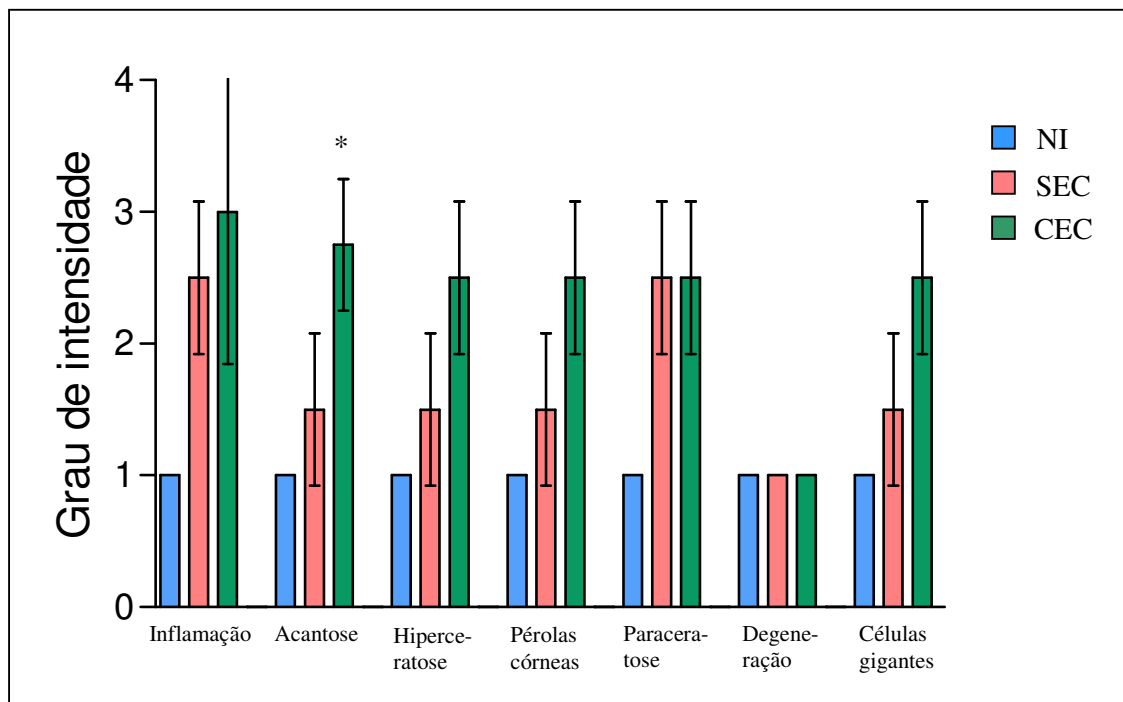


GRÁFICO 6- Alterações histopatológicas observadas na pele de orelha dos cães não infectados (NI) e naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, sem (SEC) e com expressão clínica (CEC) da doença. Critérios adotados para avaliação da intensidade das alterações: 1- Ausência de alteração; 2- Alteração discreta; 3- Alteração moderada; 4- Alteração intensa. *Grupos de cães diferem entre si, no critério avaliado, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Mann-Whitney.

6.5. Imunoistoquímica

A pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania*, em lâminas de imunoistoquímica de cortes de baço, fígado, linfonodo cervical superficial e pele de orelha dos cães não infectados, revelou, como esperado, a ausência destas formas.

No entanto, em todos os animais naturalmente infectados tanto do grupo SEC, quanto do grupo CEC foram encontradas formas amastigotas em todos os órgãos avaliados (GRÁF. 7-A, B, C e D).

Em todos os órgãos, quando foram comparados os números de formas amastigotas dos cães SEC com os cães CEC, foram verificados valores superiores no grupo de cães CEC. No entanto, quando as medianas destes grupos foram estatisticamente comparadas, não foram encontradas diferenças significativas entre os números de amastigotas encontradas no fígado ($p= 0.0758$) e linfonodos ($p= 0.2421$) dos cães SEC em relação aos cães CEC (GRÁF. 7-A e C), embora tenha sido verificada a tendência de maior número de amastigotas nestes órgãos dos cães CEC. Já quando as medianas dos números de amastigotas foram comparadas nos baços e peles de orelhas dos dois grupos de cães naturalmente infectados, foram encontrados valores significativamente superiores no grupo de cães CEC ($p=0,01$ para baço; e $p=0,04$ para pele de orelha) em relação ao grupo SEC (GRÁF. 7-B e D).

Quando os valores encontrados para cada órgão foram comparados dentro de cada grupo experimental (GRÁF. 8-A e B), foi verificado que o órgão que apresentou menor parasitismo tanto no grupo de cães SEC quanto no grupo CEC, foi o fígado, cuja mediana do número de amastigotas encontradas neste órgão foi

significativamente inferior aos demais órgãos ($p < 0,01$ para o grupo SEC e $p < 0,05$ para o grupo CEC).

No grupo de cães SEC (GRÁF. 8-A), os baços apresentaram medianas do número de amastigotas significativamente superiores as das peles de orelha ($p < 0,05$), sendo que estes dois órgãos, no entanto, não apresentaram diferenças significativas em relação aos linfonodos dos animais deste mesmo grupo ($p > 0,05$).

No grupo de cães CEC (GRÁF. 8-B), os baços apresentaram medianas dos números de amastigotas significativamente superiores às encontradas nos linfonodos destes cães ($p < 0,05$). As peles de orelhas dos cães CEC não apresentaram, no entanto, diferenças significativas em relação aos baços e linfonodos destes mesmos animais ($p > 0,05$).

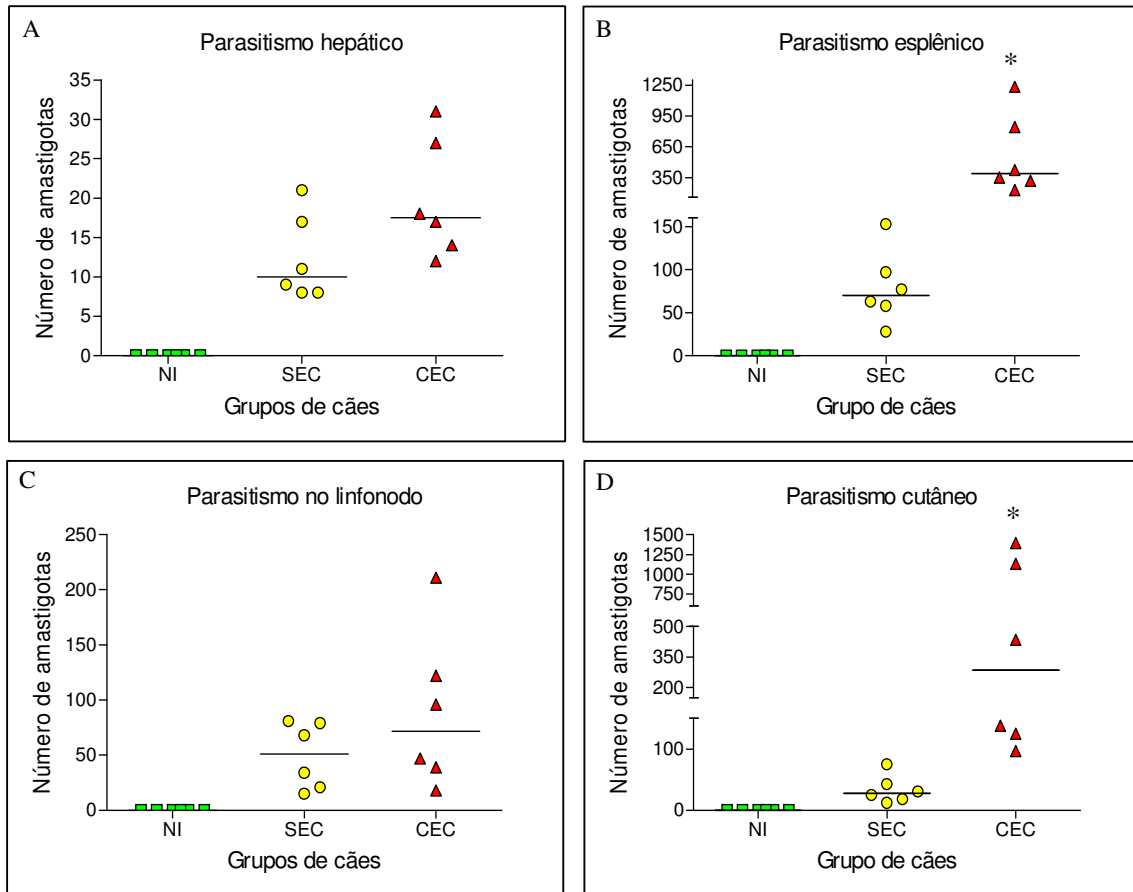


GRÁFICO 7- Número de formas amastigotas de *Leishmania* encontradas em 20 campos examinados no estudo imunistoquímico de cortes de: A) fígado, B) baço, C) linfonodo cervical superficial e D) pele de orelha, dos cães dos grupos: ■ controle não infectados (NI), e dos cães naturalmente infectados por *L. chagasi*: ● sem expressão clínica (SEC) e ▲ com expressão clínica (CEC).
*Grupos diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t não pareado.

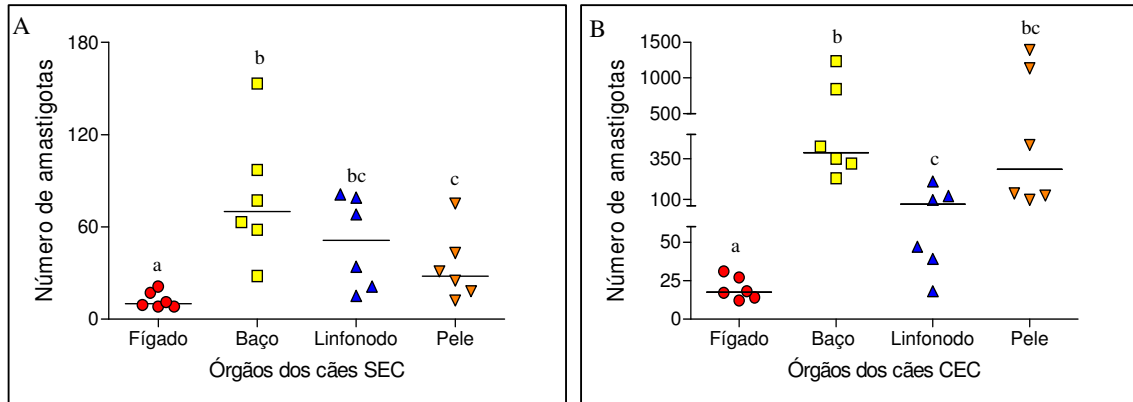


GRÁFICO 8- Comparação da densidade parasitária obtida em 20 campos examinados no estudo imunohistoquímico de cortes de: ● fígado, ■ baço, ▲ linfonodo cervical superficial e ▼ pele de orelha nos grupos dos cães: A) sem expressão clínica (SEC) e B) com expressão clínica (CEC). a, b, c: grupos marcados com letras minúsculas distintas, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t não pareado.

A FIG. 3 mostra um corte de pele de orelha, de um cão naturalmente infectado por *L. chagasi* pertencente ao grupo CEC, submetido ao estudo imunohistoquímico, onde podem ser visualizadas várias formas amastigotas imuno-marcadas.

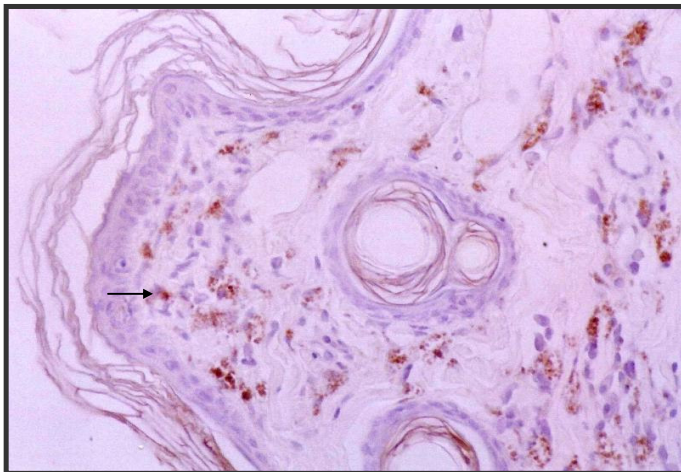


FIGURA 3- Reação imunohistoquímica em corte de pele de orelha de cão naturalmente infectado por *Leishmania chagasi* (440X). Inúmeras amastigotas imuno-marcadas podem ser observadas, como a destacada na ponta da seta.

6.5.1. Correlação: imunistoquímica X subclasses de IgG

Visando identificar se o parasitismo tecidual, determinado pelo estudo imunistoquímico, nos diferentes órgãos apresentava alguma associação com os subtipos de IgG estudados foi feita uma análise de correlação entre estes dados.

Os GRÁF. 9 A-D representam a correlação entre IgG1 e o parasitismo respectivamente, nos baços, fígados, linfonodos cervicais superficiais e peles de orelha de todos os cães naturalmente infectados, pertencentes tanto ao grupo SEC quanto ao CEC.

Através deste estudo constatou-se que nos baços e fígados a correlação encontrada foi negativa ($r=-0,1279$ e $r=-0,4180$, respectivamente), enquanto nos linfonodos foi positiva ($r=0,3081$) e nas peles de orelha foi praticamente nula ($r=0,0106$). Entretanto, estas correlações não foram significativas ($p>0,05$) em nenhum dos órgãos estudados.

Os GRÁF. 10A-D representam a correlação entre IgG2 e o parasitismo nos diferentes órgãos estudados. Foi observada uma correlação positiva ($r=0,5930$) e significativa ($p=0,0421$) entre estes dois parâmetros nos linfonodos avaliados. Já nos baços foi verificada uma correlação positiva ($r=0,2735$), nos fígados, negativa ($r=-0,2438$) e nas peles de orelha praticamente nula ($r=0,0872$), que, no entanto, não foram significativas ($p>0,05$).

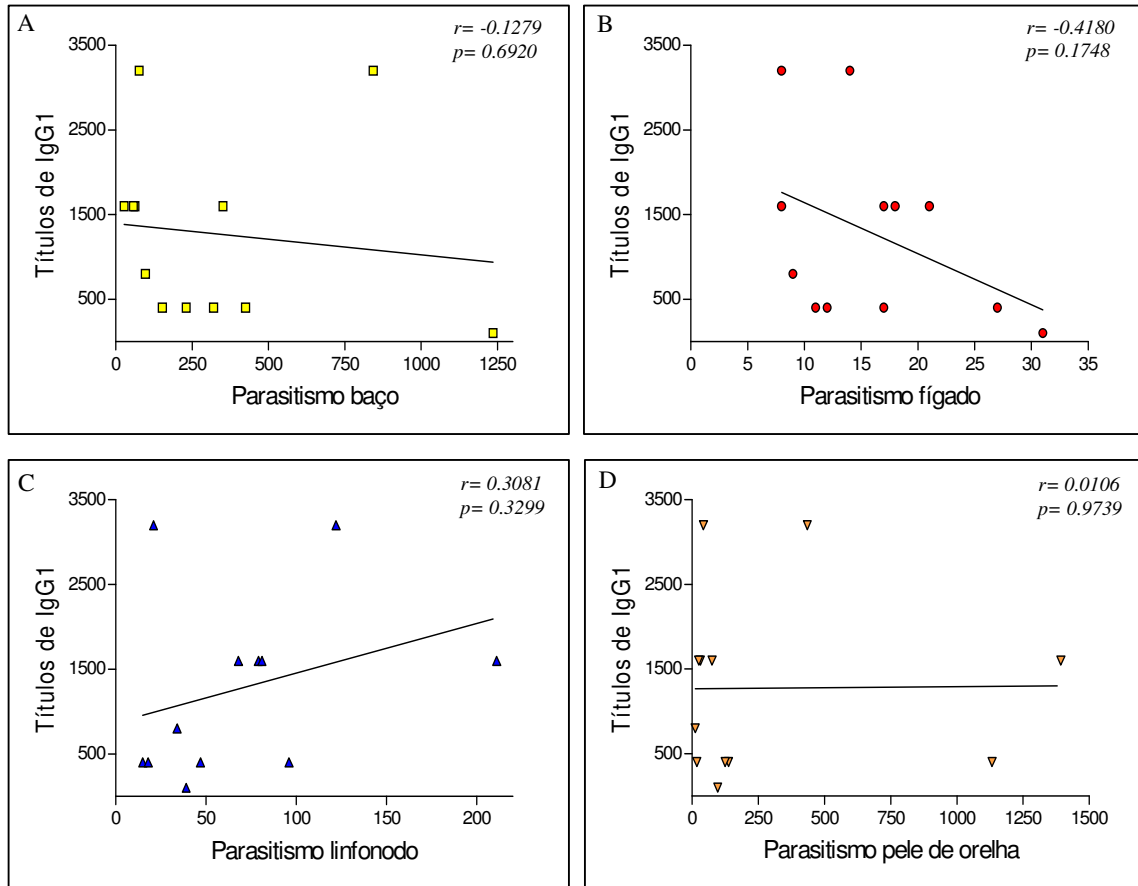


GRÁFICO 9- Correlação entre os títulos de IgG1 nos soros dos cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* e a densidade parasitária, determinada pelo exame de 20 campos no estudo imunistoquímico de cortes de: A) baço, B) fígado, C) linfonodo cervical superficial e D) pele de orelha destes cães. Os resultados foram plotados individualmente para cada cão e a linha contínua ilustra os índices de correlação positiva e negativa. Os índices de correlação de Pearson (r) e os valores p , para cada órgão, são mostrados nos gráficos.

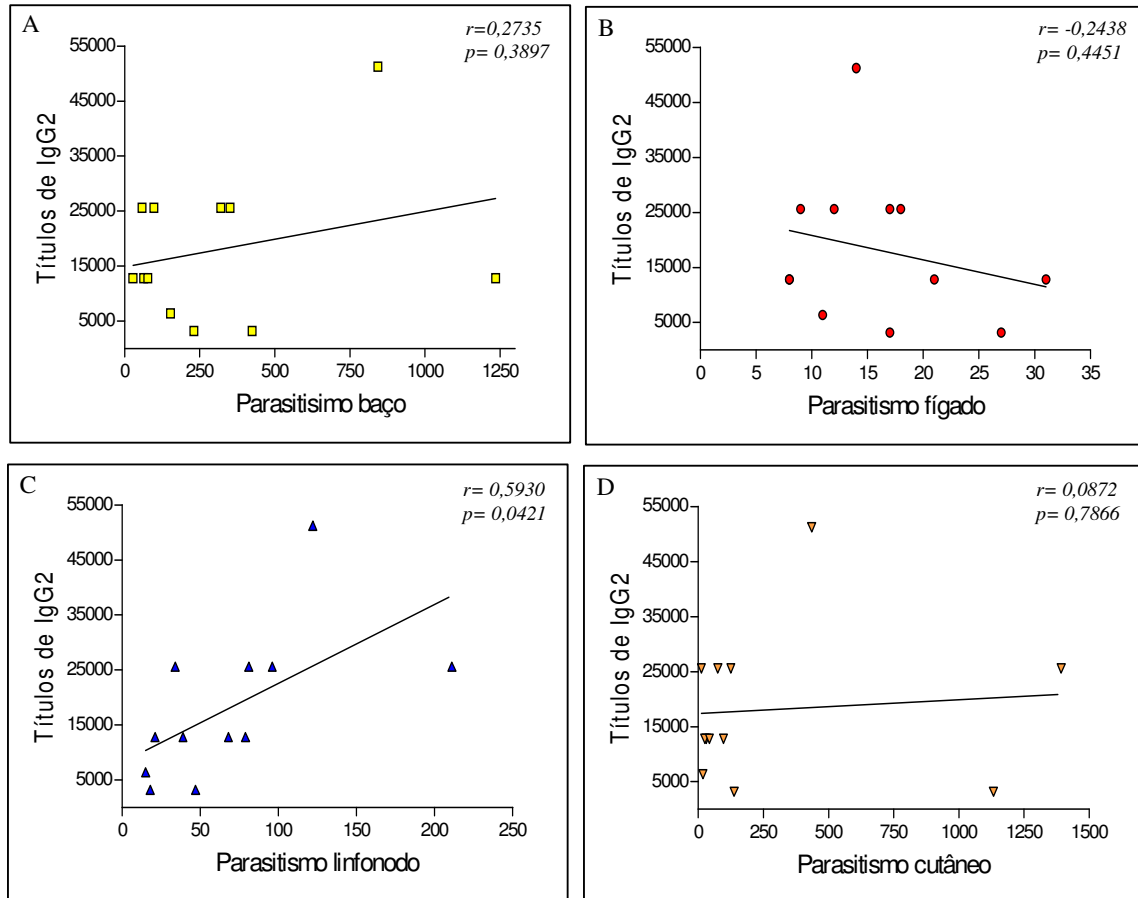


GRÁFICO 10- Correlação entre os títulos de IgG2 nos soros dos cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* e a densidade parasitária, determinada pelo exame de 20 campos no estudo imunistoquímico de cortes de: A) baço, B) fígado, C) linfonodo cervical superficial e D) pele de orelha destes cães. Os resultados foram plotados individualmente para cada cão e a linha contínua ilustra os índices de correlação positiva e negativa. Os índices de correlação de Pearson (r) e os valores p, para cada órgão, são mostrados nos gráficos.

6.6. Hemograma, análise bioquímica e urinálise

O estudo hematológico, dos cães dos diferentes grupos experimentais, revelou que, todos os animais livres de infecção por *L. chagasi*, apresentaram hemograma sem alterações. Dos seis animais SEC, dois (33,3%) apresentaram leucocitose devido ao aumento de neutrófilos segmentados. Os demais parâmetros avaliados no hemograma dos cães deste grupo não apresentaram alterações.

No grupo de cães CEC, três (50%) dos animais apresentaram anemia normocrômica e normocítica. Quando as médias dos números de hemácias, das concentrações de hemoglobina e dos valores de hematócitos dos três grupos experimentais foram comparadas, constatou-se que as médias destes parâmetros nos cães CEC foram significativamente inferiores ($p < 0,05$) em relação aos cães NI e SEC, que não apresentaram diferença significativa entre si (TAB. 4).

Ao ser avaliado o leucograma, verificou-se que os mesmos três animais (50%) do grupo CEC que apresentaram anemia, apresentaram também um quadro de leucocitose em decorrência de um aumento combinado do número de segmentados e eosinófilos. Além disso, dois destes três cães apresentaram linfocitose que também contribuiu para a leucocitose. Um dos três cães que não apresentaram aumento da contagem global de leucócitos apresentou também linfocitose. Quando as médias dos números de leucócitos totais, de segmentados e monócitos foram comparadas (TAB. 4) entre os grupos NI, SEC e CEC, não foi verificada diferença significativa ($p > 0,05$), embora estas médias tenham sido superiores nos cães CEC. Já as médias das contagens de eosinófilos foram significativamente superiores no grupo de cães CEC ($p < 0,05$). As médias dos números de linfócitos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os

grupos SEC e CEC, mas foram estatisticamente superiores as encontradas no grupo NI ($p < 0,05$).

Todos os animais, dos diferentes grupos experimentais, apresentaram contagem de plaquetas dentro dos limites de referência.

TABELA 4

Média dos valores hematológicos dos cães não infectados (NI) e naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* sem expressão clínica (SEC) e com expressão clínica (CEC).

Cães Hemograma	NI	SEC	CEC
	Média ± dp	Média ± dp	Média ± dp
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	7,44±0,66	7,13±1,23	5,56±1,14*
Hemoglobina (g/dL)	15,88±1,31	14,97±1,94	11,65±2,81*
Hematócrito (%)	45,83±3,35	44,82±6,73	34,47±8,55*
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	13,88±3,22	15,18±5,22	18,86±9,33
Segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	9,87±2,32	10,08±4,60	11,80±6,44
Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,91±0,23	0,57±0,40	1,88±0,95*
Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	2,92±0,78*	4,04±0,45	4,57±2,45
Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,42±0,36	0,34±0,32	0,50±0,31
Plaquetas ($\times 10^5/\mu\text{L}$)	316,50±147,42	260±136	314,83±159,69

*Grupos diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pela análise de variância.

Quanto às análises bioquímicas para a avaliação das funções hepática e renal, dentre os animais SEC, um (16,7%) apresentou níveis elevados de aspartato aminotransferase (AST). Os demais apresentaram todas as dosagens dentro dos valores de referência assim como todos os cães do grupo NI.

Dentre os animais CEC, dois (33,34%) apresentaram elevados níveis de AST e alanina aminotransferase (ALT) simultaneamente e um (16,7%) apresentou dosagens de fosfatase alcalina superior aos valores de referência. Quando as

médias das dosagens de AST e ALT foram comparadas entre os três grupos experimentais (TAB. 5), constatou-se médias significativamente superiores ($p < 0,05$) no grupo de cães CEC em relação aos demais, que no entanto, não foram diferentes entre si ($p > 0,05$).

As médias dos valores de bilirrubina total não foram significativamente diferentes entre os três grupos, enquanto as médias de fosfatase alcalina foram significativamente inferiores no grupo NI ($p < 0,05$) em relação aos grupos SEC e CEC que não apresentaram diferença entre si (TAB. 5). Todos os cães dos três grupos apresentaram valores de creatinina abaixo dos de referência. Dois (33,34%) dos cães SEC e todos os cães CEC apresentaram as dosagens de uréia superiores aos valores de referência e as médias destas dosagens foram significativamente superiores no grupo CEC ($p < 0,05$) em relação aos demais (TAB. 5).

TABELA 5

Média dos valores bioquímicos dos cães não infectados (NI) e naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* sem (SEC) e com expressão clínica (CEC) da leishmaniose visceral.

Cães Função hepática e renal	NI Média ± dp	SEC Média ± dp	CEC Média ± dp
TGO (AST) (U.I/L)	62,5±9,95	55,0±19,36	100,0±51,96*
TGP (ALT) (U.I/L)	26,5±6,06	34,5±12,08	104,17±74,37*
Fosfatase alcalina (U.I/L)	18,67±2,73*	30,33±10,37	65,67±49,98
Bilirrubina total (mg/dL)	0,45±0,07	0,44±0,10	0,50±0,10
Creatinina (mg/dL)	0,96±0,20	0,85±0,20	0,95±0,35
Uréia (mg/dL)	20,50±2,38	25,75±4,11	46,17±14,77*
Proteínas totais (g/dL)	6,82±0,56	6,99±0,64	8,27±0,94*
Albumina (g/dL)	2,81±0,29	2,74±0,25	2,03±0,51*
Globulina (g/dL)	4,01±0,51	4,25±0,62	6,24±1,31*

*Grupos diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pela análise de variância.

As concentrações das proteínas séricas totais, de albumina e de globulina foram dosadas em todos os animais. As médias das dosagens das proteínas séricas totais e de globulina foram significativamente superiores no grupo CEC enquanto as médias das concentrações de albumina deste grupo foram estatisticamente inferiores em relação aos demais ($p < 0,05$) (TAB. 5).

Os cães do grupo controle não infectados e do grupo SEC apresentaram todas as dosagens dentro dos valores de referência. Não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,05$) da relação albumina/globulina (A/G), entre estes dois grupos, embora tenha sido verificada uma tendência de valores de albumina menores e de γ -globulina maiores nos animais SEC em comparação aos animais controle.

Dentre os seis cães do grupo CEC, cinco apresentaram valores de albumina inferiores e de γ -globulina superiores aos valores de referência. A média da relação A/G neste grupo foi significativamente inferior ao grupo controle ($p < 0,001$) e ao grupo de cães SEC ($p < 0,01$) (GRÁF. 11).

A urinálise revelou a ocorrência de hematúria e proteinúria em quatro (66,67%) cães CEC, sendo que, dentre estes, um apresentou contagem de piócitos superiores aos valores de referência. Os demais cães, dos diferentes grupos experimentais, não apresentaram alterações na urinálise.

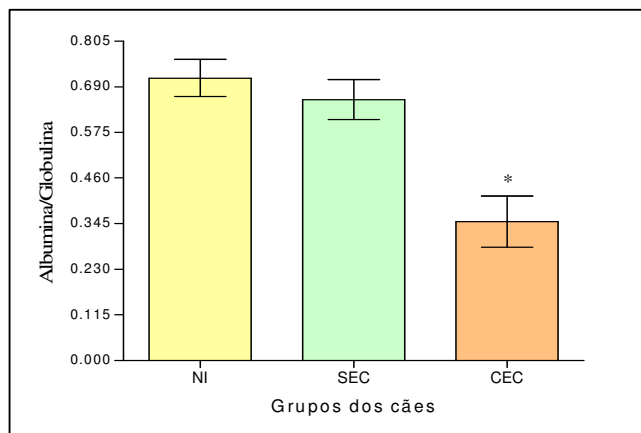


GRÁFICO 11- Média da relação Albumina/Globulina nos grupos de cães controle não infectados (NI), e cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* sem expressão clínica (SEC) e com expressão clínica (CEC). *Grupo difere dos demais ao nível de 5% de probabilidade pela análise de variância.

6.7. Clonagem e sequenciamento

Todos os cDNAs das citocinas de interesse e de β - actina, após clonados, foram submetidos a uma PCR convencional com os iniciadores específicos descritos no quadro 4, para confirmar que os insertos correspondiam aos fragmentos de interesse.

Os resultados demonstraram a amplificação de fragmentos de tamanhos compatíveis com os de interesse e estão representados na FIG. 4.

O fragmento do gene de cópia única da DNA polimerase de *L. chagasi* selecionado para a quantificação da carga parasitária, após clonado, também foi submetido a uma PCR convencional com os iniciadores específicos, que promoveram a amplificação do fragmento de 90pb de interesse. A FIG. 5 é representativa da amplificação de 10^6 a 10^0 moléculas deste gene ligado ao vetor.

Estas amostras também foram seqüenciadas, sendo verificado que os insertos correspondiam às seqüências de interesse após o alinhamento pelo programa BLAST, com as seqüências depositadas no GenBank. Este sequenciamento confirmou os resultados da PCR convencional realizada com estas amostras, indicando que as seqüências clonadas eram realmente as de interesse, permitindo a utilização destas amostras para a construção das curvas-padrão. Os resultados do sequenciamento e do alinhamento encontram-se representados nas FIG. 6-13.

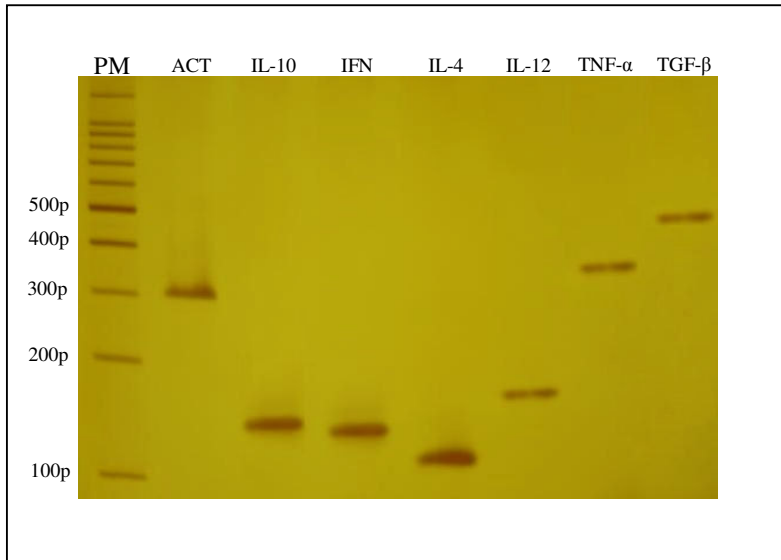


FIGURA 4- Gel de poliacrilamida a 5%, corado pela prata, representativo da amplificação por PCR convencional, dos cDNAs clonados de: β -actina (ACT), interleucina-10 (IL-10), interferon- γ (IFN- γ), interleucina-4 (IL-4), interleucina-12 (IL-12), fator de necrose tumoral (TNF- α) e fator de crescimento transformante (TGF- β) respectivamente, com os iniciadores específicos descritos no quadro 4. PM=padrão de massa molecular de 100 pares de bases.

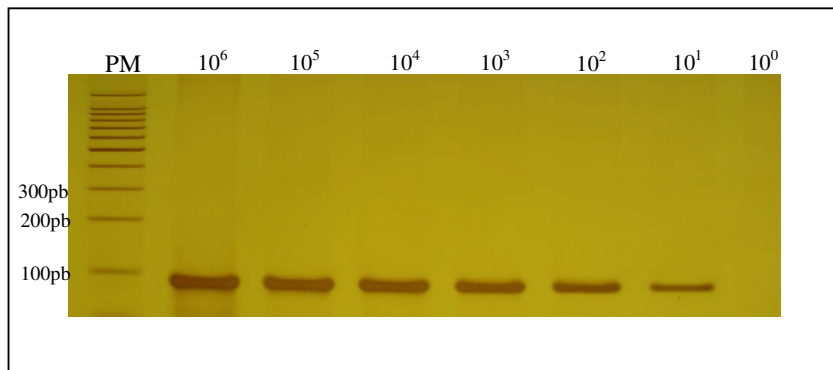


FIGURA 5- Gel de poliacrilamida a 5%, corado pela prata, representativo da amplificação por PCR convencional de 10^6 a 10^0 moléculas de DNA clonado do gene de cópia única da DNA polimerase de *Leishmania chagasi* com iniciadores específicos. Produtos de amplificação com 90pb. PM= padrão de massa molecular de 100 pares de bases.

6.7.1. β -actina canina

CTTATGACACTATACCAATACTCGATNGAAATGCATCCAACGCGTTGGGACGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCA
 GGCGGCCGGAATTCACCTAGTGCATGAGGTAGTCGGTCAGGTCCCAGCCAGCCAGGTCCAGACGCAAGATGG
 CATAGGGGGAGGGCGTACCCCTCATAGATGGCACCCTGTGGGTGACCCCGTCACCGGAGTCCATCACGATGCCAG
 TGGTGCAGGACAGGGCATAACAGGGACAGCACAGCCTGATGGCCACGTACATGGCTGGGGTGTGAAAGTCTCGAA
 CATGATCTGGGTATCTTCTCACGGTTGGCCTTGGGGTTCAGGGGGGCTCGGTGAGCAGCACCGGGTCTCCTC
 GGGGGCCACGCGCAGCTCGTTGTAGAAGATCGAATCCCAGCGGCCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGG
 CCAATTGCCCCATAGTGCATGAGTGCATGAGTGCATGAGTGCATGAGTGCATGAGTGCATGAGTGCATGAGTGCATGAGT
 CTGGCGTTACCCAACCTAAATCGCCTTGCAGCACATTCACCCCTTTCGGCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAAGCCCG
 GACCGATTGCGCCTTCC

gi|73958066|ref|XM_845524.1

PREDICTED: Canis familiaris beta-actin, mRNA Length=2173
 Score = 553 bits (279), Expect = 2e-154
 Identities = 303/307 (98%), Gaps = 3/307 (0%)

		Reverso			
Query	99	<u>TTCATGAGGTAGTCGGTCAGG</u>	TCCCAGCCAGCCAGGTCCAGACGCAAGATGGCATAGGGG	158	
Sbjct	718	<u>TTCATGAGGTAGTCGGTCAGG</u>	TCCCAGCCAGCCAGGTCCAGACGCAAGATGGCAT	-GGGG	660
Query	159	GAGGGCGTACCCCTCATAGATGG	-CACCGTGTGGGTGACCCCGTCACCGGAGTCCATCAC	217	
Sbjct	659	GAGGGCGTACCCCTCATAGATGGG	CACCGTGTGGGTGACCCCGTCACCGGAGTCCATCAC	600	
Query	218	GATGCCAGTGGTGCAGGACAGGGC	CATACAGGGACAGCACAGCCTG-ATGGCCACGTACAT	276	
Sbjct	599	GATGCCAGTGGTGCAGGACAGGGC	TACAGGGACAGCACAGCCTGGATGGCCACGTACAT	540	
Query	277	GGCTGGGGTGTGAAAGTCTCGAAC	ATGATCTGGGTATCTTCTCACGGTTGGCCTTGGG	336	
Sbjct	539	GGCTGGGGTGTGAAAGTCTCGAAC	ATGATCTGGGTATCTTCTCACGGTTGGCCTTGGG	480	
					Direto
Query	337	GTTACAGGGGGCCTCGGTGAGCAG	CACCGGGTCTCCTCGGGGGCCA <u>CGCGCAGCTCGTT</u>	396	
Sbjct	479	GTTACAGGGGGCCTCGGTGAGCAG	CACCGGGTCTCCTCGGGGGCCA <u>CGCGCAGCTCGTT</u>	420	
Query	397	<u>GTAGAAG</u>		403	
Sbjct	419	<u>GTAGAAG</u>		413	

FIGURA 6- Resultado da análise de alinhamento da seqüência clonada de β -actina canina com seqüência depositada no banco de dados do GenBank utilizando o programa "Basic Local Alignment Search Tool Program for Nucleotides"- BLAST. Os oligonucleotídeos iniciadores, direto e reverso, estão sublinhados e em negrito.

6.7.2. Interferon- γ canino

CAGACNNCCAGTNNACGA GCTCGGATCACTAGTANTAGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTT **GGAAGACAT**
GCTTGGCAAGTTCTTAAATAGCAGCACCAGTAAGAGGGAGGACTTCCTTAAGCTGATTCAAATTCCTGTGAACGA
TCTGCAGGTCCAGCGCAAGGCGATAAATGAACTCATCAAAGTGATGAATGATCTCTCACCAAGGGCGAATTCTC
 AGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTAC
 AATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCA
 CATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGGCGAGCCTG
 AATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTA
 CACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTTCGCTTCTTCCCTTCCCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTCCCC
 GTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTT

[gi|252492|gb|S41201.1|](#)

Interferon-gamma [dogs, mRNA Partial, 480 nt] Length=480
 Score = 291 bits (147), Expect = 4e-76 Identities = 147/147 (100%),
 Gaps = 0/147 (0%)

		Direto		
Query	67	<u>GGAAGACATGCTTGGCAAGTTC</u>	TTAAATAGCAGCACCAGTAAGAGGGAGGACTTCCTTAA	126
Sbjct	90	<u>GGAAGACATGCTTGGCAAGTTC</u>	TTAAATAGCAGCACCAGTAAGAGGGAGGACTTCCTTAA	149
Query	127	GCTGATTCAAATTCCTGTGAACGATCTGCAGGTCCAGCGCAAGGCGATAAATGAAC TCA		186
Sbjct	150	GCTGATTCAAATTCCTGTGAACGATCTGCAGGTCCAGCGCAAGGCGATAAATGAAC TCA		209
		Reverso		
Query	187	<u>CAAAGTGATGAATGATCTCTCACC</u>	AAG	213
Sbjct	210	<u>CAAAGTGATGAATGATCTCTCACC</u>	AAG	236

FIGURA 7- Resultado da análise de alinhamento da seqüência clonada de IFN- γ canino com seqüência depositada no banco de dados do GenBank utilizando o programa “Basic Local Alignment Search Tool Program for Nucleotides”- BLAST. Os oligonucleotídeos iniciadores, direto e reverso, estão sublinhados e em negrito.

6.7.3. Interleucina-12 canina

```
CAGTACNNCCATTNACGAGCTCGGATCATAGGNTGTA GCCGCCAGTGTGCTGGAATCCGCCCTTAGTGTCTTGT
CCACGCAGAGTCTATCTTTCTTTTCTCTATTGTTCTTGCCCTGGGCCTGTATGCAAAATGTCAGGGAGAAGTAGG
AATGTGGGGTGCTCCAGGTGTCGGGGTATTCCCAGCTGACCTCCACGTGCCGAGAATTTTTCAATGGCTTCAGCT
GCAGGTAAAGGGCGAATTCGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCTATGCATCTAGAGGGCCAATTC
GCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTAC
CCAACCTAATCGCCTTGACACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCC
TTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCATTAAGCGCGCGGGGTGTGGTG
GTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTCTC
GCCACGTTGCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTTACGG
CACCTACGAACCCAAAAAAGTTGATTANGGGTGATGTTACGTTAGTGGGCCATCGCCTGATAGACGGATTAANA
CGCCCTTTGACNNGTAGGAAGTCCACCGGTTCTTTAGTTAGTTGGGACTACTTGGTTCCAAAACCTGGGAACA
AANNAGTCAAAGCCTAANTCTCGGGACTAAATACTTTAGGANTTAATCAAGGGAANTAGG
```

[gi|50979111|ref|NM_001003292.1|](#)

Canis familiaris interleukin-12 p40 subunit mRNA, complete cds Length=1015
Score = 315 bits (159), Expect = 3e-83
Identities = 162/163 (99%), Gaps = 0/163 (0%)

		Reverso	
Query	19	<u>GTCTTGTCACGCAGAGTCT</u> ATCTTTCTTTTCTCTATTGTTCTTGCCCTGGGCCTGTATG	78
Sbjct	884	<u>GTCTTGTCACGCAGAGTCT</u> ATCTTTCTTTTCTCTATTGTTCTTGCCCTGGGCCTGTACG	825
Query	79	CAAAATGTCAGGGAGAAGTAGGAATGTGGGGTGCTCCAGGTGTCGGGGTATTCCCAGCTG	138
Sbjct	824	CAAAATGTCAGGGAGAAGTAGGAATGTGGGGTGCTCCAGGTGTCGGGGTATTCCCAGCTG	765
		Direto	
Query	139	ACCTCCACGTGCCGAGAATTTTT <u>CAATGGCTTCAGCTGCAGGT</u>	181
Sbjct	764	ACCTCCACGTGCCGAGAATTTTT <u>CAATGGCTTCAGCTGCAGGT</u>	722

FIGURA 8- Resultado da análise de alinhamento da seqüência clonada de IL-12 canina com seqüência depositada no banco de dados do GenBank utilizando o programa “Basic Local Alignment Search Tool Program for Nucleotides”- BLAST. Os oligonucleotídeos iniciadores, direto e reverso, estão sublinhados e em negro.

6.7.4. Interleucina-4 canina

TGCACGAAACACCCTTGACGANCTCGGATCCNTAGNATTAACGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTGCCTGACAG
 TACAGTAGCAGCTCTGCAGAAGATTTTCCTTATCGCTTGTGTATCTTTGGAGCAGTGAAGACGTCCTTGACAGTCA
 GCTCCATGCACGAGTCGTTTCTCGCTGTGAGGAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCG
 AGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAAGTTCGTTTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
 GTGACTGGGAAAACCCGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATA
 GCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGG
 CGCATTAAAGCGCGCGGGTGTAGGTAGTTACGCGCAGCGTGACCGGTACACTTGCAGCGCCCTAGCGCCCGCT
 CCTTTCGCTTTCTCCCTTCCCTTCTCGCCACGTTGCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAANATCGGGGCTCCC
 TTTAAGGTTCCGATTTAGTGTCTTACGGNACCTCGACCCGAAAACTTGATTANCGGTTGATGGTTACGTATG
 GGNCAATAGGNCACTGATAGACCGTATNTTANACAGGCGCCCATTTTGNAGCACAGCNTTTTGGAAAGANTTCCC
 AAACGGGTTTCCCTTTATATAAGTAAGCTATGAGACACATACCTAAGGGTATTACCACAAACCTTGGGGAAACCC
 ACACNANCGTCNAAAAAGCCNAATTACTACAGGGCCACATAAAATACCANTATANGAAACTATTAATTAC

gi|7330263|gb|AF239917.1|AF239917

Canis familiaris interleukin-4 mRNA, complete cds, Length=580
 Score = 204 bits (103), Expect = 8e-50 Identities = 110/111 (99%),
 Gaps = 1/111 (0%)

		Reverso			
Query	23	<u>CAGTACAGTAGCAGCTCT</u>	GCAGAAGATTTTCCTTATCGCTTGTGTATCTTTGGAGCAGTGA		82
Sbjct	291	<u>CAGTACAGTAGCAGCTCT</u>	GCAGAAGATTTTCCTTATCGCTTGTGT-TCTTTGGAGCAGTGA		233
		Direto			
Query	83	AGACGTCCTTGACAGTCAGCTCCATGCAC	<u>GAGTCGTTTCTCGCTGTGAGGA</u>		133
Sbjct	232	AGACGTCCTTGACAGTCAGCTCCATGCAC	<u>GAGTCGTTTCTCGCTGTGAGGA</u>		182

FIGURA 9 -Resultado da análise de alinhamento da seqüência clonada de IL-4 canina com seqüência depositada no banco de dados do GenBank utilizando o programa “Basic Local Alignment Search Tool Program for Nucleotides”- BLAST. Os oligonucleotídeos iniciadores, direto e reverso, estão sublinhados e em negrito.

6.7.5. Interleucina-10 canina

GAGGCAAAGTATAGGGCG**ACCACGACCCAGACATCAAGA**ACCACGTGAACTCCCTGGGAGAGAAGCTCAAGACCC
TCAGGCTGAGGCTGCGACGCTGTCACCGATTCTGCCCTGTGAGAATAAGAGCAAGGCGGTGGAGCAGGTGAAGA
GCGCATTTAGTAAGCTCCAGGCCAGTCGGGAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGG
 AGAGGCGGTTGCTATGGCGTCTCCGTTCCCTCATGATCCTGCCTCGTTCGGTGCACAACGGACACTATCAGG
 GTATAGTTTCCCAATCGGGATACCCGAAAAATGACAAAGCACAAAGGCACCTAAAGCCGTTCGGGTTTCAGGCCCC
 CCTAAAAAAAAAAGCCATAAGGGACCGAGGATAGACCGGTCGCCATCCGCGCCCTTACGCTAGACGCCTTCCTGA
 CGGGTCAAAC

[ref|XM_850467.1|](#) Canis familiaris interleukin 10 (IL10), mRNA Length=742
 Score = 277 bits (306), Expect = 1e-71, Identities = 153/153 (100%), Gaps =
 0/153 (0%)

	Direto	
Query 1	<u>ACCACGACCCAGACATCAAGA</u> ACCACGTGAACTCCCTGGGAGAGAAGCTCAAGACCCCTCA	60
Sbjct303	<u>ACCACGACCCAGACATCAAGA</u> ACCACGTGAACTCCCTGGGAGAGAAGCTCAAGACCCCTCA	362
Query 61	GGCTGAGGCTGCGACGCTGTCACCGATTCTGCCCTGTGAGAATAAGAGCAAGGCGGTGG	120
Sbjct363	GGCTGAGGCTGCGACGCTGTCACCGATTCTGCCCTGTGAGAATAAGAGCAAGGCGGTGG	422
	Reverso	
Query121	AGCAGGTGAAG <u>AGCGCATTTAGTAAGCTCCAGG</u>	153
Sbjct423	AGCAGGTGAAG <u>AGCGCATTTAGTAAGCTCCAGG</u>	455

FIGURA 10- Resultado da análise de alinhamento da seqüência clonada de IL-10 canina com seqüência depositada no banco de dados do GenBank utilizando o programa “Basic Local Alignment Search Tool Program for Nucleotides”- BLAST. Os oligonucleotídeos iniciadores, direto e reverso, estão sublinhados e em negrito.

6.7.6. Fator de crescimento transformante- β canino

GTGCCTGACACCCTGAGACTCGGATCNCCTAGGTTTACCGCCAGTGTGCTGGAATNCCCCCGTAGTTAAAAGCGGA
GCAGCATGTGGAGCTGTACCAGAAATATAGCAATGATTCCTGGCGCTACCTCAGCAACCGGCTGCTGGCGCCAG
CGACACGCCAGAATGGCTGTCTTTGATGTCACTGGAGTCGTGAGGCAGTGGCTGAGCCATGGAGGGGAAGTCGA
GGGCTTTCGCCTCAGTGCCCACTGTTCTGTGACAGCAAAGATAACACACTGCAAGTAGACATTAACGGGTTTCAG
TTCCAGCCGCCGAGGTGACCTGGCCACCATTTCATGGCATGAACCGACCCTTCCTGCTCCTCATGGCCACCCCACT
GGAGAGGGCCCAGCACCTGCACAGCTCCCGGCAGCGCCGGGCCCTGGACACCAACTACTGCTTCAGCTCCACAGG
AGAAGAACTGCTGCAGTCCGGCAGACTCTACATNGACTTCCGCAAGGATCAAGGGCGAATTCTGCAAGATATCCA
TCAACTTGGCAGGACAGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAAATTACGCNCCTATAGTGAGTC

[gb|L34956.1|DOGTFB1A](#)

Canine transforming growth factor-beta 1 (TGF β 1) mRNA, complete cds
Length=1369, Score = 764 bits (846), Expect = 0.0, Identities = 434/438
(99%), Gaps = 3/438 (0%)

		Direto		
Query	1	AGTTAAAAGCGGAGCAGCATGTGG	AGCTGTACCAGAAATATAGCAATGATTCTGGCGCT	60
Sbjct	539	AGTTAAAAGCGGAGCAGCATGTGG	AGCTGTACCAGAAATATAGCAATGATTCTGGCGCT	598
Query	61	ACCTCAGCAACCGGCTGCTGGCGCCAGCGACACGCCAGAATGGCTGTCTTTGATGTCA		120
Sbjct	599	ACCTCAGCAACCGGCTGCTGGCGCCAGCGACACGCCAGAATGGCTGTCTTTGATGTCA		658
Query	121	CTGGAGTCGTGAGGCAGTGGCTGAGCCATGGAGGGGAAGTCGAGGGCTTTCGCCTCAGTG		180
Sbjct	659	CTGGAGTCGTGAGGCAGTGGCTGAGCCATGGAGGGGAAGTCGAGGGCTTTCGCCTCAGTG		718
Query	181	CCCACTGTTCTGTGACAGCAAAGATAACACACTGCAAGTAGACATTAACGGGTTTCAGTT		240
Sbjct	719	CCCACTGTTCTGTGACAGCAAAGATAACACACTGCAAGTAGACATTAACGGGTTTCAGTT		778
Query	241	CCAGCCGCCGAGGTGACCTGGCCACCATTTCATGGCATGAACCGACCCTTCCTGCTCCTCA		300
Sbjct	779	CCAGCCGCCGAGGTGACCTGGCCACCATTTCATGGCATGAACCGACCCTTCCTGCTCCTCA		838
Query	301	TGGCCACCCCACTGGAGAGGGCCCAGCACCTGCACAGCTCCCGGCAGCGCCGGGCCCTGG		360
Sbjct	839	TGGCCACCCCACTGGAGAGGGCCCAGCACCTGCACAGCTCCCGGCAGCGCCGGGCCCTGG		898
Query	361	ACACCAACTACTGCTTCAGCTCCACAGGAGAAGAAGTCTGCTGCAGTCCGGCAGACTCTACA		420
Sbjct	899	ACACCAACTACTGCTTCAGCTCCAC-GGAGAAGAAGTCTGCTGC-GTCCGGCAG-CTCTACA		955
		Reverso		
Query	421	TNGACTTCCGCAAGGATC		438
Sbjct	956	TTGACTTCCGCAAGGATC		973

FIGURA 11 - Resultado da análise de alinhamento da sequência clonada de TGF- β canino com sequência depositada no banco de dados do GenBank utilizando o programa "Basic Local Alignment Search Tool Program for Nucleotides"- BLAST. Os oligonucleotídeos iniciadores, direto e reverso, estão sublinhados e em negrito.

6.7.7. Fator de necrose tumoral- α canino

TGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTGCGCCTTTACTCTTCTGC
 CTGCTGCACTTTGGAGTGATCGGCCCCCCAGAGGAAGAGCTCCCAAATTGCCTCCAATAATCAGCCCTCTTGCC
 CAGACAGTCAAATCATCTTCTCGAACCCCAAGTGACAAGCCAGTAGCTCATGTTGTAGCAAACCCCGAAGCTGAG
 GGGCAGCTCCAGTGGCTGAGCCGACGTGCCAATGACCTCCTGGCCAATGACGTGGAGCTGACAGACAACCAGCTG
 ATAGTGCCGTGAGATGGGTTGTACCTCGATAGCTCCCAGGTCTCTTCAAGGGCCAAGGGTGCCCTTCCACCCAT
 GTGCTCCTCACCCACACCATCAGCCGCTTCGCCGTCTCTACCAGACAAAGGTCAACGCACACTGGCGGCCGTTA
 CTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTATCCG
 CTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCT

[gb|S74068.1|](#) Canine tumor necrosis factor alpha [mRNA Partial, 719 nt]
 Length=719, Score = 663 bits (734), Expect = 0.0 Identities = 367/367
 (100%), Gaps = 0/367 (0%)

	Direto	
Query 1	<u>ACTCTTCTGCCTGCTGCACTTTGG</u> AGTGATCGGCCCCCCAGAGGAAGAGCTCCCAAATTG	60
Sbjct149	<u>ACTCTTCTGCCTGCTGCACTTTGG</u> AGTGATCGGCCCCCCAGAGGAAGAGCTCCCAAATTG	208
Query61	CCTCCAATAATCAGCCCTCTTGCCAGACAGTCAAATCATCTTCTCGAACCCCAAGTGA	120
Sbjct209	CCTCCAATAATCAGCCCTCTTGCCAGACAGTCAAATCATCTTCTCGAACCCCAAGTGA	268
Query121	CAAGCCAGTAGCTCATGTTGTAGCAAACCCCGAAGCTGAGGGGCAGCTCCAGTGGCTGAG	180
Sbjct269	CAAGCCAGTAGCTCATGTTGTAGCAAACCCCGAAGCTGAGGGGCAGCTCCAGTGGCTGAG	328
Query181	CCGACGTGCCAATGACCTCCTGGCCAATGACGTGGAGCTGACAGACAACCAGCTGATAGT	240
Sbjct329	CCGACGTGCCAATGACCTCCTGGCCAATGACGTGGAGCTGACAGACAACCAGCTGATAGT	388
Query241	GCCGTCAGATGGGTTGTACCTCGATAGCTCCCAGGTCTCTTCAAGGGCCAAGGGTGCCC	300
Sbjct389	GCCGTCAGATGGGTTGTACCTCGATAGCTCCCAGGTCTCTTCAAGGGCCAAGGGTGCCC	448
Query301	TTCCACCCATGTGCTCCTCACCCACACCATCAGCCGCTTCG <u>CCGTCTCCTACCAGACAAA</u>	360
Sbjct449	TTCCACCCATGTGCTCCTCACCCACACCATCAGCCGCTTCG <u>CCGTCTCCTACCAGACAAA</u>	508
	Reverso	
Query361	<u>GGTCAAC</u>	367
Sbjct509	<u>GGTCAAC</u>	515

FIGURA 12-Resultado da análise de alinhamento da sequência clonada de TNF- α canino com sequência depositada no banco de dados do GenBank utilizando o programa “Basic Local Alignment Search Tool Program for Nucleotides”- BLAST. Os oligonucleotídeos iniciadores, direto e reverso, estão sublinhados e em negrito.

6.7.8. Leishmania chagasi

GATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGAATATAGCAGAATTCGCCCTT**TGTCGCTTGCAGACCAGATGCAG**
CTGCAGGGGATTACGAAGGGCAGCAACAACCTTCGAGCCTGGCACCTCGGTGCTCACACCTGCGATGCAAGGGCGAA
 TTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTT
 TCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGT
 GCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCACTCGGGAAACCTGTCGTGCC
 ATCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCTCTTCTCGCTCAC
 TGA

[gb|AF009147.1|AF009147](#) *Leishmania infantum* DNA polymerase alpha gene,
 partial cds, Length=924
 Score = 167 bits (90), Expect = 6e-39, Identities = 90/90 (100%), Gaps =
 0/90 (0%)

Query	1	<u>TGTCGCTTGCAGACCAGATG</u>	CAGCTGCAGGGGATTACGAAGGGCAGCAACAACCTTCGAGC	60
Sbjct	185	<u>TGTCGCTTGCAGACCAGATG</u>	CAGCTGCAGGGGATTACGAAGGGCAGCAACAACCTTCGAGC	244
Query	61	CTGGCACCTCG <u>GTGCTCACACCTGCGATGC</u>	90	
Sbjct	245	CTGGCACCTCG <u>GTGCTCACACCTGCGATGC</u>	274	

FIGURA 13- Resultado da análise de alinhamento da seqüência clonada de *Leishmania chagasi* (sin. *L. infantum*) com seqüência depositada no banco de dados do GenBank utilizando o programa “Basic Local Alignment Search Tool Program for Nucleotides”- BLAST. Os oligonucleotídeos iniciadores, direto e reverso, estão sublinhados e em negrito.

6.8. Construção das curvas-padrão

As concentrações das amostras dos vetores carreando os insertos de β -actina, IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-10, TGF- β , TNF- α , e *L. chagasi* foram calculadas e o número de moléculas destas amostras determinadas segundo os cálculos descritos no ítem 5.4.4.1.

O vetor utilizado foi o pCR[®] 2.1-TOPO (Invitrogen, RU) que apresenta 3900pb (FIG.1). Este número foi somado ao número de pares de bases de cada inserto (QUADRO 6) para a realização destes cálculos. Após a determinação do número de moléculas em cada amostra, essas foram diluídas sucessivamente. Foram feitas, em duplicata, reações de PCR em tempo real com as amostras contendo de 10^1 a 10^9 moléculas que constituíram as curvas-padrão.

A curva-padrão obtida para β -actina que foi utilizada para averiguar a integridade dos cDNAs e DNAs e para normalizar a quantidade de material em todas as amostras está representada na FIG. 13. As demais curvas também apresentaram linearidade com valores de r^2 próximos de 1, permitindo a quantificação das citocinas e do parasitismo nos órgãos em estudo.

QUADRO 6

Inserto de β -actina, das citocinas estudadas e do gene da DNA polimerase de *Leishmania chagasi* com seus respectivos números de pares de bases.

INSERTO	Número de pares de bases
β -actina	307
IFN- γ	144
IL-4	111
IL-10	153
IL-12	165
TNF- α	367
TGF- β	435
<i>L. chagasi</i>	90

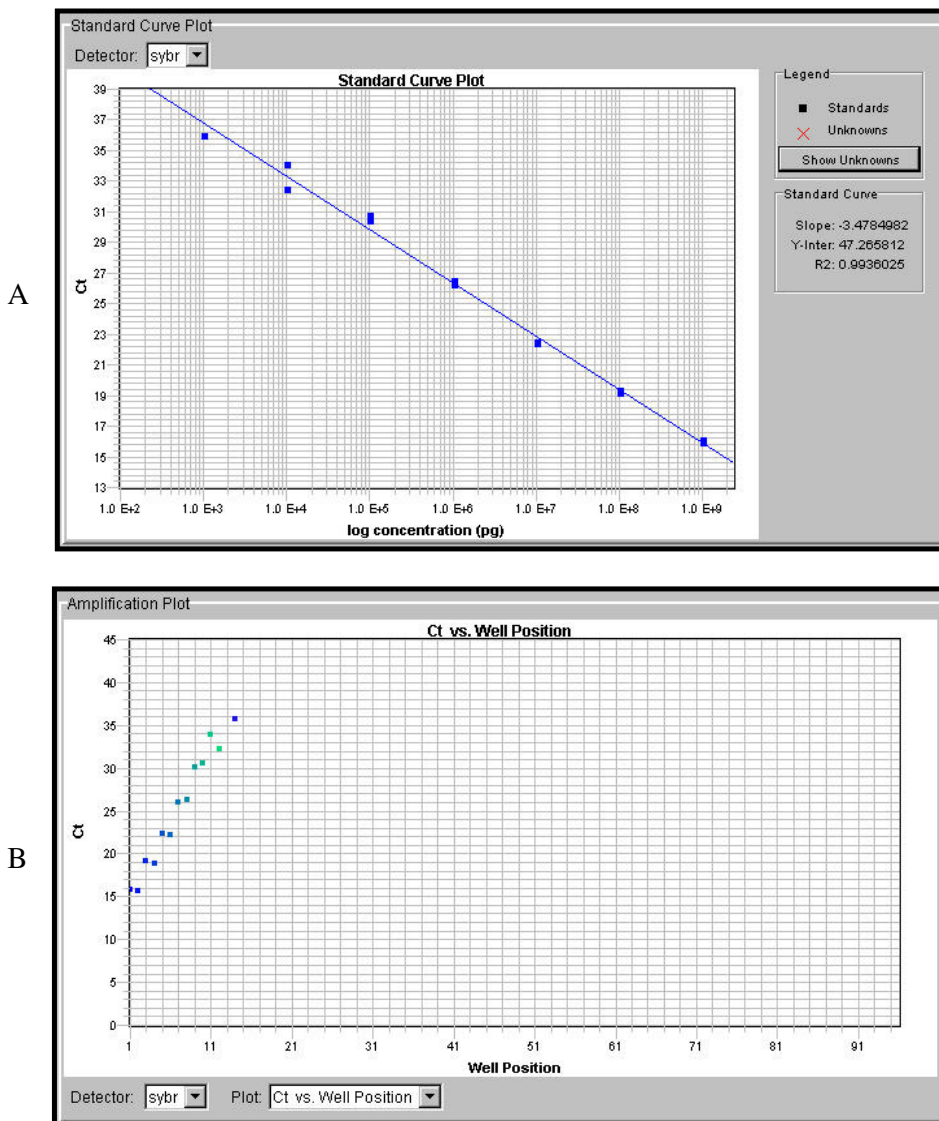


FIGURA 14- Curva-padrão de β -actina construída a partir de amostras com concentrações conhecidas do fragmento do cDNA de β -actina canina ligado ao vetor, variando entre 10^9 a 10^1 moléculas. A) Figura do programa *Sequence Detection System* (SDS) representativa da plotagem do log das concentrações das amostras X Ct. B) Figura do programa SDS representativa da plotagem das amostras em seus respectivos poços X Ct.

6.9. PCR em tempo real: Determinação do perfil de citocinas

Visando verificar a integridade e a qualidade dos cDNAs produzidos pela RT-PCR, foram realizadas reações de PCR em tempo real, utilizando os iniciadores específicos para β -actina. Todas estas reações foram realizadas em duplicata para todos os cDNAs, produzidos a partir de RNA total extraído de amostras de baço, fígado, linfonodo cervical superficial, medula óssea e pele de orelha dos cães dos três grupos experimentais.

Aquelas amostras, em que não ocorreu amplificação do fragmento de β -actina, foram substituídas por novos cDNAs produzidos a partir de novo RNA total extraído de outro fragmento do mesmo órgão.

Quando todas as amostras apresentaram amplificação com os iniciadores para β -actina, confirmando sua integridade, estes cDNAs foram, então, utilizados para as reações das citocinas em estudo.

As reações de amplificação de β -actina também foram utilizadas como normalizadoras das quantidades de cDNA de cada amostra. Para isso, para cada órgão, aquela amostra com menor número de moléculas foi selecionada como base e os demais valores das outras amostras foram divididos por este valor base. Estes cálculos permitiram a determinação de fatores de correção para cada amostra, que foram utilizados para corrigir as quantidades determinadas para cada citocina.

Esta padronização com o gene da β -actina também foi realizada, da mesma forma, em todas as amostras de DNAs extraídos dos mesmos órgãos, para a quantificação da carga parasitária.

Após a realização das reações de amplificação do fragmento gene normalizador, de todas as citocinas em estudo e do fragmento gene de cópia única de *L. chagasi*, as temperaturas das reações foram elevadas até que ocorresse a desnaturação do material amplificado.

O SYBR Green é um corante fluorogênico que se liga a qualquer dupla-fita de DNA, detectando não apenas as fitas de DNA alvo, mas também produtos de PCR inespecíficos e dímeros de iniciadores. Desta forma, caso exista nas reações a presença destes contaminantes, a desnaturação após a amplificação apresentará mais de um pico, o que invalidaria as reações.

Os gráficos de dissociação temperatura-dependente, para todas citocinas, para β -actina e para o gene de *L. chagasi*, revelaram que a fluorescência foi emitida apenas em uma temperatura, com a formação de um único pico, demonstrando que só um produto foi gerado em cada reação. Isto foi possível após a padronização das quantidades de cada iniciador utilizado nas reações.

Os resultados do perfil de citocinas foram agrupados por órgão estudado e estão descritos a seguir.

6.9.1. Baços

Os níveis de expressão de IFN- γ foram avaliados em amostras de baço dos cães dos três grupos experimentais e estão plotados no GRÁF. 12-A. As médias dos valores expressos de IFN- γ , encontrados nos cães naturalmente infectados por *L. chagasi* dos grupos SEC e CEC, foram significativamente superiores às verificadas no grupo controle NI ($p < 0,05$), mas não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$).

A expressão de IL-12, em amostras de baço dos cães em estudo, está representada no GRÁF. 12-B. Quando as médias dos valores expressos de IL-12 nos diferentes grupos foram comparadas, verificou-se que o grupo de cães CEC apresentou média de níveis estatisticamente superiores à apresentada pelo grupo de cães controle NI ($p < 0,05$) (GRÁF. 12-B). Embora estes níveis tenham sido superiores aos do grupo de cães SEC, esta diferença encontrada não foi significativa ($p > 0,05$). O grupo de cães SEC também apresentou médias superiores ao grupo de cães controle ($p < 0,05$).

O GRÁF. 12-C representa a expressão de IL-4 nos baços dos cães em estudo. Quando as médias dos valores de IL-4 foram comparadas entre os grupos, constatou-se que, embora a média encontrada no grupo de cães CEC tenha sido superior a média dos cães SEC, a diferença encontrada entre estes grupos não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Estes dois grupos também não apresentaram diferença significativa das médias de IL-4 em relação ao grupo controle NI.

A avaliação da expressão de IL-10 nos baços dos cães (GRÁF. 12-D) revelou que os grupos SEC e CEC apresentaram médias de valores significativamente

superiores ao grupo de cães NI ($p < 0,05$). No entanto, embora as médias do grupo CEC tenham sido ligeiramente superiores às dos cães SEC, a diferença entre eles não foi significativa.

Os níveis de expressão de TGF- β , nos três grupos experimentais, estão representados no GRÁF. 12-E. Quando as médias de expressão destes grupos foram comparadas, observou-se que o grupo de cães CEC apresentou valores estatisticamente superiores aos demais grupos ($p < 0,05$). Já os grupos NI e SEC apresentaram médias sem diferença significativa entre si ($p > 0,05$).

O GRÁF. 12-F mostra os níveis de expressão de TNF- α nas amostras de baço. A média de expressão desta citocina no grupo de cães NI foi significativamente inferior em relação aos dois grupos de cães naturalmente infectados ($p < 0,05$). Além disso, a média de TNF- α no grupo SEC foi significativamente superior em relação ao grupo CEC ($p < 0,05$).

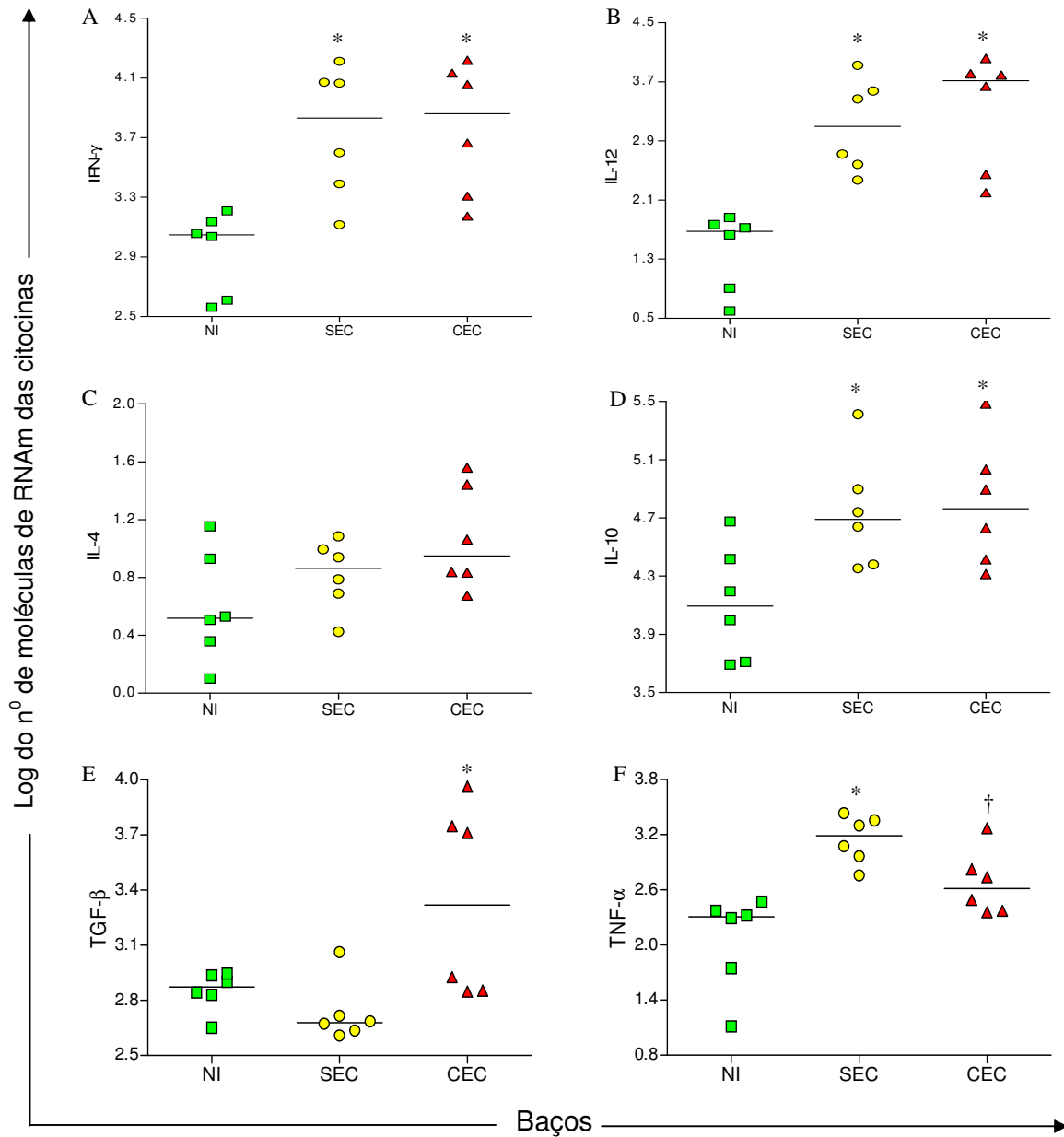


GRÁFICO 12- Avaliação da expressão de citocinas em amostras de baços dos cães do grupo controle não infectados (NI) e dos cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* dos grupos sem expressão clínica (SEC) e com expressão clínica (CEC). Logaritmo do número de moléculas de RNA mensageiro de: A) IFN- γ , B) IL-12, C) IL-4, D) IL-10, E) TGF- β e F) TNF- α .

*/†: Grupo difere dos demais ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Kruskal-Wallis.

6.9.2. Fígados

Os níveis de expressão das citocinas estudadas, nos fígados dos cães dos três grupos experimentais, estão representados nos GRÁF. 13A-F.

As médias de expressão de IFN- γ (GRÁF. 13-A) foram significativamente inferiores no grupo de cães NI ($p < 0,05$) em relação aos cães naturalmente infectados ($p < 0,05$). Quando os grupos SEC e CEC foram comparados, constatou-se que embora os cães SEC apresentassem médias superiores em relação aos CEC, estes valores não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

Os níveis de expressão de IL-12 estão representados no GRÁF. 13-B. A comparação das médias dos valores encontrados para os três grupos, revelou que não existiu diferença de expressão desta citocina entre eles ($p > 0,05$).

Os níveis de expressão de IL-4 representados no GRÁF. 13-C, demonstraram que não houve diferença nestes níveis entre os cães NI e os cães SEC ($p > 0,05$). Já as médias de expressão de IL-4, no grupo CEC, foram estatisticamente superiores às médias dos demais grupos ($p < 0,05$).

A expressão de IL-10 em amostras de fígado (GRÁF. 13-D) mostrou um perfil semelhante ao verificado para IL-4, ou seja, o grupo de cães CEC apresentou médias de IL-10 significativamente superiores aos grupos NI e SEC ($p < 0,05$) que no entanto, não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$).

Os níveis de expressão de TGF- β , nos fígados dos cães em estudo, estão descritos no GRÁF. 13-E. As médias destes valores no grupo de cães NI foram significativamente inferiores às dos grupos SEC e CEC ($p < 0,05$), que, no entanto, não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$). Já quando os níveis de

expressão de TNF- α foram comparados (GRÁF. 13-F), verificou-se que não houve diferença significativa entre os fígados dos três grupos experimentais ($p>0,05$).

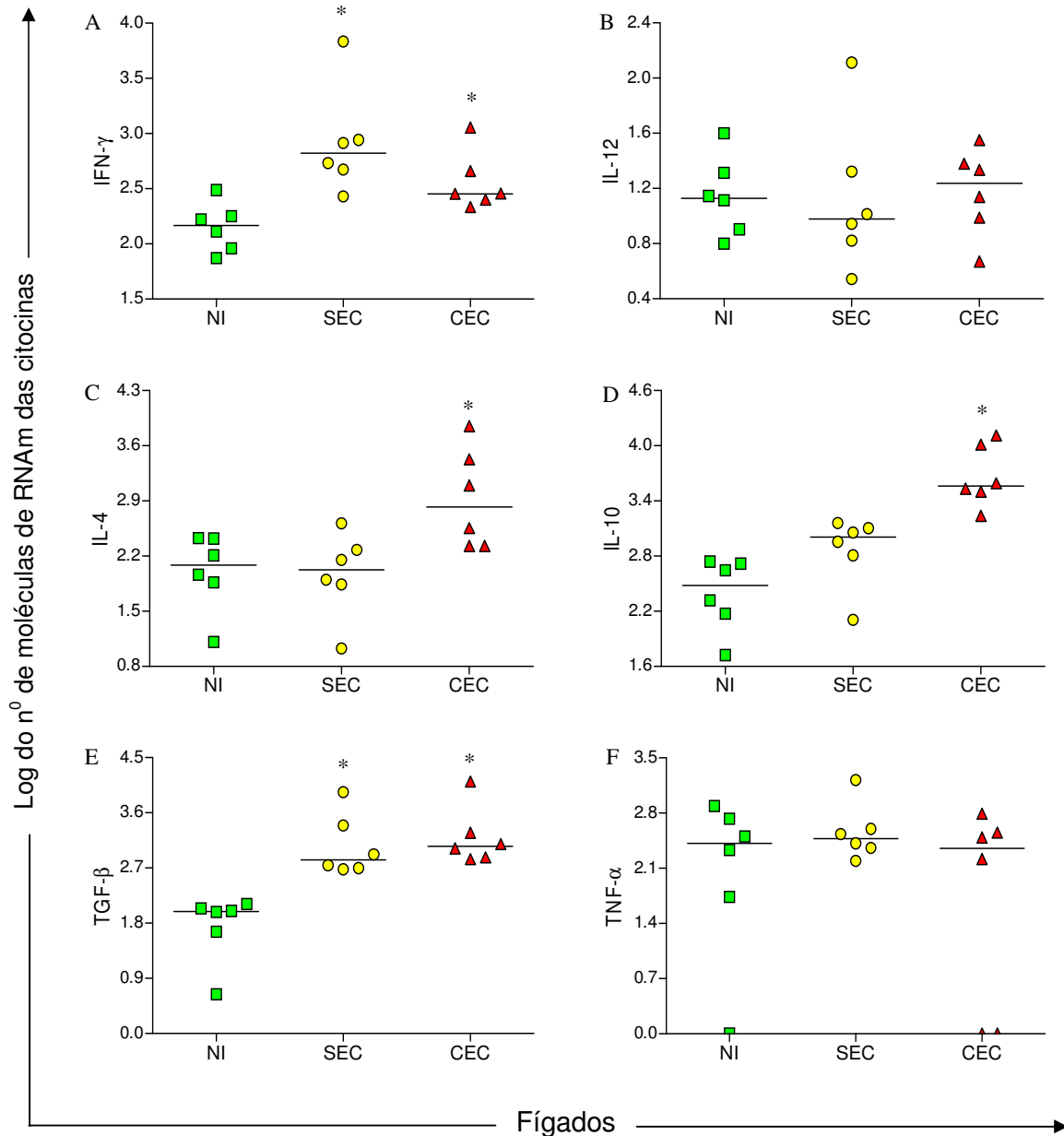


GRÁFICO 13 - Avaliação da expressão de citocinas em amostras de fígados dos cães do grupo controle não infectados (NI) e dos cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* dos grupos sem expressão clínica (SEC) e com expressão clínica (CEC). Logaritmo do número de moléculas de RNA mensageiro de: A) IFN- γ , B) IL-12, C) IL-4, D) IL-10, E) TGF- β e F) TNF- α . * Grupo difere dos demais ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Kruskal-Wallis.

6.9.3. Linfonodos cervicais superficiais

Os níveis de expressão de citocinas, em amostras de linfonodos dos cães em estudo, estão representados nos GRÁF. 14 A-F.

A expressão de IFN- γ (GRÁF. 14-A) foi significativamente superior nos linfonodos dos cães SEC em relação aos níveis verificados nos cães NI e CEC ($p < 0,05$), que, no entanto, não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$).

Os níveis de expressão de IL-12 (GRÁF. 14-B) nos linfonodos dos cães em estudo, demonstraram que não houve diferença significativa entre os três grupos experimentais ($p > 0,05$). De forma semelhante, não houve diferença significativa nos níveis de IL-4 nas amostras de linfonodos dos cães dos três grupos experimentais (GRÁF. 14-C).

A expressão de IL-10 nos linfonodos dos cães está representada no GRÁF. 14-D. As médias dos valores de IL-10 nos grupos de cães NI e SEC não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$). Já as médias dos valores do grupo de cães CEC foram significativamente superiores às médias dos outros dois grupos ($p < 0,05$).

Os níveis de expressão de TGF- β nos linfonodos dos cães em estudo estão representados no GRÁF. 14-E. O grupo de cães NI apresentou médias dos valores de expressão significativamente inferiores aos demais grupos ($p < 0,05$). Quando as médias de expressão de TGF- β foram comparadas entre os dois grupos de cães naturalmente infectados, constatou-se que estas médias foram significativamente superiores no grupo de cães CEC em relação ao grupo SEC ($p < 0,05$).

Quando as médias de expressão de TNF- α (GRÁF. 14-F) foram comparadas entre as amostras de linfonodo dos cães dos três grupos experimentais, verificou-se que estas médias foram significativamente superiores no grupo SEC ($p < 0,05$) em relação aos grupos NI e CEC, que não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$).

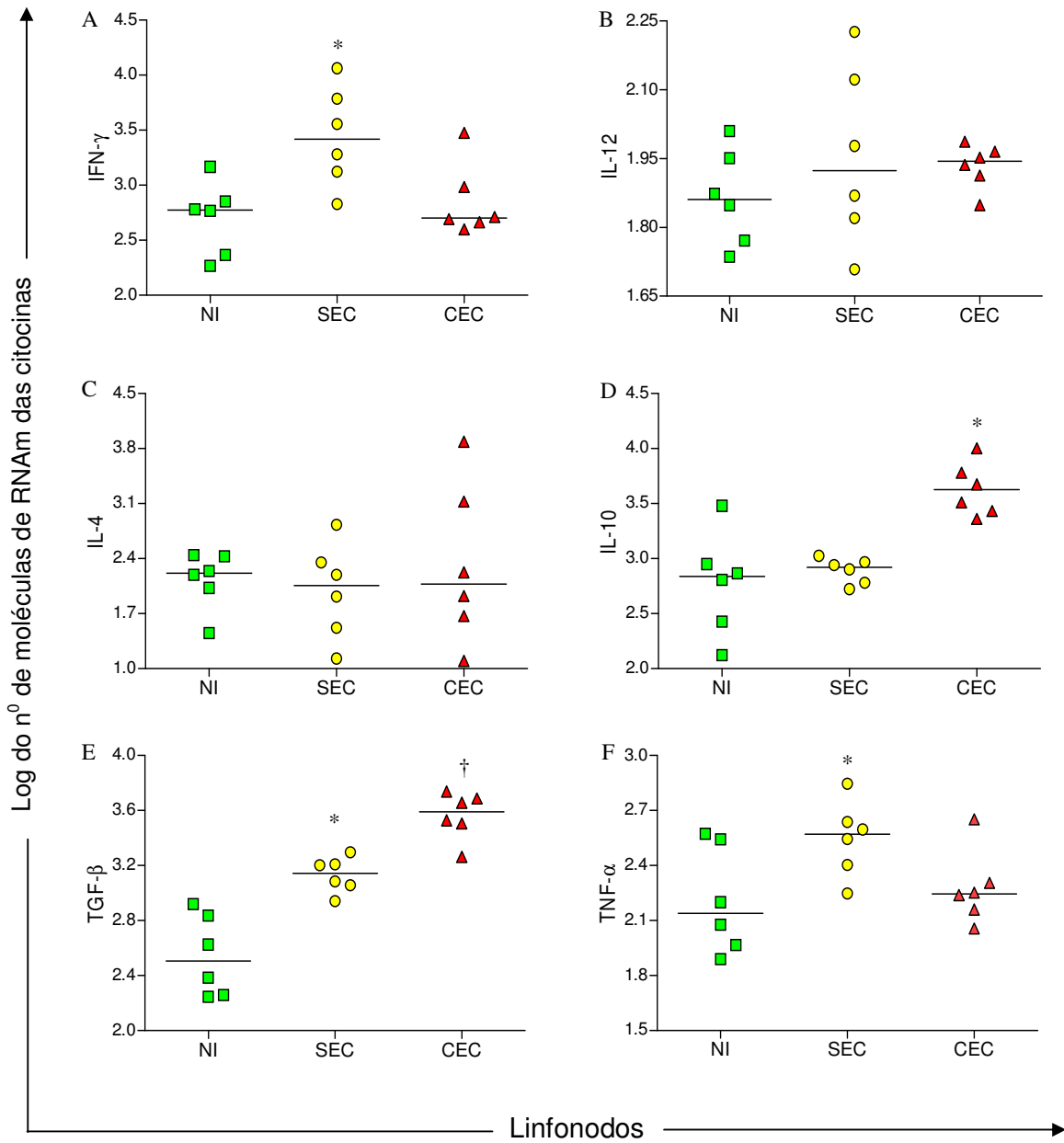


GRÁFICO 14- Avaliação da expressão de citocinas em amostras de linfonodos cervicais superficiais dos cães

do grupo controle não infectados (NI) e dos cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* dos grupos sem expressão clínica (SEC) e com expressão clínica (CEC). Logaritmo do número de moléculas de RNA mensageiro de: A) IFN- γ , B) IL-12, C) IL-4, D) IL-10, E) TGF- β e F) TNF- α . */†: Grupo difere dos demais ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Kruskal-Wallis.

6.9.4. Medulas ósseas

A expressão de IFN- γ também foi avaliada em amostras de medula óssea destes cães (GRÁF. 15-A). Quando as médias dos valores, verificadas no grupo de cães SEC, foram comparadas com aquelas do grupo controle NI, não foi verificada diferença significativa ($p>0,05$). Já o grupo de cães CEC apresentou valores significativamente superiores aos encontrados no grupo de cães SEC e no grupo controle ($p<0,05$).

Quando as médias de IL-12 foram comparadas em amostras de medula óssea dos cães (GRÁF. 15-B), constatou-se que tanto no grupo de animais SEC quanto CEC, as médias foram significativamente superiores às encontradas no grupo de cães controle NI ($p<0,05$). No entanto, estes dois grupos não apresentaram diferenças estatísticas entre si ($p>0,05$).

Quando a expressão de IL-4 foi avaliada em amostras de medula óssea dos cães dos três grupos (GRÁF. 15-C), verificou-se que o grupo de cães CEC apresentou média significativamente superior àquela encontrada no grupo controle NI ($p<0,05$). No entanto, a média dos valores de IL-4 verificada nos cães SEC, não apresentou diferença significativa em relação aos grupos controle e CEC ($p>0,05$).

As médias de expressão de IL-10 (GRAF. 15-D), tanto no grupo de cães SEC quanto no grupo de cães CEC, foram significativamente superiores à média do grupo de cães NI ($p<0,05$). No entanto, as médias destes dois grupos não foram significativamente diferentes entre si ($p>0,05$), embora, tenha sido verificada uma média mais alta nas medulas dos cães CEC.

As médias de expressão de TGF- β (GRÁF. 15-E) foram significativamente superiores no grupo de cães CEC ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos que, no entanto, não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$). Já quando as médias dos níveis de TNF- α foram comparadas entre os três grupos experimentais (GRÁF.15-F), foram verificadas médias superiores no grupo de cães SEC em relação aos grupos NI e CEC ($p < 0,05$), que, no entanto não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$).

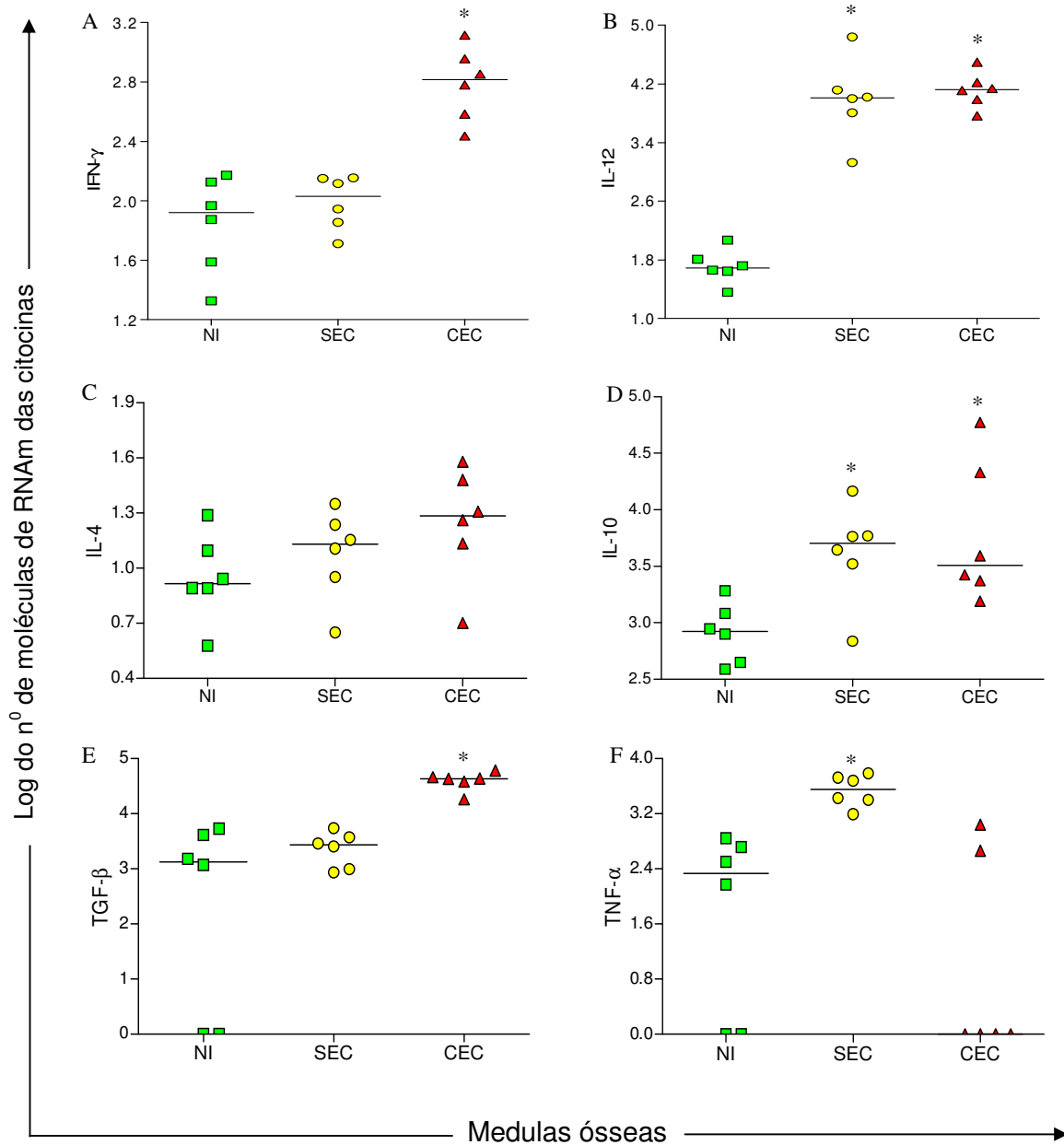


GRÁFICO 15- Avaliação da expressão de citocinas em amostras de aspirados medulas ósseas dos cães do grupo controle não infectados (NI) e dos cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* dos grupos sem expressão clínica (SEC) e com expressão clínica (CEC). Logaritmo do número de moléculas de RNA mensageiro de: A) IFN- γ , B) IL-12, C) IL-4, D) IL-10, E) TGF- β e F) TNF- α . * Grupo difere dos demais ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Kruskal-Wallis.

6.9.5. Peles de orelha

Os níveis de expressão das citocinas em estudo, em amostras de pele de orelha dos cães dos grupos NI, SEC e CEC, estão representados nos GRÁF. 12A-F.

As médias dos níveis de IFN- γ (GRÁF. 16-A) dos cães dos grupos NI e SEC não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). Já as médias de expressão desta citocina nas amostras de pele de orelha dos cães do grupo CEC foram significativamente superiores em relação aos outros dois grupos ($p > 0,05$).

Quando as médias dos níveis de expressão de IL-12 (GRÁF. 16-B) foram comparadas entre os grupos NI, SEC e CEC, verificou-se que não houve diferença significativa entre eles ($p > 0,05$).

Já quando os níveis de expressão de IL-4 (GRÁF. 16-C) e IL-10 (GRÁF. 16-D) foram comparados entre os três grupos em estudo, verificou-se para ambas citocinas, médias de expressão superiores no grupo CEC ($p < 0,05$) em relação tanto ao grupo NI quanto ao grupo SEC que, no entanto, não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$).

Os níveis de expressão de TGF- β (GRÁF. 16-E) foram significativamente inferiores no grupo de cães NI em relação aos demais ($p < 0,05$). Além disso, as médias de expressão desta citocina foram significativamente superiores no grupo de cães CEC em relação ao grupo SEC ($p < 0,05$).

A expressão de TNF- α nas amostras de pele de orelha (GRÁF. 16-F) revelou valores superiores desta citocina no grupo CEC ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos que não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$).

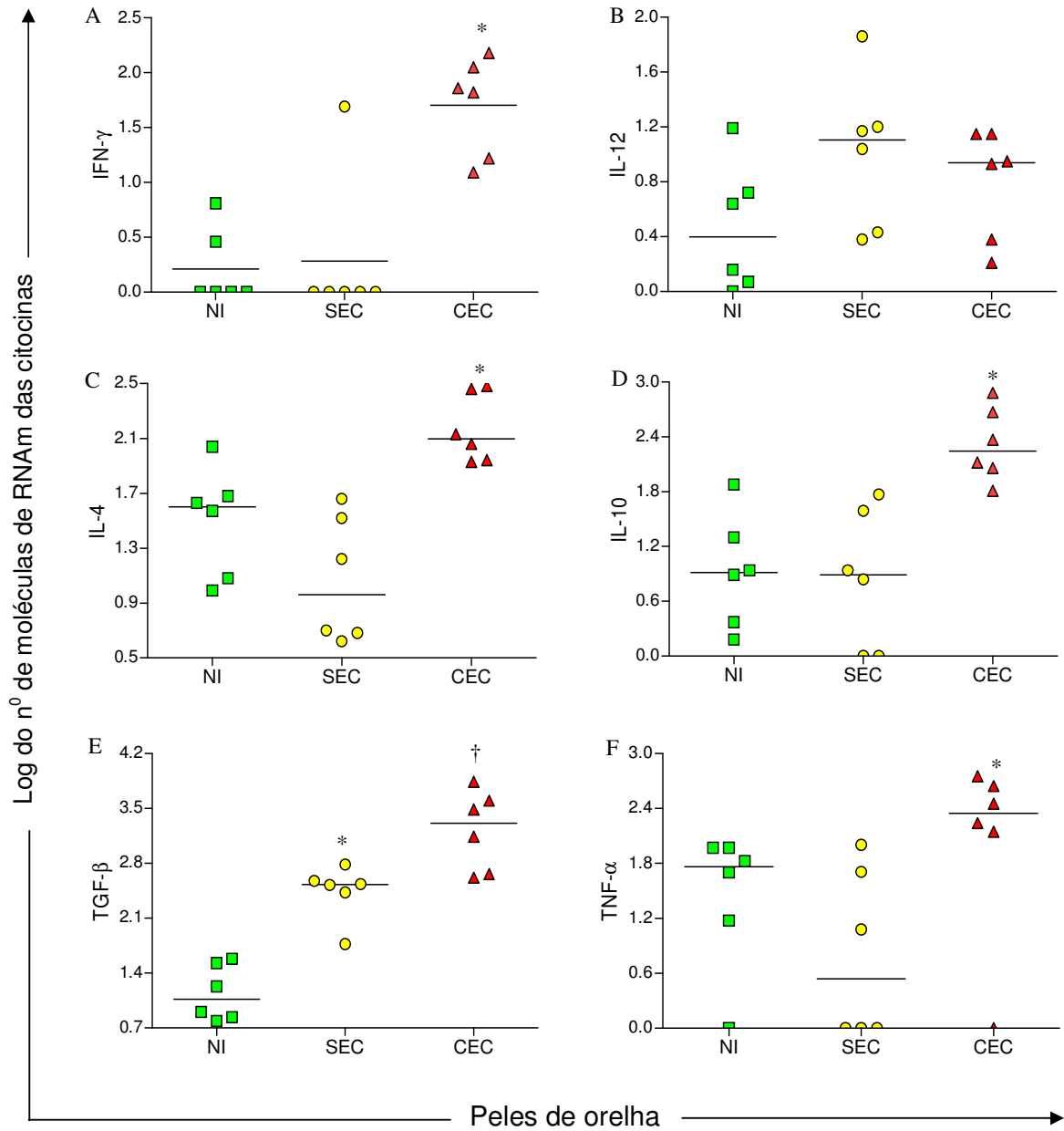


GRÁFICO 16- Avaliação da expressão de citocinas em amostras de peles de orelha dos cães do grupo

controle não infectados (NI) e dos cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* dos grupos sem expressão clínica (SEC) e com expressão clínica (CEC). Logaritmo do número de moléculas de RNA mensageiro de: A) IFN- γ , B) IL-12, C) IL-4, D) IL-10, E) TGF- β e F) TNF- α . */†: Grupo difere dos demais ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Kruskal-Wallis.

6.10. PCR em tempo real: Quantificação da carga parasitária

A quantificação da carga parasitária, em amostras de baço, fígado, linfonodo cervical superficial, medula óssea e pele de orelha dos cães naturalmente infectados por *L. chagasi* dos grupos SEC e CEC, foi realizada pela técnica de PCR em tempo real. Os resultados obtidos estão representados nos GRÁF. 17A-E.

Para todos os órgãos estudados, as médias dos valores obtidos foram significativamente superiores no grupo de cães CEC em relação ao grupo de cães SEC ($p < 0,05$).

Os valores do parasitismo, encontrados para cada órgão, foram comparados dentro de cada grupo experimental (GRÁF. 18-A e B).

No grupo de cães SEC (GRÁF. 18-A), fígados e linfonodos apresentaram parasitismo tecidual significativamente inferior ao encontrado nos outros órgãos ($p < 0,05$), mas não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$). Da mesma forma, baços, medulas ósseas e peles de orelha não apresentaram diferença significativa nos valores da carga parasitária quando foram comparados dentro do grupo SEC ($p > 0,05$).

Quando o parasitismo verificado em todos os órgãos foi comparado no grupo de cães CEC (GRÁF. 18-B), constatou-se que a média dos valores dos fígados dos cães deste grupo experimental foi significativamente inferior em relação aos demais órgãos ($p < 0,05$). Os baços e peles de orelha apresentaram carga parasitária sem diferença significativa ($p > 0,05$) neste grupo, mas que foram significativamente superiores aos demais órgãos ($p < 0,05$). Os linfonodos e medulas ósseas dos cães deste grupo apresentaram parasitismo sem diferença significativa

entre si ($p>0,05$), mas que foi significativamente superior às amostras de fígado e inferior às amostras de baços e peles de orelha ($p<0,05$).

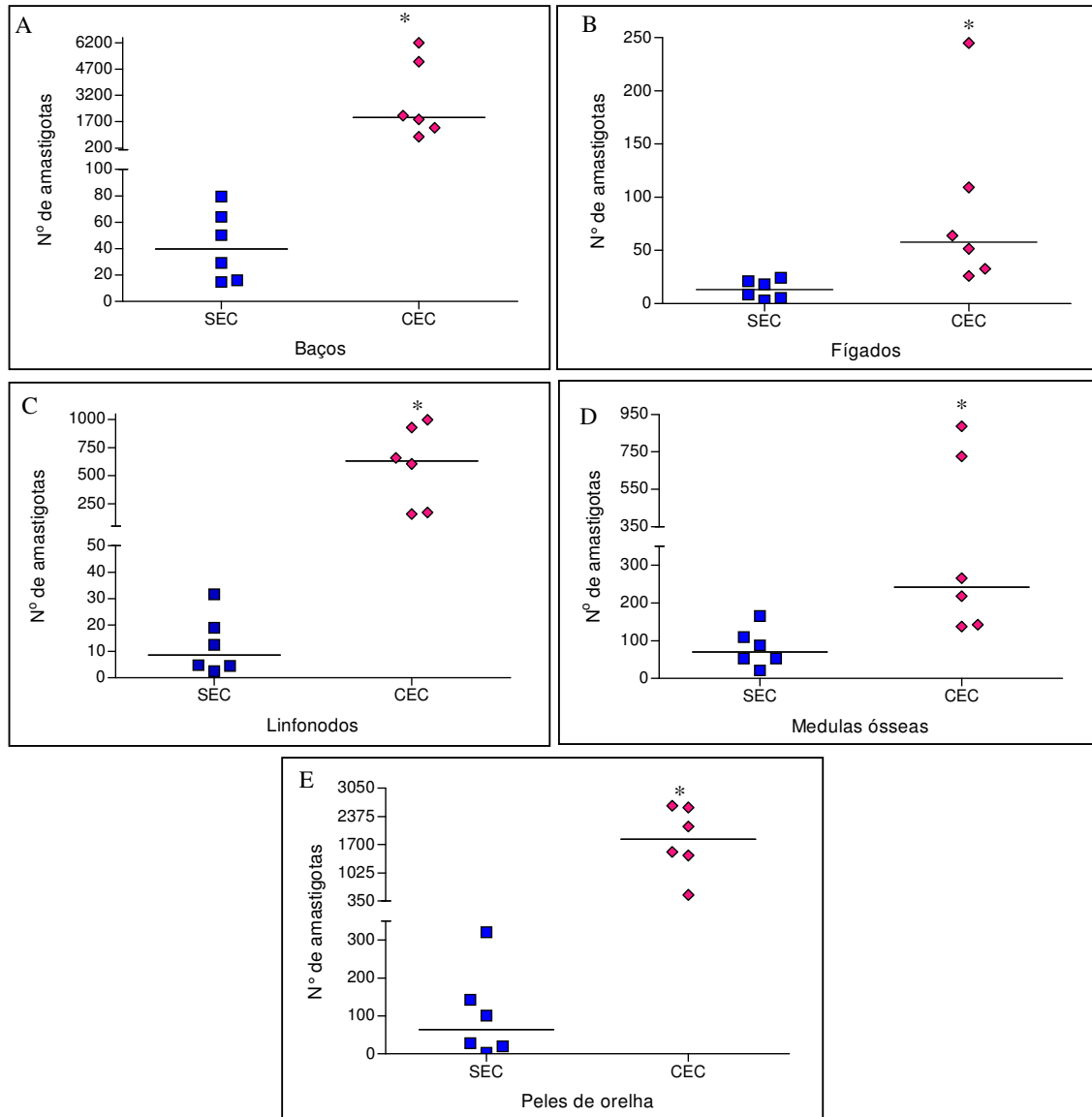


GRÁFICO 17 - Quantificação da carga parasitária em amostras de: A) baços, B) fígados, C) linfonodos cervicais superficiais, D) medulas ósseas e, E) peles de orelha, dos cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* dos grupos sem expressão clínica (SEC) e com expressão clínica (CEC). A quantificação foi realizada pela técnica de PCR em tempo real com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene de cópia única da DNA polimerase de *Leishmania chagasi*. *Grupo difere dos demais ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t não pareado.

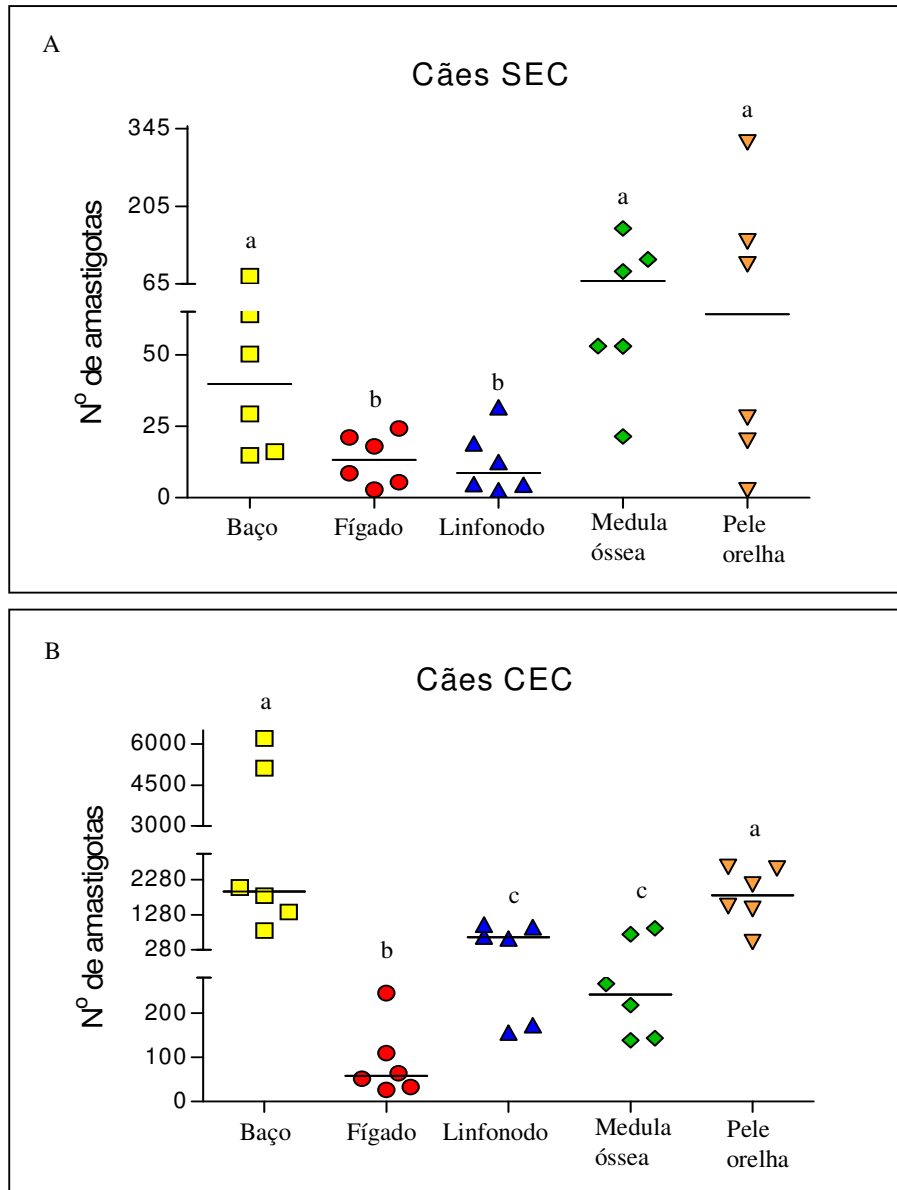


GRÁFICO 18- Comparação da carga parasitária, determinada pela técnica de PCR em tempo real com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene de cópia única da DNA polimerase de *Leishmania chagasi*, entre amostras dos órgãos: ■ baço, ● fígado, ▲ linfonodo cervical superficial, ◆ medula óssea e ▼ pele de orelha, nos grupos de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*: A) sem expressão clínica (SEC) e, B) com expressão clínica (CEC). a, b, c: grupos marcados com letras minúsculas distintas, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t não pareado.

6.10.1: Correlação: imunistoquímica X PCR em tempo real

A quantificação da carga parasitária foi realizada neste trabalho pelas técnicas de imunistoquímica e de PCR em tempo real. Uma análise de correlação entre os resultados obtidos pelas duas técnicas foi realizada.

Os GRÁF. 19A-D representam a correlação entre as técnicas de quantificação nos baços, fígados, linfonodos cervicais superficiais e peles de orelha, respectivamente, de todos os cães naturalmente infectados pertencentes tanto ao grupo SEC quanto ao CEC.

A correlação entre estas técnicas foi positiva e significativa nos baços ($p=0,0001$), linfonodos ($p=0,0003$) e peles de orelha ($p=0,001$) dos cães naturalmente infectados (GRÁF. 19A, 19C e 19D). No entanto, não foi evidenciada correlação entre os resultados da quantificação pela imunistoquímica e PCR em tempo real nos fígados dos cães estudados ($p=0,7625$).

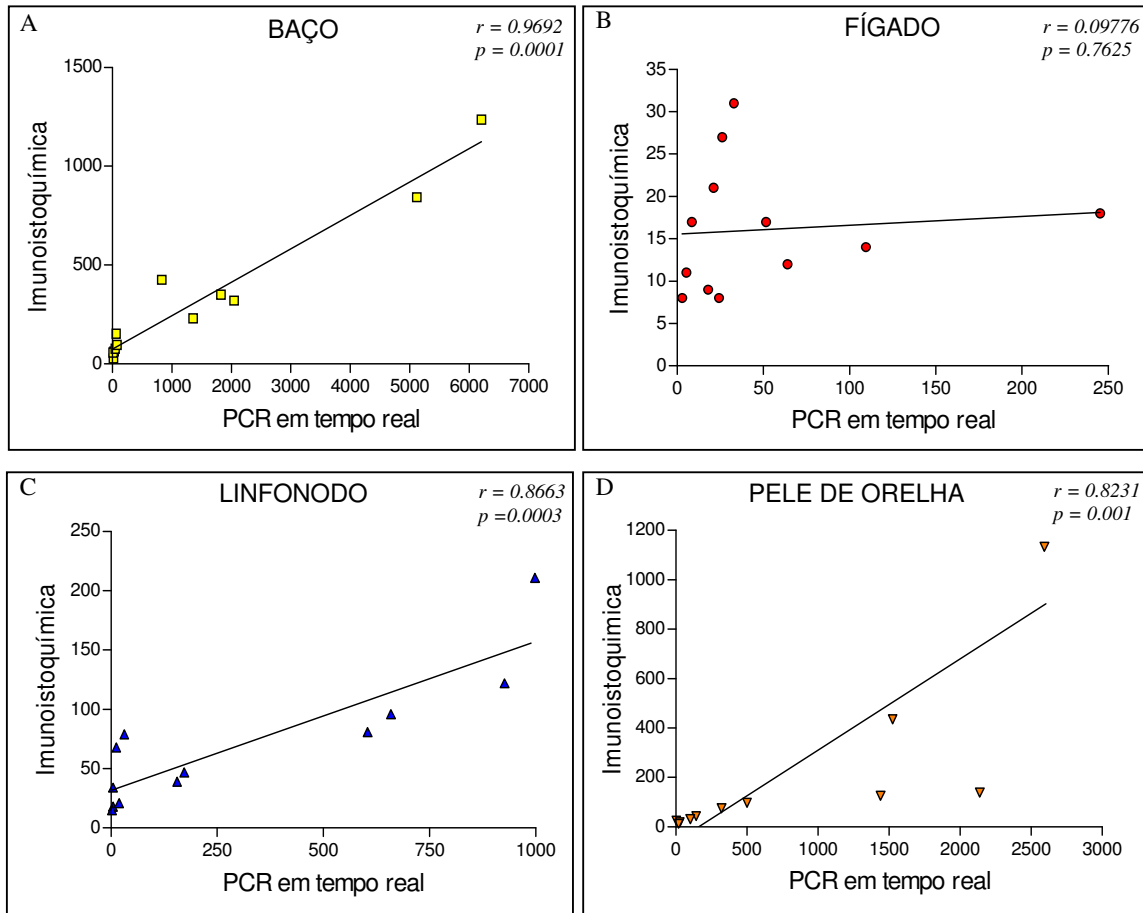


GRÁFICO 19- Correlação entre a carga parasitária determinada pela imunistoquímica e pela PCR em tempo real com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene de cópia única da DNA polimerase de *Leishmania chagasi* em amostras de: A) baço, B) fígado, C) linfonodo cervical superficial e D) pele de orelha dos cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. Os resultados foram plotados individualmente para cada cão e a linha contínua ilustra os índices de correlação. Os índices de correlação de Pearson (r) e os valores p, para cada órgão, são mostrados nos respectivos gráficos.

6.10.2: Correlação: parasitismo X subclasses de IgG

Visando identificar se o parasitismo determinado pela PCR em tempo real nos diferentes órgãos apresentou alguma associação com os subtipos de Igs estudados, foi feita uma análise de correlação entre estes dados.

Os GRÁF. 20A-E representam a correlação entre IgG1 e o parasitismo respectivamente, nos baços, fígados, linfonodos cervicais superficiais, medulas ósseas e peles de orelha de todos os cães naturalmente infectados pertencentes tanto ao grupo SEC quanto ao CEC.

Através deste estudo constatou-se que apenas nas amostras de fígado (GRÁF. 20-B) a correlação foi positiva ($r=0.2146$). Nos demais órgãos as correlações encontradas foram negativas (baços: $r=-0.4344$; linfonodos: $r=-0.3521$; medulas ósseas: $r=-0.4565$ e peles de orelha: $r=-0.1711$). Entretanto, estas correlações não foram significativas ($p>0,05$) em todos os órgãos estudados.

Os GRÁF. 21A-E representam a correlação entre IgG2 e o parasitismo nos diferentes órgãos estudados. Foi observada uma correlação positiva ($r=0.2295$) entre estes dois parâmetros nos fígados (GRÁF. 21-A) dos cães naturalmente infectados. Nas amostras de peles de orelha (GRÁF. 21-E) a correlação foi ligeiramente positiva, porém, muito próxima de zero ($r=0.0927$). Nos demais órgãos as correlações encontradas foram negativas (baços: $r=-0.3601$; linfonodos: $r=-0.1877$; e medulas ósseas: $r=-0.3369$). Em todos os órgãos, no entanto, estas correlações não foram significativas ($p>0,05$).

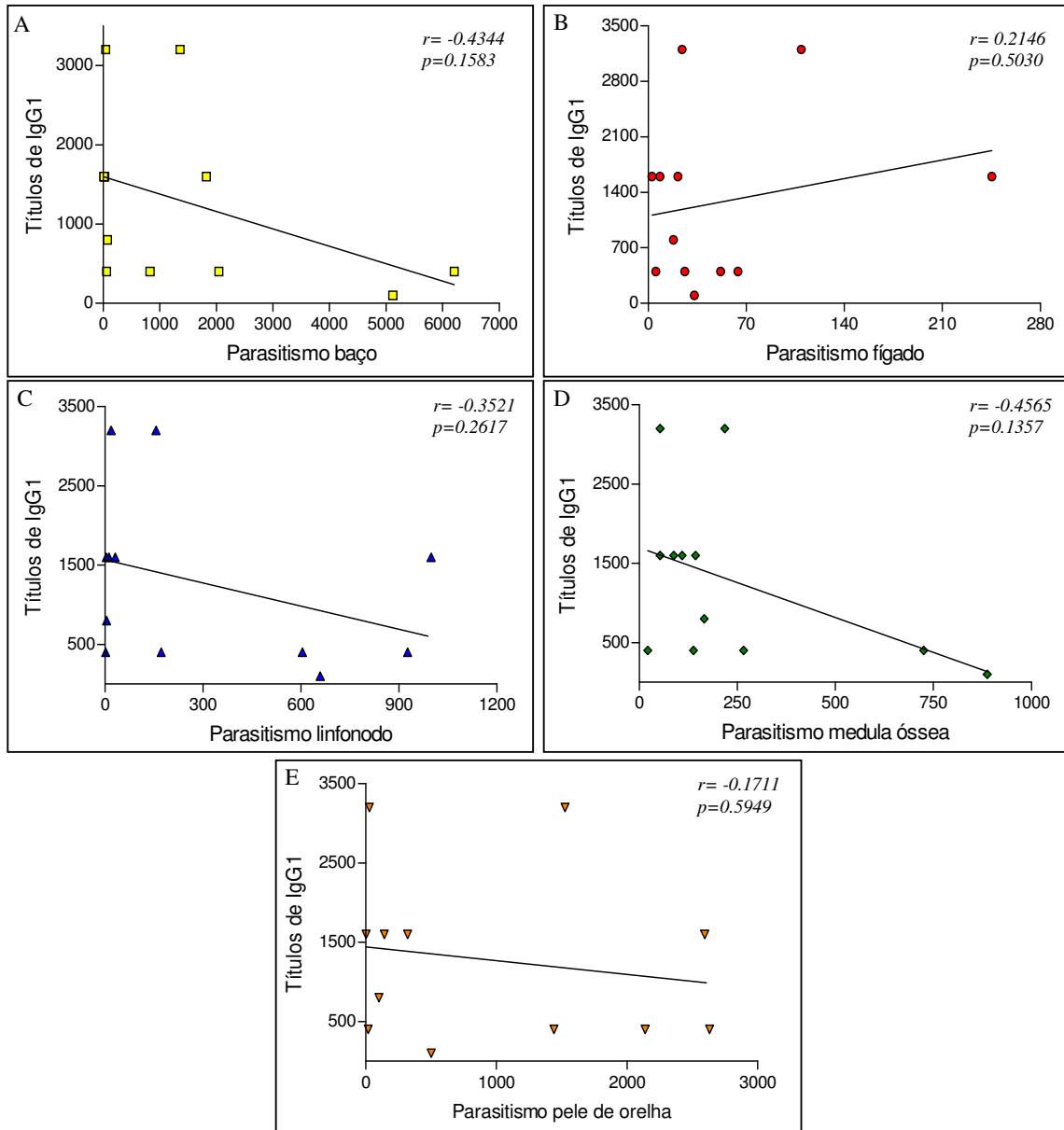


GRÁFICO 20- Correlação entre os títulos de IgG1 nos soros dos cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* e a carga parasitária determinada pela PCR em tempo real com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene de cópia única da DNA polimerase de *Leishmania chagasi* em amostras de: A) baço, B) fígado, C) linfonodo cervical superficial e D) medula óssea e E) pele de orelha dos cães. Os resultados foram plotados individualmente para cada cão e a linha contínua ilustra os índices de correlação positiva e negativa. Os índices de correlação de Pearson (r) e os valores p , para cada órgão, são mostrados nos gráficos.

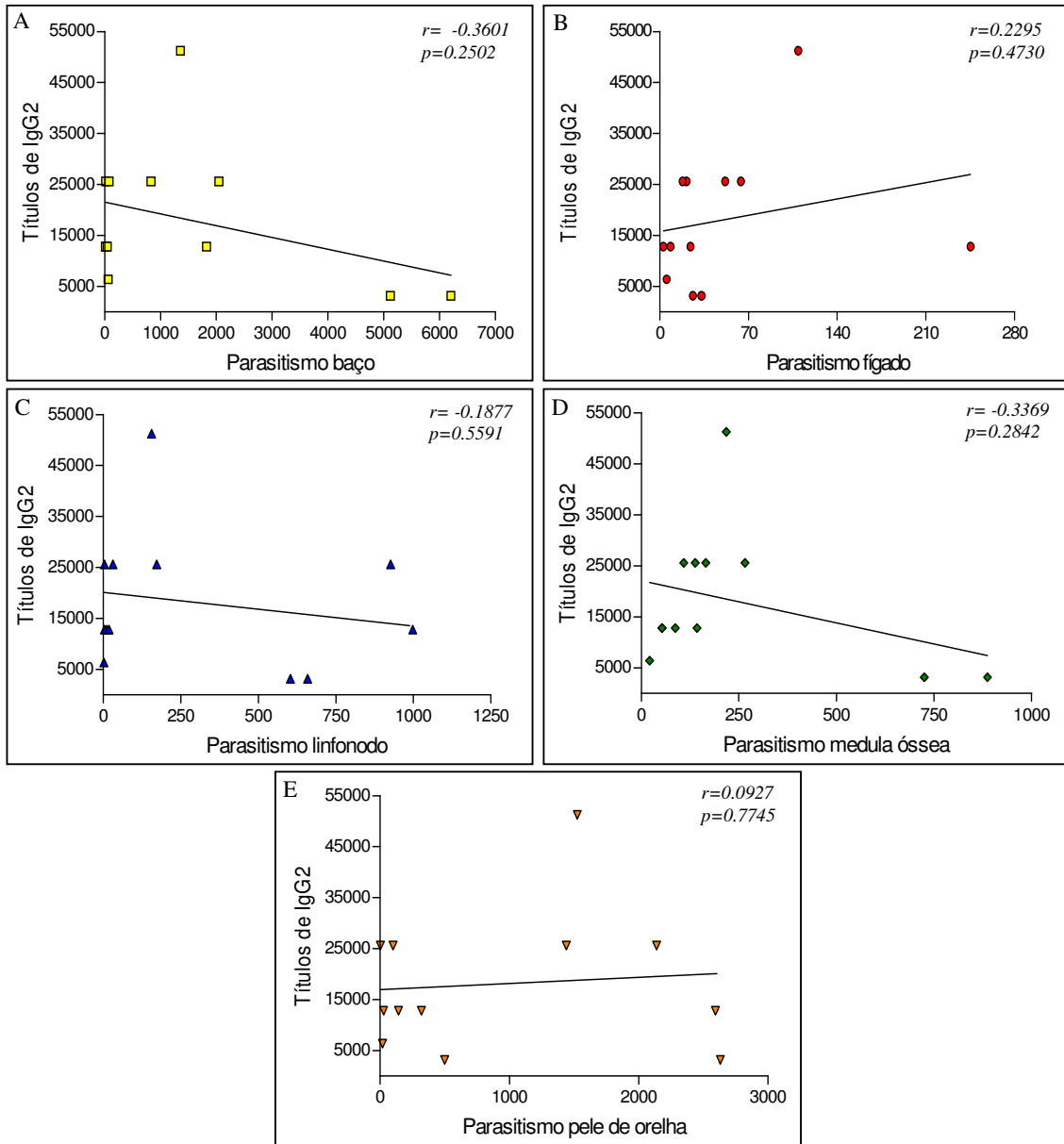


GRÁFICO 21- Correlação entre os títulos de IgG2 nos soros dos cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* e a carga parasitária determinada pela PCR em tempo real com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene de cópia única da DNA polimerase de *Leishmania chagasi* em amostras de: A) baço, B) fígado, C) linfonodo cervical superficial e D) medula óssea e E) pele de orelha dos cães. Os resultados foram plotados individualmente para cada cão e a linha contínua ilustra os índices de correlação positiva e negativa. Os índices de correlação de Pearson (r) e os valores p , para cada órgão, são mostrados nos gráficos.

Discussão

7. DISCUSSÃO

7.1. Determinação dos grupos experimentais

Os critérios de inclusão, dos cães neste estudo, foram rigorosos para permitirem a comparação entre os grupos experimentais que apresentassem formas clínicas polares da doença: um grupo formado por cães com comprovação sorológica e parasitológica da infecção, porém sem expressão clínica da doença e outro com cães também comprovadamente infectados por *L. chagasi*, apresentando no mínimo quatro sinais clínicos da doença. Embora os sinais evidenciados no grupo de cães com expressão clínica da doença não sejam exclusivos da LVC (ALVAR, 2004), o fato de eles serem observados em cães com resultados positivos para todos os testes sorológicos e parasitológicos de pesquisa da LVC, e o fato de terem sido considerados em conjunto em um mesmo animal, evidenciam que estes sinais se manifestaram em decorrência da doença.

O estabelecimento de um grupo de cães não infectados em área endêmica da doença, também deve ser realizado de forma bastante cautelosa, com todos os parâmetros diagnósticos sendo considerados em conjunto. Em áreas endêmicas da doença, resultados positivos de testes sorológicos podem identificar a exposição do animal ao parasito, sem necessariamente indicar infecção (XAVIER et al., 2006), evidenciando assim, a necessidade da demonstração do parasito em amostras clínicas dos cães investigados.

O diagnóstico preciso da LVC é complexo, sendo necessária a associação de métodos sorológicos, parasitológicos e moleculares (ALVAR, 2004), para se alcançar um resultado confiável.

As técnicas sorológicas RIFI e ELISA são recomendadas pelo MS para a avaliação da soroprevalência em inquéritos epidemiológicos. Além disso, a RIFI é recomendada para a confirmação dos cães sororreagentes ao ELISA (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Dessa forma, estas foram as técnicas escolhidas para a seleção sorológica dos cães deste estudo.

A confirmação parasitológica da infecção é frequentemente realizada através da pesquisa do parasito em amostras de aspirados de medula óssea, baço e linfonodos, de forma direta em exames de esfregaços ao microscópio ótico, ou indireta através de exames de cultura. A pesquisa direta de amastigotas, nestas amostras, normalmente apresenta baixa sensibilidade (XAVIER et al., 2006; ALVAR, 2004; TAVARES et al., 2003) que, no entanto, sofre um incremento quando esses materiais são semeados em meios de cultura (ALVAR, 2004). Tal fato foi evidenciado em nosso estudo, pois apenas um animal teve a confirmação parasitológica da infecção com o exame direto de aspirado de medula óssea, enquanto todos os cães naturalmente infectados foram positivos aos exames de cultura destas amostras.

Para a conclusão dos testes dos cães do grupo controle, foram realizadas PCRs específicas para o complexo *L. donovani* em amostras de sangue coletadas em papel filtro, sendo que todos os resultados foram negativos. Dessa forma, os cães apresentando todos os testes sorológicos, parasitológicos, clínicos e moleculares negativos foram selecionados para o grupo controle.

A PCR é considerada mais sensível que os testes parasitológicos no diagnóstico da LVC. XAVIER et al., (2006) demonstraram uma sensibilidade de 87,2% na PCR realizada em amostras de pele, enquanto ANDRADE et al., (2002), evidenciaram sensibilidades de 84,6%, 80%, 76,9% e 66,7% em PCRs realizadas respectivamente em amostras de baço, fígado, linfonodos e medulas ósseas de cães. SILVA et al., (2001b) determinaram uma sensibilidade de 75% em amostras de sangue de cães e SILVA et al., (2004) constataram uma sensibilidade de 71,7% da PCR realizada em amostras de sangue humano depositado em papel filtro.

Apesar da extração do DNA de sangue em papel filtro apresentar sensibilidade inferior quando comparada a outras amostras, ela foi selecionada neste trabalho, devido à facilidade de execução e baixo custo, além de apresentar resultados satisfatórios, sobretudo quando associada a outras técnicas.

Para a determinação dos grupos de cães com formas polares da infecção, foram avaliados os sinais clínicos mais frequentemente verificados na LVC.

As manifestações clínicas da leishmaniose visceral, em cães, são altamente variáveis. Alguns animais infectados podem desenvolver graves sinais da doença que resultam em morte, enquanto outros podem apresentar sinais suaves ou permanecerem assintomáticos ao longo da infecção (BARBIERI, 2006). Cerca de 50% a 60% dos cães com LVC não exibem nenhum sinal clínico da doença, apesar de 20% destes animais apresentarem parasitismo cutâneo (ALVAR et al., 2004; BANETH, 2006).

Todos os sinais clínicos, apresentados no atual estudo pelos cães do grupo CEC, vêm sendo extensivamente relatados na literatura (COSTA-VAL et al., 2007; RIBEIRO, 2007; REIS et al., 2006a; BANETH, 2006; ALVAR et al., 2004; AMUSATEGUI et al., 2003). Embora a frequência de apresentação destes sinais

normalmente varie de um autor para outro, a ocorrência dos mesmos está de acordo com nossos resultados, já que os sinais mais comumente encontrados nos cães acometidos pela LVC são linfadenopatia, lesões cutâneas e perda de peso.

AMUSATEGUI et al., (2003) encontraram em estudo realizado com 61 cães naturalmente infectados por *L. infantum*, que o sinal clínico mais freqüente foi linfadenopatia generalizada, acometendo 80% dos cães. Em nosso estudo, todos os animais do grupo CEC (100%) apresentaram este sinal clínico, sendo o mais prevalente no grupo. De forma semelhante, RIBEIRO, (2007) encontrou linfadenopatia generalizada em 100% dos 24 cães naturalmente infectados por *L. chagasi* CEC da doença, avaliados antes de tratamento específico. Outros autores (COSTA-VAL et al., 2007; ALVAR, 2004) também concordam que este sinal clínico seja mais frequentemente encontrado em cães que manifestam clinicamente a doença.

Nos linfonodos, o aumento do número e tamanho dos folículos linfóides e a marcante hipertrofia e hiperplasia dos macrófagos medulares (cordões e seios) associados à linfadenite capsular e inflamação dos seios subcapsulares são provavelmente as alterações histológicas responsáveis pelo desenvolvimento do quadro de linfadenopatia na LVC (LIMA et al., 2004). Adicionalmente, esses autores observaram que os linfonodos cervicais apresentam mais alterações que os axilares e poplíteos. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por CIARAMELLA et al. (1997). Segundo estes autores a maior reatividade dos linfonodos cervicais deve-se à sua posição anatômica, uma vez que estes drenam as regiões cutâneas e subcutâneas da cabeça e orelha. Tais dados, descritos por esses autores, nortearam a seleção dos linfonodos cervicais superficiais para a realização de nossos experimentos, sendo que todos os achados histopatológicos mais

comumente descritos na LVC foram evidenciados nos cães naturalmente infectados. Embora apenas a intensidade da inflamação subcapsular tenha sido o único achado significativamente superior no grupo CEC em relação ao grupo SEC, as demais alterações também apresentaram uma tendência de médias mais elevadas nos cães CEC, o que pode justificar a ocorrência de linfadenopatia apenas neste grupo.

As anormalidades cutâneas são muito comuns, porém, de extensão e caracterização variáveis nos cães com LVC. Os sinais cutâneos verificados, em maior frequência em nosso estudo, foram: alopecia local ou generalizada, hiperkeratose, dermatite furfurácea, onicogribose e lesões ulceradas na pele, que são frequentemente encontrados por outros autores (COSTA-VAL et al., 2007; RIBEIRO, 2007; REIS et al., 2006a).

Na pele dos cães com LVC, observa-se processo inflamatório plasmohistiocitário com graus variados de intensidade podendo apresentar-se distribuído ao redor dos anexos ou difusamente na derme. Acantose, hiperkeratose com presença ou não de pérolas córneas, parakeratose e degenerações celulares são alterações histopatológicas comumente observadas na leishmaniose visceral canina (SANTOS et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2004; GIUNCHETTI et al., 2006).

Todos esses achados, com exceção dos fenômenos degenerativos foram encontrados nos nossos cães naturalmente infectados. Além disso, todos os cães analisados apresentaram inflamação na pele, com padrão predominantemente plasmohistiocitário, com graus variados de intensidade, confirmando os dados da literatura.

As oftalmopatias podem constituir a primeira alteração aparente da LVC, (PEÑA et al., 2000), ocorrendo em uma frequência que varia entre 16% e 80%. Em

nosso grupo de cães CEC, 33% dos animais apresentaram alterações oculares (ceratoconjutivite e uveíte). Estas alterações oftalmológicas parecem estar associadas, sobretudo, à deposição sobre as células endoteliais, de imunocomplexos, que são formados em grande quantidade na LVC, e à presença de inflamações granulomatosas em decorrência da infecção (PEÑA et al., 2000).

A perda de peso está presente em boa parte dos animais com LVC, porém em frequência bastante variável (ALVAR et al, 2004; AMUSATEGUI, et al., 2003). No nosso estudo, 50% dos cães do grupo CEC apresentavam-se caquéticos. Este quadro se deve, provavelmente, a um desequilíbrio protéico, em virtude da proteinúria associada à deficiência imunológica crônica do animal doente (ALVAR et al, 2004; AMUSATEGUI, et al., 2003).

7.2. Hematologia, função hepática e função renal

Embora os dados hematológicos e as avaliações das funções hepática e renal dos cães com LVC tenham um valor limitado para o diagnóstico da doença, estes parâmetros fornecem importantes embasamentos para a avaliação do estado clínico dos animais, do prognóstico da doença e da evolução de cães tratados (COSTA-VAL et al., 2007).

Em razão de fatores como raça, idade, sexo e estado nutricional do animal, os valores de normalidade para a espécie canina, na avaliação do hemograma são bastante amplos (ANDERSEN & SCHALM, 1970; TSESSARKAYA & GURKOVSKAYA, 1976).

As alterações hematológicas verificadas na LVC são semelhantes às que ocorrem na doença humana. A anemia do tipo normocrômico e normocítico é o achado mais frequentemente relatado, ocorrendo em 50% a 70% dos animais doentes (BANETH, 2006; FEITOSA et al., 2000; CIARAMELLA et al., 1997). No entanto, alguns autores relatam que a anemia é encontrada em baixo percentual nos cães com LVC (REIS, 2006a; ALVAR, 2004; AMUSATEGUI et al., 2003).

Nesse estudo, 50% dos cães CEC apresentaram anemia normocítica e normocrômica, sendo que, as médias dos números de hemácias, concentração de hemoglobina e valores de hematócrito, deste grupo, foram significativamente inferiores às encontradas nos demais grupos. Estes achados estão de acordo com os dados descritos por XAVIER, (2002), que relata uma maior proporção de alterações no hemograma de animais com sinais clínicos da doença, em relação àqueles cães sem expressão clínica da mesma.

A etiologia da anemia na LVC é pouco conhecida e acredita-se que esteja associada a mais de um processo como, por exemplo, a perda de sangue pela epistaxe e ulcerações na pele, lise de hemácias pela intensa eritrólise e também, em decorrência da diminuição da eritropoiese devido à hipoplasia ou aplasia medular (COSTA-VAL et al., 2007; FEITOSA, 2000).

Além das variáveis que influenciam os valores do hemograma, o leucograma pode ainda, sofrer variações devido ao stress e a excitação decorrentes da imobilização do animal no ato da coleta do sangue (ANDERSEN & SCHALM, 1970; TSESSARKAYA & GURKOVSKAYA, 1976).

As contagens total e diferencial de leucócitos parecem não obedecer qualquer padrão em cães com LVC. Enquanto, alguns trabalhos demonstram ausência de variações no leucograma da maioria dos cães com LVC (COSTA-VAL

et al., 2007; RIBEIRO, 2007; AMUSATEGUI, 2003), outros demonstram a ocorrência de leucocitose (SCHULTZE et al., 2000) ou de leucopenia (REIS et al., 2006a; SLAPPENDEL et al., 1988). Sendo assim, as alterações no leucograma parecem não ser bons marcadores clínico-patológicos para o acompanhamento da infecção canina, já que parece não existir associação entre categoria clínica dos cães com LVC e as contagens de leucócitos, indicando que a doença tem pouca influência sobre estes parâmetros (COSTA-VAL et al., 2007; RIBEIRO, 2007; AMUSATEGUI, 2003).

Nos cães avaliados neste trabalho, dois animais (33,34%) do grupo SEC e três (50%) do grupo CEC apresentaram um quadro de leucocitose devido, sobretudo a um aumento de neutrófilos segmentados. Estes achados estão de acordo com relatos de BOURDOISEAU et al. (1997) que afirmam que a contagem total de leucócitos na LVC pode encontrar-se acima dos valores de referência em decorrência de um quadro de neutrofilia.

Nos cães CEC quando as contagens médias diferenciais de linfócitos, eosinófilos e monócitos foram realizadas, constatou-se a ocorrência de linfocitose e eosinofilia em três cães, enquanto os números de monócitos estavam dentro dos limites de referência para todos os animais estudados. No entanto, assim como verificado para a contagem global de leucócitos, a maioria dos autores concorda que não exista associação entre os valores diferenciais de leucócitos e a evolução da infecção (COSTA-VAL et al., 2007; RIBEIRO, 2007; AMUSATEGUI, 2003).

A contagem média de plaquetas, dos cães desse estudo, apresentou valores normais em todos os grupos experimentais. Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados por COSTA-VAL et al., (2007) e RIBEIRO et al., (2007) que também não encontraram diferenças nas contagens de plaquetas entre

os cães assintomáticos e sintomáticos. No entanto, segundo outros autores, a trombocitopenia normalmente ocorre em cães com LVC numa frequência que varia entre 29% (CIARAMELA et al., 1997) e 50% (SLAPPENDEL, 1988).

As dosagens bioquímicas séricas são consideradas uma forma indireta de avaliação das funções hepática e renal dos cães com LVC.

A multiplicação de amastigotas de *Leishmania* nos macrófagos do fígado pode levar a um quadro de hepatite crônica, levando a um aumento do órgão e frequentemente a ocorrência de vômito, poliúria, polidipsia, anorexia e perda de peso (NOLI, 1999).

Dentre os animais CEC, três apresentaram valores das dosagens das enzimas hepáticas superiores aos valores de referência. SLAPPENDEL, (1998) consideram que incrementos nos níveis de enzimas hepáticas podem ser verificados em cães infectados como consequência da lesão hepática em cães com LVC. No entanto, a maioria dos autores acredita que a elevação das concentrações séricas de enzimas hepáticas e bilirrubina são infrequentes na LVC (RIBEIRO, 2007; AMUSTEGUI et al., 2003; FEITOSA et al., 2000; CIARAMELLA et al., 1997).

No fígado dos cães com LVC, observa-se, comumente, infiltrado plasmolinfocitário e hiperplasia das células de Küpffer. Pode ocorrer uma hepatite difusa, reação inflamatória exsudativa com infiltrado plasmolinfocitário nos espaços portais e interlobulares além da presença de granulomas intralobulares com células epitelióides parasitados ou não (GENARO, 1993; TAFURI et al, 1996; TAFURI et al, 2001). Em todos nossos cães, naturalmente infectados, foi evidenciada a ocorrência de inflamação portal com padrão tipicamente plasmohistiolinfocitário e hiperplasia das células de Küpffer em graus variados.

Em nosso estudo, foram evidenciados granulomas bem organizados, tanto no grupo SEC, quanto no grupo CEC. Esses resultados estão de acordo com os achados de TAFURI et al. (1996) e SANT'ANA et al. (2007), que ao estudarem cães naturalmente e experimentalmente infectados, respectivamente, observaram granulomas intralobulares bem organizados no fígado de todos os animais estudados, independente da forma clínica. Estudos realizados por SANCHEZ et al. (2004), no entanto, demonstraram que no fígado de cães assintomáticos foi observada uma imunidade efetiva, com granulomas bem formados contendo células T efectoras e numerosas moléculas ativadoras, ao passo que, nos animais sintomáticos foram identificados granulomas não organizados compostos por infiltrado de células T, numerosas células de Küpffer parasitadas e baixa expressão de moléculas ativadoras.

A maioria das alterações histopatológicas, pesquisadas nos fígados dos cães do atual trabalho, foram significativamente superiores no grupo de cães CEC em relação aos cães SEC. Esses achados, em maior grau no grupo CEC, poderiam justificar as alterações dos valores das enzimas hepáticas evidenciadas em alguns cães, além de contribuírem para o quadro de disproteinemia constatado nos cães desse grupo.

A intensa resposta humoral que ocorre na LVC leva a uma das alterações mais marcantes da doença: a disproteinemia sérica. O desequilíbrio protéico é evidenciado pelo aumento das proteínas séricas totais, em decorrência da intensa hipergamaglobulinemia. Este quadro é associado à hipoalbuminemia devido a perdas de albumina ocasionadas por nefropatias, lesões hepáticas e subnutrição crônica em decorrência da LVC. Tais alterações levam a inversão da relação albumina/globulina. Este quociente alterado é comumente inferior a 0,5 e constituiu

um importante achado clínico para avaliação do prognóstico dos cães (AMUSATEGUI et al., 2003; NOLI, 1999; SLAPPENDEL, 1988). Em nosso estudo, cinco dos seis cães do grupo CEC apresentaram hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia. Estas alterações foram evidenciadas também pelas relações albumina/globulina inferiores a 0,5. Estes resultados são indícios de alterações hepáticas e renais que estavam presentes nestes cães.

Alguns autores relatam a freqüente observação de glomerulonefrite associada à LVC como conseqüência da deposição de imunocomplexos (ALVAR, 2004; FERRER, 1992) o que tem grande implicação na sobrevivência dos cães infectados, já que as conseqüências da afecção renal grave são as principais causas de morte em cães com LVC (NOLI, 1999). Neste contexto, a avaliação do perfil renal dos animais com LVC, realizada pela dosagem sérica de uréia e creatinina é um importante marcador da evolução da doença.

O aumento das concentrações séricas de uréia e creatinina são um achado comum na LVC (AMUSATEGUI et al., 2003; NIETO et al. 1992), embora alguns autores tenham encontrado estas concentrações dentro dos valores de referência (COSTA-VAL et al., 2007; RIBEIRO et al., 2007). Neste estudo todos os cães dos três grupos apresentaram valores de creatinina abaixo dos de referência. Dois (33,34%) dos cães SEC e todos os cães CEC apresentaram as dosagens de uréia superiores aos valores de referência.

A urinálise ainda revelou a ocorrência de hematuria e proteinúria, que também são indicadores de alterações renais, em quatro (66,67%) cães CEC. A proteinúria é a alteração mais comumente descrita na urinálise de cães com LVC, com a freqüência deste achado clínico variando de cerca de 70% a 100% dos animais, sendo que em alguns animais, a proteinúria pode ser tão grave que chega

a determinar alterações nos valores de proteínas séricas totais (COSTA-VAL et al., 2007; AMUSATEGUI et al., 2003).

7.3. Pesquisa de IgG e das subclasses IgG1 e IgG2 pela técnica de ELISA

A resposta imune humoral, na LVC é bastante intensa com a produção de altos títulos de imunoglobulinas (PINELLI et al. 1994; NIETO et al. 1999; AMUSATEGUI et al., 2003; ALVAR et al. 2004). Embora estes anticorpos, produzidos em grande quantidade, não sejam efetivos na eliminação das formas amastigotas do parasito, são de grande importância no diagnóstico sorológico dos cães infectados, na realização de inquéritos epidemiológicos e no acompanhamento de cães submetidos à terapia anti-*Leishmania* (RIBEIRO, 2007; VERCAMMEN et al., 2002).

A técnica de ELISA para pesquisa de IgG-anti-*Leishmania*, por permitir a realização simultânea de um grande número de reações e por apresentar a leitura automatizada dos resultados, mostra-se muito útil na rotina laboratorial.

Atualmente, alguns autores, buscam a determinação das subclasses IgG1 e IgG2 como indicadores do “status” clínico dos cães com LVC e como marcadores sorológicos do prognóstico da infecção nos cães acometidos (COSTA-VAL et al., 2007; REIS et al., 2006b; INIESTA et al., 2005; QUINNEL et al., 2003; VERCAMMEN et al., 2002; LEANDRO et al., 2001; SOLANO-GALLEGO et al., 2001b; NIETO et al. 1999; BOURDOISEAU et al., 1997; DEPLAZES et al., 1995).

Embora a maioria destes trabalhos tenha sido realizada baseada em protocolos de ELISA bem estabelecidos, dados controversos do perfil de subclasses de imunoglobulinas nas diferentes formas clínicas da infecção canina são frequentemente documentados (REIS et al.; 2006b). Isto provavelmente ocorre, porque estes estudos comparam entre si, os valores de absorvância encontrados nas reações para cada subclasse de IgG. No entanto, leituras de absorvância são influenciadas por fatores como a variação das concentrações de peroxidase ligadas em cada conjugado ou a temperatura e tempo de incubação em que cada etapa da reação se processa. Estas variações, intrínsecas da técnica, fazem com que as leituras de absorvância de IgG1 e IgG2, não sejam comparáveis.

Neste trabalho foram avaliados os títulos de IgG1 e de IgG2 no soro dos cães naturalmente infectados por *L. chagasi* sem e com sinais clínicos da LVC, permitindo a comparação entre estas subclasses, já que a determinação dos títulos anula as variações nas leituras de absorvância que são intrínsecas da técnica.

Vários trabalhos, comparando as absorvâncias das leituras destas subclasses nos soros de cães com LVC, demonstraram uma correlação direta, entre indução de altos níveis de IgG1 anti-*Leishmania* e o aparecimento de sinais clínicos em cães infectados por *L. infantum* (sin. *L. chagasi*), enquanto anticorpos IgG2 foram associados com uma infecção sem sinais clínicos (DEPLAZES et al., 1995; NIETO et al. 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2001b; QUINNEL et al., 2003; INIESTA et al., 2005). No entanto, outros autores encontraram associação inversa destas subclasses com os quadros clínicos da LVC (LEANDRO et al., 2001; REIS et al.; 2006; COSTA-VAL et al., 2007).

No nosso trabalho, tais associações não foram evidenciadas, já que altos títulos de IgG2 e baixos de IgG1 foram encontrados tanto em cães SEC quanto

CEC. Nos soros dos cães desses dois grupos, verificou-se que os títulos de IgG2 foram significativamente superiores aos de IgG1, demonstrando desta forma, que embora altos níveis de IgG2 possam ser associados à presença da infecção por *L. chagasi*, não é possível associar esta subclasse ao prognóstico da doença, já que o mesmo perfil foi encontrado nos dois distintos grupos clínicos.

Um estudo mais amplo, realizado por nosso grupo no Laboratório de Sorologia de *Leishmania* (dados não publicados), comparou os títulos destas duas subclasses de imunoglobulinas nos soros de 30 cães SEC e de 33 cães CEC. Foram encontrados resultados semelhantes aos nossos, confirmando a impossibilidade de associação de determinado quadro clínico de LVC a uma determinada subclasse de IgG.

Outros autores, embora comparando variações de absorbância e não de títulos, encontraram também, resultados semelhantes aos nossos (BOURDOISEAU et al., 1997; VERCAMMEN et al., 2002).

Dessa forma, nossos resultados sugerem que estas subclasses não são indicadas para serem utilizadas como marcadores de diferentes quadros clínicos da infecção canina, já que o mesmo perfil de produção de ambas as subclasses de imunoglobulinas foi verificado nos cães SEC e CEC.

7.4. Quantificação da carga parasitária: Imunoistoquímica e PCR em tempo real

Um diagnóstico definitivo da LVC pode ser baseado na detecção de formas amastigotas através do estudo imunoistoquímico de cortes dos tecidos (XAVIER et

al., 2006; SOLANO-GALLEGO ET AL., 2004; TAFURI et al., 2004, TAFURI, 2001). O fato de esta técnica utilizar anticorpos imunomarcados, específicos para o parasito, aumenta sua sensibilidade e especificidade (TAFURI et al., 2004). Uma vez que a imunistoquímica permite a quantificação da carga parasitária, esta técnica também é uma boa ferramenta para o acompanhamento da evolução da doença e para avaliação da resposta de cães frente ao tratamento específico.

Atualmente, a técnica de PCR em tempo real também vem sendo utilizada, por vários autores para diagnosticar ou monitorar a evolução da LV através da quantificação da carga parasitária, em substituição a outras técnicas, como a PCR convencional ou a imunistoquímica, por apresentar alta sensibilidade, acurácia e reprodutibilidade (MANNA et al., 2006; FRANCINO et al., 2005; MARY et al., 2004; VITALE et al., 2004; WORTMANN et al., 2004; NICOLAS et al., 2002; BRETAGNE et al., 2001).

No nosso trabalho, através da imunistoquímica, foram encontradas formas amastigotas em amostras de baço, fígado, linfonodo cervical superficial e pele de orelha de todos os cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. O número de amastigotas, no entanto, foi superior nas amostras dos cães CEC quando comparadas aos cães SEC, embora, nos fígados e linfonodos estas diferenças não tenham sido significativas.

Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados por XAVIER et al., (2006) que também demonstraram a existência de correlação entre a carga parasitária determinada pela imunistoquímica na pele dos cães infectados e o “status” clínico do animal, já que os cães sintomáticos apresentaram maior parasitismo tecidual que os cães assintomáticos.

No nosso estudo, a quantificação da carga parasitária também foi realizada pela PCR em tempo real, na medula óssea e em todos os órgãos avaliados pelo estudo imunistoquímico. Pela PCR em tempo real, assim como na imunistoquímica, foram encontradas amastigotas em todos os órgãos avaliados, tanto dos cães CEC quanto dos cães SEC. No entanto, o número de amastigotas, em todos os órgãos dos cães CEC, foi significativamente superior em relação aos cães SEC, sendo que no estudo imunistoquímico não foi evidenciada esta diferença significativa nos linfonodos e fígados entre estes dois grupos de cães. Este fato pode ser justificado pela maior sensibilidade da PCR em tempo real em relação à imunistoquímica, que permitiu a diferenciação estatística entre os grupos. Estas duas técnicas de quantificação apresentaram uma correlação positiva na determinação da carga parasitária nos baços, linfonodos e peles de orelha dos cães naturalmente infectados, o que não foi evidenciado nos fígados destes cães.

A demonstração em nosso trabalho, da presença de amastigotas em amostras de todos os cães SEC, inclusive nos fragmentos de pele de orelha, pelas duas técnicas de quantificação utilizadas, é um achado importante, já que a participação dos cães sem sinais clínicos da doença, na epidemiologia da doença, é discutida por vários autores (LIMA et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2001a; ABRANCHES et al., 1998).

SOLANO-GALLEGO et al., (2004), não encontraram amastigotas no estudo imunistoquímico de amostras de pele de orelha de cães assintomáticos. Já XAVIER et al., (2006) encontraram uma frequência de 70% dos cães assintomáticos, apresentando formas amastigotas em amostras de pele de orelha, detectadas pela imunistoquímica. Nossos resultados estão de acordo com aqueles demonstrados por XAVIER et al., (2006), sendo que ambos os trabalhos indicam a possível

participação de cães SEC da doença, no ciclo de transmissão do parasito. COSTA-VAL et al., (2007) demonstraram que 18,3% dos cães assintomáticos infectaram flebotomíneos durante a realização de xenodiagnóstico, comprovando a participação destes animais no ciclo do parasito.

Alguns autores avaliam a densidade parasitária em diferentes tecidos de cães com LVC, visando identificar os principais sítios de localização e proliferação do parasito (REIS et al., 2006b; XAVIER et al., 2006).

No presente trabalho, a imunoistoquímica determinou que, o órgão mais intensamente parasitado foi o baço, tanto nos cães do grupo SEC quanto CEC, sendo que neste segundo grupo a pele apresentou parasitismo semelhante ao encontrado no baço. Estes resultados estão de acordo com aqueles descritos por REIS et al., (2006b), que encontraram baços e peles de orelha mais intensamente parasitados que os demais órgãos avaliados, independente do grupo clínico dos animais, o que foi avaliado pela técnica de LDU. Esta é uma questão que precisa ser mais bem estudada, pois, sabe-se que a distribuição dos parasitos, nos diferentes órgãos, não é homogênea.

Corroborando com os resultados encontrados no estudo imunoistoquímico, nosso trabalho também determinou, pela PCR em tempo real, que os órgãos mais intensamente parasitados no grupo CEC foram o baço e a pele de orelha. No entanto, no grupo SEC o parasitismo no baço, pele de orelha e medula óssea foi semelhante.

Assim, como alguns autores buscam a associação entre as subclasses de IgG e o quadro clínico dos cães com LVC, outros buscam a associação entre IgG1 e IgG2 e a carga parasitária em diferentes órgão (REIS et al., 2006b) na tentativa de se estabelecer um marcador humoral para a progressão da doença.

No nosso estudo, foi avaliada a correlação entre esses dois parâmetros (subclasse de imunoglobulina X parasitismo), não sendo possível determinar a associação entre eles, tanto com o parasitismo determinado pela imunoistoquímica quanto determinado pela PCR em tempo real, da mesma forma que não encontramos correlação entre o “status” clínico dos animais infectados e estas duas subclasses de imunoglobulina.

Estes resultados reforçam o fato de que tanto IgG1 quanto IgG2 não são marcadores imunológicos do prognóstico da LVC, por provavelmente não estarem associados ao “status” clínico da doença.

7.5. PCR em tempo real

Em 1993, HIGUCHI et al. descreveram uma técnica que permitia a detecção e a quantificação em “tempo real” da fluorescência emitida proporcionalmente à síntese dos produtos de PCR. Inicialmente, uma câmara de vídeo detectava o acúmulo do DNA de dupla fita sintetizado em cada reação de PCR através do aumento da fluorescência do brometo de etídeo, resultante de sua ligação ao DNA duplex.

Atualmente, nas reações de PCR em tempo real, corantes fluorescentes (MORISSON et al., 1999) ou sondas fluorogênicas (BASSLER et al., 1995) substituem o brometo de etídeo, que é potencialmente carcinogênico. Os corantes fluorescentes ligam-se de forma não específica aos produtos de PCR, enquanto as sondas fluorogênicas são desenhadas para liberarem fluorescência ao se anelarem

às seqüências alvo específicas (BRUÑA-ROMERO et al., 2001). A cinética do acúmulo da fluorescência durante a reação é diretamente relacionada ao número inicial de cópias de DNA permitindo a quantificação do DNA em diferentes amostras biológicas, de forma sensível e seletiva.

Embora as sondas fluorogênicas liguem-se de forma específica aos produtos da PCR e os corantes fluorescentes não o fazem, no atual trabalho, utilizamos o corante fluorescente Syber Green, que foi selecionado, sobretudo pelo baixo custo apresentado por este reagente, quando comparado às sondas (MA et al., 2006). O fato deste corante, se ligar a todos os DNAs de fita dupla, pode levar a marcação de produtos indesejados como por exemplo dímeros de iniciadores ou produtos inespecíficos, o que pode superestimar a concentração do produto de interesse. No entanto, tal problema pode facilmente ser solucionado, através da seleção adequada de iniciadores bem desenhados e também através da construção de curvas de dissociação, que para representarem apenas os produtos desejados, devem apresentar apenas um pico (MA et al., 2006). Com estes cuidados, tal reagente permite a realização da PCR em tempo real, com a mesma qualidade promovida pelas sondas fluorogênicas. BRUÑA- ROMERO et al., (2001) descreveram que a utilização do Syber Green em substituição às sondas, não levou à perda de especificidade, sensibilidade ou acurácia das reações, justificando assim, a sua utilização.

A PCR em tempo real permite uma quantificação relativa ou absoluta das amostras em estudo (MA et al., 2006). No nosso trabalho, foi realizada a quantificação absoluta das citocinas e da carga parasitária nos diferentes órgãos, que utiliza curvas-padrão construídas a partir de concentrações conhecidas dos cDNAs ou DNAs de interesse ligados à plasmídeos. CIKOS et al., (2007)

compararam diferentes formas de se analisar os resultados obtidos pela PCR em tempo real. Os melhores resultados foram obtidos pelo método da curva-padrão, semelhante ao que foi empregado no nosso trabalho.

7.5.1. Determinação do perfil de citocinas

A resposta imune efetiva na LVC não é completamente compreendida, uma vez que a maioria dos estudos realizados até então, fornecem apenas uma descrição parcial desta resposta, não refletindo o que realmente ocorre nos órgãos-alvos da infecção.

O conhecimento, dos mecanismos envolvidos na regulação da resposta imune celular *in situ*, poderá ser aplicado no desenvolvimento de vacinas e quimioterápicos direcionados para estes órgãos (SANCHEZ, et al. 2004).

Alguns estudos, utilizando células mononucleares do sangue periférico de cães experimentalmente infectados, sugeriram uma associação entre a resposta imune celular do tipo Th1 e a resistência à LVC (PINELLI et al., 1994; SANTOS-GOMES et al., 2002). Por outro lado, esta mesma associação não foi identificada em um estudo similar realizado em amostras de aspirado de medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* (QUINNELL et al., 2001). Estes estudos, no entanto, não refletem necessariamente o que ocorre nos órgãos acometidos.

No nosso trabalho avaliou-se a expressão de citocinas do tipo Th1 e citocinas regulatórias em amostras de baço, fígado, linfonodo, medula óssea e pele de orelha de cães com formas clínicas polares da LVC. Estes órgãos são os principais alvos de disseminação do parasito. Após a transmissão da infecção pelo

vetor, os parasitos se multiplicam inicialmente na pele do animal, no sítio de inoculação, a partir de onde são disseminados por via linfática ou sanguínea para a medula óssea, linfonodos, fígado e baço (REIS et al., 2006a).

No nosso estudo, a produção de IFN- γ e IL-12 nos baços dos cães revelou que não houve diferença nos níveis destas citocinas entre os cães SEC e CEC que, no entanto foram superiores aos cães não infectados. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por LAGE et al., (2007) que avaliaram de forma semi-quantitativa a produção destas citocinas nos baços de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, encontrando um balanço na produção de citocinas Th1 e regulatórias. Estes autores, no entanto, não detectaram a expressão de IFN- γ nos baços de cães não infectados, o que não ocorreu em nosso estudo, no qual uma produção basal desta citocina foi detectada em amostras de todos os animais NI. Esta diferença provavelmente se deve ao fato, de que, nosso trabalho empregou uma técnica de quantificação mais sensível que a empregada por LAGE et al. (2007), que permitiu a constatação da expressão das citocinas mesmo em níveis mais baixos. Estes resultados sugerem que a expressão destas citocinas nos baços dos cães com LVC não é um bom indicador de resistência, ao contrário do que ocorre no modelo murino, já que os níveis das duas foram semelhantes tanto em cães SEC quanto CEC.

Ainda nos baços dos cães do nosso estudo, não foi constatada diferença na expressão de IL-4 e IL-10 entre cães SEC e CEC, o que também está de acordo com LAGE et al., (2007). CORRÊA et al. (2007), também encontraram níveis semelhantes de expressão de IL-10 nos sobrenadantes de culturas de baço dos cães assintomáticos e sintomáticos. Estes resultados sugerem que a expressão destas citocinas no baço não podem ser associadas à progressão da doença, já que

foram encontrados níveis semelhantes nos cães com diferentes formas clínicas da LVC.

Já a expressão de TGF- β foi superior no grupo de cães CEC em relação aos demais. Uma ação inibitória, sobre a atividade microbicida dos macrófagos, é atribuída a esta citocina (BARRAL et al., 1993). Tal fato pode indicar a associação entre TGF- β e a progressão da doença, já que foi evidenciada em nosso estudo, em níveis mais acentuados no grupo de cães CEC da doença. No entanto, nossos resultados discordam com aqueles encontrados por CORRÊA et al. (2007), que determinaram níveis superiores de TGF- β no sobrenadante de células esplênicas de cães assintomáticos em relação aos cães sintomáticos.

A expressão de TNF- α foi superior nos baços dos cães SEC em relação aos demais grupos. Esta citocina atua induzindo a produção de óxido nítrico, responsável pela morte das amastigotas no interior dos macrófagos (LIEW et al., 1993). Dessa forma, nossos resultados sugerem que, a expressão de TNF- α nos baços dos cães infectados, está associada à resistência ao desenvolvimento da doença, já que níveis mais elevados foram encontrados nos cães SEC. No entanto, estes resultados não estão de acordo com LAGE et al., (2007), que encontraram níveis semelhantes de TNF- α nos baços dos cães de grupos apresentando diferentes formas clínicas da doença, não evidenciando a associação entre TNF- α e proteção na LVC, constatada em nosso estudo.

A expressão mais acentuada de TGF- β nos baços dos cães CEC e de TNF- α nos baços dos cães SEC podem justificar os números mais elevados de amastigotas neste órgão dos cães CEC em relação aos cães SEC, que foram constatados tanto pela técnica de PCR em tempo real, quanto pela

imunoistoquímica, já que as demais citocinas neste órgão apresentaram níveis de expressão semelhantes nos dois grupos com formas polares da doença.

A avaliação da expressão das citocinas nos fígados dos cães deste experimento revelou que os níveis de IFN- γ e TGF- β foram significativamente superiores nos cães naturalmente infectados por *L. chagasi* em relação aos cães não infectados. Estes resultados sugerem que a infecção por *L. chagasi* induziu o aumento da expressão destas citocinas nos fígados dos cães, que, no entanto, não estão relacionadas à progressão ou resistência à infecção, já que os seus níveis foram semelhantes entre os grupos CEC e SEC. CORRÊA et al., (2007) dosaram estas duas citocinas no sobrenadante de células do fígado de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* e encontraram resultados discordantes dos nossos, já que os níveis de IFN- γ e TGF- β foram significativamente superiores no grupo de cães assintomáticos em relação ao grupo sintomáticos.

Os níveis de expressão de IL-12 e TNF- α , nos fígados dos cães do nosso trabalho, foram semelhantes entre todos os grupos. Já os níveis de expressão de IL-4 e IL-10 foram superiores nos fígados dos cães CEC em relação aos demais cães. Estes resultados indicam a participação destas citocinas na progressão da doença, já que foram evidenciadas em maiores níveis nos fígados de cães apresentando uma forma grave da doença. Estas citocinas também foram relacionadas a altas cargas parasitárias nos fígados determinadas tanto pela imunoistoquímica quanto pela PCR em tempo real. Nossos resultados, no entanto, não estão de acordo com aqueles encontrados por CORRÊA et al., (2007) que encontraram níveis semelhantes de IL-10 nos fígados de cães assintomáticos e sintomáticos.

A avaliação da expressão de citocinas, nos linfonodos dos cães deste experimento, revelou que os níveis de IFN- γ e TNF- α foram superiores no grupo de

cães SEC em relação aos animais NI e CEC. Os níveis elevados destas citocinas nos linfonodos dos cães SEC podem estar associados com a proteção à infecção e ao controle da proliferação do parasito, já que neste grupo a carga parasitária nos linfonodos foi significativamente inferior em relação aos cães CEC. Os níveis de IL-4 e IL-12 foram semelhantes nos linfonodos dos três grupos experimentais. Já os níveis de IL-10 e TGF- β foram significativamente superiores nos linfonodos dos cães CEC em relação aos cães SEC e NI. A expressão acentuada destas citocinas nos linfonodos dos cães CEC pode estar relacionada à progressão da doença e a proliferação do parasito neste órgão. Na literatura, não foram publicados outros trabalhos que avaliaram a expressão de citocinas em linfonodos de cães com LVC. Em nosso estudo, o linfonodo foi o único órgão que apresentou uma clara dicotomia na expressão de citocinas, com os cães SEC apresentando maior expressão de citocinas do tipo Th1 (IFN- γ e TNF- α) e os cães CEC com expressão mais acentuada de citocinas regulatórias (IL-10 e TGF- β). Estudos em modelo murino mostram esta clara dicotomia, com citocinas do tipo Th1 associadas à resistência à infecção e com as citocinas regulatórias associadas à progressão da doença (MURRAY et al., 2002; BELKAID et al., 2001; KANE et al., 2001).

A expressão de IFN- γ nas medulas ósseas dos cães deste experimento revelou níveis superiores nos cães CEC quando comparados aos demais grupos. QUINNELL et al. (2001) avaliaram a expressão de diferentes citocinas na medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, encontrando níveis de expressão semelhantes de IFN- γ entre os cães assintomáticos e sintomáticos, o que difere dos nossos resultados. Além disso, estes autores não identificaram a expressão desta citocina nas medulas ósseas dos cães não infectados, enquanto

em nosso trabalho foi constatada uma expressão basal desta citocina em todos os cães NI.

Ainda nas medulas ósseas dos cães do nosso experimento, não foram encontradas diferenças na expressão de IL-12, IL-4 e IL-10 entre os cães SEC e CEC. Já QUINNELL et al., (2001) encontraram níveis mais elevados de IL-4 nas medulas ósseas dos cães sintomáticos em relação aos assintomáticos. No entanto, estes mesmos autores reconhecem que o papel imunorregulador desta citocina, inclusive no modelo murino ainda é controverso uma vez que ALEXANDER et al., (2000) demonstraram o papel da IL-4 na resistência à infecção e no sucesso terapêutico de camundongos infectados. QUINNELL et al. (2001) determinaram níveis semelhantes de IL-10 entre os cães assintomáticos, sintomáticos e não infectados. Estes autores citam que, a presença de IL-10, em níveis basais nas medulas ósseas de cães NI, reflete o seu papel na regulação da hematopoiese. Ao contrário dos resultados obtidos por estes autores, os níveis de IL-10 em nossos cães naturalmente infectados foram significativamente superiores em relação aos cães não infectados, indicando que a infecção promoveu um aumento da expressão desta citocina nas medulas ósseas, embora a mesma não esteja relacionada ao “status” clínicos da doença, já que apresentou níveis semelhantes entre cães SEC e CEC. QUINNELL et al., (2001) ainda sugerem a pesquisa, nas medulas ósseas de cães com LVC, da expressão de TGF- β , considerada uma citocina inibitória.

No atual trabalho, a expressão de TGF- β foi avaliada nas medulas ósseas de todos os cães. Foram identificados níveis mais acentuados de expressão desta citocina nos cães CEC em relação aos demais cães, indicando sua possível participação na progressão da doença, como havia sido sugerido por QUINNELL et al., (2001).

Os níveis de TNF- α foram superiores nas medulas ósseas dos cães SEC em relação aos demais grupos experimentais.

Tais resultados sugerem que, assim como constatado nos baços, a expressão mais acentuada de TGF- β nas medulas ósseas de cães com LVC está relacionada à progressão da doença enquanto a expressão de TNF- α está relacionada à proteção e podem justificar os números mais elevados de amastigotas nas medulas ósseas dos cães CEC em relação aos cães SEC, constatados tanto pela PCR em tempo real, quanto pela imunistoquímica.

Quando a expressão de citocinas foi avaliada nas amostras das peles de orelha dos cães em estudo, constatou-se que os níveis de IFN- γ , IL-4, IL-10, TNF- α e TGF- β foram superiores no grupo de cães CEC em relação aos demais grupos.

BRACHELENTE et al., (2005) compararam a expressão de algumas citocinas em fragmentos de pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum* com cães não infectados, normais ou apresentando flebite. Neste estudo, os autores constataram que os animais com LVC, apresentaram níveis mais elevados de expressão de IFN- γ , IL-4 e TNF- α , que os grupos controles, indicando que a infecção levou a um aumento da expressão destas citocinas. Estes autores ainda evidenciaram que a expressão de IL-4 foi associada com uma maior severidade da doença e com altas cargas parasitárias, embora não tenham realizado uma comparação entre as formas assintomáticas e sintomáticas da doença. Dessa forma, estes autores demonstraram que a forma grave da LVC está associada a um padrão de resposta com a produção de citocinas anti-inflamatórias na pele dos animais infectados e sugeriram a pesquisa de IL-10 na pele de animais infectados, para reforçarem estes resultados. Assim como BRACHELENTE et al. (2005) os níveis de IL-4 nas amostras de pele foram superiores nos cães do nosso estudo, com doença

grave. A determinação dos níveis de IL-10 nas peles dos cães também indicou a participação desta citocina na progressão da doença já que foram superiores no grupo CEC em relação aos demais. De forma semelhante, os níveis de TGF- β foram superiores nos cães CEC em relação aos demais, sendo que os níveis desta citocina também foram superiores no grupo SEC em relação aos cães NI. Os níveis de IL-12, no entanto, foram semelhantes nas amostras de pele dos cães dos três grupos experimentais, não sendo associados ao “status” da doença.

Dessa forma, este trabalho revelou que, tanto citocinas do tipo Th1 (IFN- γ e TNF- α) quanto citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10 e TGF- β) foram superiores nas peles de orelha dos cães CEC em relação aos cães SEC. Este balanço, na expressão de citocinas, mostra a complexidade da infecção canina em relação aos sistemas estudados no modelo murino com *L. major*, onde se verifica uma clara dicotomia na produção de citocinas. Nossos resultados sugerem que apesar da produção concomitante das citocinas Th1 e regulatórias nas peles dos cães CEC, o balanço final deve estar favorecendo as citocinas regulatórias que provavelmente estão inibindo a atuação das citocinas Th1, já que os cães deste grupo desenvolveram sinais clínicos da doença e apresentaram altas cargas parasitárias na pele, indicando que estes animais não foram capazes de controlar a proliferação do parasito.

Conclusões

8. CONCLUSÕES

✓ A PCR em tempo real mostrou-se mais sensível que a imunistoquímica na quantificação do parasitismo tecidual permitindo a diferenciação da intensidade desse parasitismo entre cães apresentando formas polares da leishmaniose visceral canina, embora estas duas técnicas tenham apresentado correlação positiva em todos os órgãos com exceção do fígado.

✓ A PCR em tempo real permitiu a quantificação das citocinas em estudo, mesmo em baixos níveis de expressão.

✓ A infecção por *Leishmania chagasi* induziu uma resposta imune celular com produção de citocinas do tipo Th1 e regulatórias nos diferentes órgãos estudados, uma vez que, os níveis de expressão da maioria das citocinas pesquisadas foram significativamente superiores nos cães naturalmente infectados em relação aos cães controle não infectados.

✓ O perfil de citocinas apresentou diferentes características entre baço, fígado, linfonodo cervical superficial, medula óssea e pele de orelha dos cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, indicando que os microambientes, dos órgãos mais ricamente parasitados na leishmaniose visceral canina, apresentam diferentes mecanismos de interação parasito-hospedeiro, que desencadeiam o desenvolvimento de diferentes padrões de resposta imune celular.

✓ Nos baços e medulas ósseas, dos cães naturalmente infectados, enquanto a expressão de TNF- α mostrou-se associada à resistência, a expressão de TGF- β mostrou-se associada à progressão da doença e à proliferação do parasito. As

demais citocinas pesquisadas nestes órgãos não puderam ser associadas aos quadros clínicos da leishmaniose visceral canina, já que níveis semelhantes foram identificados nos grupos sem e com expressão clínica da doença.

✓ A expressão de IL-4 e IL-10, nos fígados dos cães com leishmaniose visceral canina, parece estar associada à progressão da doença e à proliferação do parasito, já que níveis mais elevados foram expressos nos cães com expressão clínica da doença.

✓ O linfonodo cervical superficial apresentou uma clara dicotomia na expressão de citocinas, com cães sem expressão clínica apresentando maiores níveis de expressão de citocinas Th1 e cães com expressão clínica da doença apresentando maior expressão de citocinas regulatórias, como é verificado no modelo murino.

✓ A produção concomitante de níveis elevados tanto de citocinas Th1 quanto de citocinas regulatórias, na pele de orelha cães com expressão clínica da doença, revela um balanço na produção destas citocinas, que, no entanto, parece favorecer as citocinas regulatórias, que provavelmente, estão inibindo as citocinas do tipo Th1, já que esses cães apresentaram manifestações clínicas da doença, além de altas cargas parasitárias.

✓ IFN- γ e IL-12 parecem não estar associadas à resistência à infecção, como é evidenciado no modelo murino, já que níveis mais elevados destas citocinas não foram evidenciados na maioria dos órgãos dos cães sem expressão clínica em relação aos cães com expressão clínica.

✓ As subclasses de imunoglobulinas IgG1 e IgG2 parecem não estar associadas ao “status” clínico dos cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, uma

vez que, títulos semelhantes de ambas foram encontrados em cães com e sem expressão clínica da leishmaniose visceral.

✓ Nossos resultados mostram que cães, com expressão clínica da leishmaniose visceral, apresentam altas cargas parasitárias nos órgãos mais frequentemente acometidos e isto está associado a uma expressão de citocinas usualmente associadas com uma resposta imune anti-inflamatória.

✓ O bloqueio destas citocinas anti-inflamatórias, em cães infectados, pode representar um tratamento coadjuvante importante para o controle da doença canina.

Referências Bibliográficas

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, P.; SILVA, M.C.P.; CONCEICAO-SILVA, F.M.; SANTOS-GOMES, G.M.; JANZ, J.G. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol*, v.77, p.557-561, 1991.

ALEXANDER, J.; CARTER, K.C.; AL-FASI, N.; SATOSKAR, A.; BROMBACHER, F. Endogenous IL-4 is necessary for effective drug therapy against visceral leishmaniasis. *Eur J Immunol*, v.39, p.2935-43, 2000.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, v.215, n.3, p.403-10, 1990.

ALVAR, J.; YACTA YO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol*, v.22, n.12, p.552-557, 2006.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine Leishmaniasis. *Adv Parasitol*, v.57, p.1-88, 2004.

AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRIGUEZ, F.; TESOURO, M.A. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *Eur J Epidemiol*, v.18, n.2, p.147-156, 2003.

ANDERSEN, A.C.; SCHALM, O.W. The beagle as an experimental dog. In HEMATOLOGY. 1970, (Andersen, A.C., ed.) Iowa State University Press, Ames, p.261-281.

ANDRADE, H.M.; DE TOLEDO, V.P.; MARQUES, M.J.; FRANÇA, J.C.S.; TAFURI, W.L.; MAYRINK, W.; GENARO, O. *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. *Vet Parasitol*, v.103, n.1-2, p.71-81, 2002.

ANDRADE, H.M.; TOLEDO, V.P.C.P.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Evaluation of the Immune Response and Production of Interferon in Canine Visceral Leishmaniasis. *Revue Med Vet*, v.150, n.10, p.809-814, 1999.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*, v.30, p.1269-1281, 2000.

ASHFORD, D.A.; DAVID, J.R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULALIO, M.C.; SAMPAIO, D.P.; BADARO, R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *A J Trop Med Hyg*, v.59, p.53-57, 1998.

BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and cat. 3^a ed. Canada: Saunders Elsevier, 2006, cap.73, p.685-698.

BANETH, G.; SHAW, S.E. Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*, v.106, p.315-324, 2002.

BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; YONG, E.C.; BROWNELL, C.E.; TWARDIZIK, D.R.; REED, S.G. Transforming growth factor β as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.90, p.3442-3446, 1993.

BARBIÉRI, C.L. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol*, v.28, n.7, p.329-337, 2006.

BASSLER, H.A.; FLOOD, S.J.; LIVAK, K.J.; MARMARO, J.; KNORR, R.; BATT, C.A. Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*, v.61, p.3724-8, 1995.

BELKAID, Y.; ROUSE, B.T. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Rev Immunol*, v.6, n.4, p.353-60, 2005.

BELKAID, Y.; HOFFMANN, K.F.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; UDEY, M.C.; WYNN, T.A.; SACKS, D.L. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Méd*, v.194, n.10, p.1497-506, 2001.

BISTNER, S.I.; FORD, R.B.; RAFFE, M.R. Manual de procedimentos veterinários e tratamento emergencial. 7^a ed. São Paulo: Roca, 2002, 934p.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*, v.2, n.10, p. 907-16, 2001.

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; HOAREAU, E.; BOEHRINGER, C.; STOLLE, T.; CHABANNE, L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet Immunol Immunopathol*, v.59, n.1-2, p.21-30, 1997.

BOURREAU, E.; PRÉVOT, G.; GARDON, J.; PRADINAUD, R.; LAUNOIS, P. High Intralésional Interleukin 10 Messenger RNA Expression in Localized Cutaneous Leishmaniasis Is Associated with Unresponsiveness to Treatment. *J Infect Dis*, v.184, p.1628-1630, 2001.

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

BRETAGNE, S.; DURAND, R.; OLIVI, M.; GARIN, J.F.; SULAHIAN, A.; RIVOLLET, D.; VIDAUD, M.; DENIAU, M. Real-Time PCR as a New Tool for Quantifying *Leishmania infantum* in Liver in Infected Mice. *Clin Diagn Lab Immunol*, v.8, n.4, p.828-831, 2001.

BRUÑA-ROMERO, O.; HAFALLA, J.C.R.; GONZÁLEZ-ASEGUINOLAZA, G.; SANO, G.; TSUJI, M.; ZAVALA, F. Detection of malaria liver-stages in mice infected through the bite of a single *Anopheles* mosquito using a highly sensitive real-time PCR. *Int J Parasitol*, v.31, p.1499-1502, 2001.

BRUNDA, M.J. Interleukin-12. *Review. J Leukoc Biol*, v.55, p.280-288, 1994.

BURILLO, F.L.; PEREZ, F.M.G.; LIESA, J.P.; FABIAN, M.C.A. Iron status and anemia in canine leishmaniasis. *Revue Med Vet*, v.145, n.3, p.171-176, 1994.

CAMARGO, M.E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v.8, n.5, p.227-234, 1966.

CAMPINO, L.M. In: FARREL J., ed., *World Class Parasites: Leishmania*, v.4, *Kluwer Academic Publishers*. Boston, Dordrecht, London, 2003.

CANÃVATE, C.; CRUZ, I.; FLORES, M. Leishmanioses canina: diagnóstico. *Información Veterinária: La leishmanioses canina 1ª parte*, p.28-32, 2005.

CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, v.103, p.67-75, 2005.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R.D. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec*, v.141, p.539-543, 1997.

CIKOS, S.; BUKOVSKA, A.; KOPPEL, J. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Molecular Biology*, v.8, n.1, p.1-38, 2007.

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

CORREDOR, A.; GALLEGOS, J.F.; TESH, R.B.; PELEZ, D.; DIAZ, A.; MONTILLA, M.; PALU, M.T. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colombia, South America. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.83, p.195, 1989.

COSTA-VAL, A.P.; CAVALCANTI, R.R.; DE FIGUEIREDO GONTIJO N.; MICHALICK, M.S.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, M.N. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Vet J*, v.174, n.3, p.636-43, 2007.

CUNHA, A.M. & CHAGAS, E. Estudos sobre o parasito. In: *Leishmaniose Visceral Americana, nova entidade mórbida do homem na América do Sul*. *Mem Ins Oswaldo Cruz*, v.32, p.329-337, 1937.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol*, v.72, n.2, p.132-41, 2002.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, v.3, n.48, p.151-156, 2006.

DE AMORIM, I.F.G. *Avaliação do perfil humoral de cães vacinados com Leishmune® residentes em áreas endêmicas de Leishmaniose Visceral Canina*. 2007. 83f. Dissertação (Mestrado em Clínica e Cirurgia Veterinárias). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DEPLAZES, P.; SMITH, N.C.; ARNOLD, P.; LUTZ, H.; ECKERT, J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol*, v.17, n.9, p.451-458, 1995.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v.27, n.5, p.305-318, 2004.

DIETZE, R.; BARROS, G.B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis*, v.25, n.5, p.1240-2, 1997.

DOS SANTOS, S.O.; ARIAS, L.; RIBEIRO, A.A.; DE PAIVA HOFFMANN, M.; DE FREITAS, R.A.; MALACCO, M.A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Med Vet Entomol*, v.12, n.3, p.315-317, 1998.

ELKHOURY, A.N.S.M. Vigilância e controle da leishmaniose visceral no Brasil. In: CONSULTA DE EXPERTOS OPS/OMS SOBRE LEISHMANIASIS VISCERAL EM LAS AMÉRICAS, 1., 2005, Brasília. *Informe final de la reunion de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis em las Américas*. Rio de Janeiro: Organización Panamericana de Salud, 2006. p.24-26.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo. *Clin Vet*, v.5, n.28, p.36-44, 2000.

FERRER, L.; AISA, M.J.; ROURA, X.; PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Rec*, v.136, n.20, p.514-6, 1995.

FERRER, L. Leishmaniasis In KIRK, R.W.; BONAGURA, J.D. *Kirk's current veterinary therapy XI: small animal practice*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992, p.266-270.

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

GAMA, M.E.A.; COSTA, I.M.L.; PEREIRA, J.C.R.; GOMES, C.M.C. Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. *Braz J Med and Biol Res*, v.37, p.129-136, 2004.

GASIM, S.; ELHASSAN, A.M.; KHALIL, E.A.; ISMAIL, A.; KADARU, A.M.; KHARAZMI, A.; THEANDER, T.G. High levels of plasma IL-10 and expression of IL-10 by keratinocytes during visceral leishmaniasis predict subsequent development of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Clin Ex Immunol*, v.111, n.64, 1998.

GENARO, O. *Leishmaniose visceral canina experimental*. 1993. 202f. Tese (Doutorado em Ciências), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GERARD, G.F.; FOX, D.K.; NATHAN, M.; D'ALESSIO, J.M. Reverse transcriptase. The use of cloned moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA, *Mol Biotechnol*, v.8, n.1, p.61-77, 1997.

GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CARNEIRO, C.M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; REIS, A.B. Relation between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Path*, v.135, p.100-107, 2006.

GRIMA, M.Z. Leishmaniosis canina: panorámica general de la enfermedad. *Información Veterinária: La leishmaniosis canina 1ª parte*, p.14-18, 2005.

GRIMALDI, G.JR.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev*, v.6, n.3, p.230-50, 1993.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)*, v.11, n.9, 1026-30, 1993.

INIESTA, L.; GALLEGO, M.; PORTÚS, M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. *Vet Immunol Immunopathol*, v.103, n.1-2, p.77-81, 2005.

IÑIGUEZ, S.R.; DEA-AYUELA, M.A.; SANCHEZ-BRUNETE, J.A.; TORRADO, J.J.; ALUNDA, J.M.; BOLAS-FERNANDEZ, F. Real time reverse transcription-PCR quantification of cytokine mRNA expression in golden syrian hamster infected with *Leishmania infantum* and treated with a new amphotericin b formulation. *Antimicrob Agents Chemother*, v.50, n.4, p.1195-1201, 2006.

KANE, M.M.; MOSSER, D.M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol*, v.166, p.1141-1147, 2001.

KOUTINAS, A.F.; POLIZOPOULOU, Z.S.; SARIDOMICHELAKIS, M.N. Clinical considerations on canine visceral leishmaniosis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J Am Anim Hosp Assoc*, v.35, p.376-383, 1999.

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

LAMOTHE, J. Treatment of canine leishmaniasis from A (Amphotericin B) to Z (Zyloric®). In: Canine Leishmaniasis: An update, 1, 1999, Barcelona. *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis forum*. Sumène, ed., agosto 1999, p.60-64.

LAVERAN, A.; MESNIL, F. Sur un protozaire nouveau (*Piroplasma donovani* Lav. & Mesn.). Parasite d' une fièvre de l'Ind. *Comp R Hébd Séanc Acad Sci*, v.137, p.957-961, 1903.

LEANDRO, C.; SANTOS-GOMES, G.M.; CAMPINO, L.; ROMÃO, P.; CORTES, S.; ROLÃO, N.; GOMES-PEREIRA, S.; RIÇA CAPELA, M.J.; ABRANCHES, P. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, v.79, n.3-4, p.273-284, 2001.

LIEW, F.Y.; O'DONNELL, C.A. Immunology of leishmaniasis. *Adv Parasitol*, v.32, p.161-259, 1993.

LIMA, V.M.F.; PEIRO, J.R.; VASCONCELOS, R.O. IL-6 e TNF- α production during active canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, v.115, p.189-193, 2007.

LIMA, W.G.; MICHALICK, M.S.; DE MELO, M.N.; LUIZ TAFURI, W. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Trop*, v.92, p.43-53, 2004.

LOPEZ, R.; LUCENA, R.; NOVALEZ, M. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *Zent Vet*, v.43, p.460-474, 1996.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; RANDALL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*, v.193, p.265-275, 1951.

MA, H.; SHIEH, K.; CHEN, G.; QIAO, X.T.; CHUANG, M. Application of Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *J Am Science*, v.2, n.3, p.1-15, 2006.

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

MARY, C.; FARAUT, F.; LASCOMBE, L.; DUMON, H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microb*, v.42, n.11, p.5249-5255, 2004.

MAURICIO, I.L.; STOHARD, J.R.; MILES, L.A. The stranger case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*, v.16, p.188-189, 2000.

MAZZA, G.; DUFFUS, W.P.; ELSON, C.J.; STOKES, C.R.; WILSON, A.D.; WHITING, A.H. The separation and identification by monoclonal antibodies of dog IgG fractions. *J Immunol Methods*, v.161, n.2, p.193-203, 1993.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica.-Brasília: Ministério da Saúde, 2004.

MIRALLES, G.D.; STOECKLE, M.Y.; McDERMOTT, D.F.; FINKELMAN, F.D.; MURRAY, H.W. Th1 e Th2 Cell- associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun*, v.62, n.3, p.1058-1063, 1994.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol*, v.18, n.9, p.399-405, 2002.

MORRISON, T.B.; MA, Y.; WEIS, J.H.; WEIS, J.J. Rapid and Sensitive Quantification of *Borrelia burgdorferi*-Infected Mouse Tissues by Continuous Fluorescent Monitoring of PCR. *J Clin Microbiol*, v.37, n.4, 1999.

MURRAY, H.W.; SQUIRES, K.E.; MIRALLES, C.D.; STOECKLE, M.Y.; GRANGER, A.M.; GRANELLI-PIPERNO, A.; BOGDAN, C. Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. *J Immunol*, v.148, p.1858-1863, 1992.

MURRAY, H.W.; LU, C.M.; MAUZE, S.; FREEMAN, S.; MOREIRA, A.L.; KAPLAN, G.; COFFMAN, R.T. Interleukin- 10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infect Immun*, v.70, n.11, p.6284-6293, 2002.

MURTA, S.M.; KRIEGER, M.A.; MONTENEGRO, L.R.; CAMPOS, F.F.; PROBST, C.M.; AVILA, A.R.; MUTO, N.H.; DE OLIVEIRA, R.C.; NUNES, L.R.; NIRDE, P.; BRUÑA-ROMERO, O.; GOLDENBERG, S.; ROMANHA, A.J. Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benzimidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, v.146, n.2, p.151-62, 2006.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, United States. < <http://www.nlm.nih.gov/> > 2007.

NICOLAS, L.; PRINA, E.; LANG, T.; MILON, G. Real-Time PCR for detection and quantification of *Leishmania* in mouse tissues. *J Clin Microbiol*, v.40, n.5, p.1666-1669, 2002.

NICOLLE, C. Nouvelles acquisitions sur lè Kala-Azar: Cultures inoculations au chien, étiologi. C R Hebd. *Séances et l'Acad Sci Paris*, v.146, p.498-499, 1908.

NIETO, C.G.; GARCÍA-ALONSO, M.; REQUENA, J.M.; MIRÓN, C.; SOTO, M.; ALONSO, C.; NAVARRETE, I. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, v.67, n.2, p.117-30, 1999.

NIETO, C.G.; NAVARRETE, I.; HABELA, M.A.; SERRANO, F.; REDONDO, E. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol*, v.45, n.1-2, p.33-47, 1992.

NOLI, C. Canine leishmaniasis, *Waltham Focus*, v.9, n.2, p.16-24, 1999.

O'GARRA, A.; VIEIRA, P. Regulatory T Cells and mechanisms of immune system control. *Nat Medicine*, v.10, n.8, p.801-805, 2004

PALATNIK-DE-SOUZA, C.B.; DOS SANTOS, W.R.; FRANÇA-SILVA, J.C.; DA COSTA, R.T.; REIS, A.B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *A J Trop Med Hyg*, v.65, p.510-517, 2001.

PEÑA, M.T.; ROURA, X.; DAVIDSON, M.G. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). *Vet Ophthalmol*, v.3, n.1, p.35-41, 2000.

PIARROUX, R.; AZAIEX, R.; LOSSI, A.M.; REYNIER, P.; MUSCATELLI, F.; GAMBARELLI, F.; FONTES, M.; DUMON, H.; QUILICI, M. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, v.49, n.3, p.364-369, 1993.

PINELLI, E.; VAN DER KAAIJ, S.Y.; SLAPPENDEL, R.; FRAGIO, C.; RUITENBERG, E.J.; BERNADINA, W.; RUTTEM, V.P.M.G. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol*, v.69, p.121-126, 1999.

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*, v.62, n.1, p.229-335, 1994.

PRASAD, R.; KUMAR, R.; JAISWAL, B.P.; SINGH, U.K. Miltefosine: An oral drug for visceral leishmaniasis. *Indian J Pediatr*, v.71, n.2, p.143-4, 2004.

PROFETA DA LUZ, Z.M.; PIMENTA, D.N.; CABRAL, A.L.; FIUZA, V.O.; RABELLO, A. Leishmaniasis urbanization and low diagnosis capacity in the Metropolitan Region of Belo Horizonte. *Rev Bras Med Trop*, v.34, n.3, p.249-254, 2001.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L.M.; KAYE, P.M.; SHAW, M.A.; DYE, C.; DAY, M.J. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, v.91, n.3-4, p.161-8, 2003.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; SHAW, M.A.; DAY, M.J.; GARCEZ, L.M.; DYE, C.; KAYE, P.M. Tissue Cytokine Responses in Canine Visceral Leishmaniasis. *J Infect Dis*, v.183, p.1421-1424, 2001.

RHALEM, A.; SAHIBI, H.; LASRIS, S.; JAFFE, C.L. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. *Vet Immunol Immunopathol*, v.71, p.69-76, 1999.

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

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; FRANCA-SILVA, J.C.; GIUNCHETTI, R.C.; 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*, v.81, p.68-75, 2006a.

REIS, A.B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, AM.; MARQUES, M.J.; GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GUERRA, L.L.; ANDRADE, R.A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*, v.3, n.112, p.102-16, 2006b.

RIBEIRO, R.R. *Biodistribuição, Toxicidade e Eficácia Terapêutica da Formulação de Antimoniato de Meglumina Encapsulado em Lipossomas Nanométricos em Cães Naturalmente Infectados com Leishmania (Leishmania) chagasi (CUNHA & CHAGAS, 1903)*. 2007. 149f. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ROSS, R. (1) Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and (2) further notes on Leishman's bodies. *Brit Med J*, v.2, p.1261-1401, 1903.

SAMBROOK, J.; FRITSH, E.F.; MANIATIS, T. Gel Electrophoresis: Polyacrylamide Gel Electrophoresis. In_ *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. Cap.5, p.173-180.

SAMBROOK, J.; FRITSH, E.F.; MANIATIS, T. Gel Electrophoresis: Agarose Gel Electrophoresis. In_ *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. Cap.5, p.149-167.

SAMBROOK, J.; FRITSH, E.F.; MANIATIS, T. Extraction, Purification, and Analysis of mRNA from Eukaryotic Cells: Electrophoresis of RNA through gels containing formaldehyde. In_ *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. Cap.6, p.202-203.

SAMBROOK, J.; FRITSH, E.F.; MANIATIS, T. Analysis of Recombinant DNA Clones: Alkaline Lysis Method. In_ *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. Cap.11, p.368-369.

SANCHEZ, M.A.; DIAZ, N.L.; ZERPA, O.; NEGRON, E.; CONVIT, J.; TAPIA, F.J. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg*, v.70, n.6, p.618-624, 2004.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.74, p.5463-5467, 1977.

SANT'ANA, J.A.P.; LIMA, W.G.; OLIVEIRA, M.R.; SIMÕES, L.A.; MICHALICK, M.S.M.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; TAFURI, W.L. Hepatic granulomas in canine visceral leishmaniasis and clinical status. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 2007 (IN PRESS).

SANTOS, L.R.; BARROUIN-MELO, S.M.; CHANG, Y.; OLSEN, J.; McDONOUGH, S.P.; QUIMBY, F. Recombinant single-chain canine interleukin 12 induces interferon gamma mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of dogs with visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, v.98, p.43-48, 2004.

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

SCHULTZE, A.E. Interpretation of canine leukocyte responses. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. Schalm's veterinary hematology. 5th. Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2000. p.366-381.

SHAW, J.J. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. In: FARREL J., ed., World Class Parasites: *Leishmania*, v.4, Kluwer Academic Publishers. Boston, Dordrecht, London, 2003.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.F.; PACHECO, R.S.; BRASIL, R.P. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. *Genetics and Molecular Research*, v.3, n.2, p.251-257, 2004.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.; PACHECO, R.S.; FIUZA, V.O.; BRASIL, R.P. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.96, n.3, p.285-291, 2001a.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.F.; PIRMEZ, C.; FERNANDEZ, O.; BRASIL, R.P. Short report: Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, v.65, n.6, p.896-898, 2001b.

SISTO, M.; BRANDONISIO, O.; PANARO, M.A.; ACQUAFREDDA, A.; LEOGRANDE, D.; FASANELLA, A.; TROTTA, T.; FUMAROLAL MITOLO, V. Inducible nitric oxide synthase expression in *Leishmania*-infected dog macrophages. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v.24, p.247-254, 2001.

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*, v.130, p.7-12, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol*, v.39, p.560-3, 2001a.

SOLANO-GALLEGO, L.; RIERA, C.; ROURA, X.; INIESTA, L.; GALLEGO, M.; VALLADARES, J.E.; FISA, R.; CASTILLEJO, S.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; ARBOIX, M.; PORTÚS, M. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet Parasitol*, v.96, n.4, p.265-76, 2001b.

SLAPPENDEL, R.J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. *Vet Q*, v.10, n.1, p.1-16, 1988.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G. Canine Visceral Leishmaniasis. In: Recent Advances in Canine Infections Diseases. *International Veterinary Information Service*, 2000.

TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L.; ARANTES, R.M.; GONÇALVES, R.; DE MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.; TAFURI, W.L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods*, v.292, n.1-2, p.17-23, 2004.

TAFURI, W.L.; DE OLIVEIRA, M.R.; MELO, M.N. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol*, v.96, p. 203-212, 2001.

TAFURI, W.L.; TAFURI, W.L.; BARBOSA, A.J.A.; MICHALICK, M.S.; GENARO, O.; FRANCA-SILVA, J.C.; 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 São Paulo*, v.38, p.81-89, 1996.

TAVARES, C.A.P.; FERNANDES, A.P.; MELO, M.N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Ver Mol Diagn*, v.3, n.5, p.657-667, 2003.

TRAVI, B.L.; VELEZ, I.D.; BRUTUS, L.; SEGURA, I.; JARAMILLO, C.; MONTOYA, J. *Lutzomyia evansi*, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.84, n.5, p.676-677, 1990.

TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med*, v.204, n.2, p.239-43, 2007.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, v.3, n.2, p.133-46, 2003.

TRINCHIERI, G.; RENGARAJU, M.; D'ANDREA, A.; VALIANTE, N.M.; KUBIN, M.; ASTE, M.; CHEHIME, J. Producer cells of interleukin-12. *Immunol Today*, v.14, p.237-238, 1993.

TSESSARSKAYA, T.P.; GURKOVSKAYA, T.S. Seasonal variations the blood leukocyte count in dogs. *Bull Exp Med*, v.82, p.1465, 1976.

VERCAMMEN, F.; FERNANDEZ-PEREZ, F.J.; DEL AMO, C.; ALUNDA, J.M. Follow-up of *Leishmania infantum* naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and Western blot. *Acta Trop*, v.84, n.3, p.175-81, 2002.

VEXENAT, J.A.; OLLIARO, P.L.; FONSECA DE CASTRO, J.A.; CAVALCANTE, R.; FURTADO CAMPOS, J.H.; TAVARES, J.P.; MILES, M.A. Clinical recovery and limited cure in canine visceral leishmaniosis treated with aminosidine (paromomycin). *A J Trop Med Hyg*, v.58, p.448-453, 1998.

VITALE, F.; REALE, S.; VITALE, M.; PETROTTA, E.; TORINA, A.; CARACAPPA, S. TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. *Ann NY Acad Sci*, v.1026, p.139-143, 2004.

VOLLER A.; BIDWELL, W.H.; ARJONA, I. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): guide with abstracts of microplate applications. Guernsey: Dynatec Europe, 1979. p.124.

XAVIER, S.C.; DE ANDRADE, H.M.; MONTE, S.J.; CHIARELLI, I.M.; LIMA W.G.; MICHALICK, M.S.; TAFURI, W.L. 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*, v.8, p.2-17, 2006.

XAVIER, S.C. *Apectos clínicos, histopatológicos e parasitológicos da pele de cães naturalmente infectados com Leishmania (Leishmania) chagasi*. 2002. 46f. Dissertação (Mestrado em Patologia Geral) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

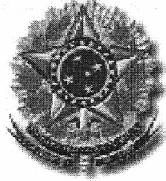
WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en_>. Acesso em 28 de janeiro de 2008.

WORTMANN, G.W.; ROMERO, L.I.; PAZ, H.M.; ORTEGA-BARRIA, E.; BAYARD, V.; HOCHBERG, L.P.; RYAN, J.R. Real-time polymerase chain reaction diagnosis of leishmaniasis in Panama from both fresh and frozen tissue. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.98, p.148-151, 2004.

ZULUETA, A.M.; VILLARROEL, E.; RODRIGUES, N.; FELICIANGELI, M.D.; MAZZARRI, M.; REYES, O.; RODRIGUES, V.; CENTENO, M. Epidemiologic aspects of American visceral leishmaniasis in a endemic focus in Eastern Venezuela. *Am J Trop Med Hyg*, v.61, n.6, p.945-950, 1999.

Anexos

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO
ANIMAL (CETEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº **121/04** relativo ao projeto intitulado "**Perfil de citocinas de cães naturalmente infectados por Leishmania (leishmania) chagasi e avaliação da eficácia da imunoterapia anti-IL-10**", que tem como responsáveis Maria Norma Melo e Mauro Martins Teixeira, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado em reunião de **01.12.2004**.

Este certificado expira-se em **01.12.2009**

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **121/04** related to the project entitled "**Citoquines profiles of naturally infected dogs with Leishmania (Leishmania) chagasi and avaluation of efficacy of immunotherapy anti-IL 10**", under the supervision Maria Norma Melo and Mauro Martins Teixeira, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)** and was approved in **01.12.2004**.

This certificate expires in **01.12.2009**.

Belo Horizonte, 01 de dezembro de 2004


Dra. CLEUZA MARIA F. REZENDE
PRESIDENTE DO CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais -Reitoria – Campus Pampulha
Avenida Antônio Carlos 6627-7 Andar CEP: 31270-901 - Belo Horizonte MG-Brasil
Telefone: (31) 3499-4031 – Fax: (31) 3499-4027 – Home page: [www. ufmg.br/prpq/cetea](http://www.ufmg.br/prpq/cetea)

ANEXO 2

Nome do animal:..... N° do animal:.....

DATA:../../.....

Achados mais freqüentes em cães com leishmaniose visceral, segundo ALVAR et al. (2004) e AMUSATEGUI et al. (2003).

	Presente	Ausente
1. Linfadenopatia:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1.1. Generalizada:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1.2. Localizada:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1.2.1. Linf. Submandibular:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1.2.2. Linf. Pré-escapular:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1.2.3. Linf. Poplíteo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Anomalias locomotoras:		
3. Sinais viscerais:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3.1. Perda de peso:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3.2. Fraqueza:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3.3. Alterações Gastrointestinais	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3.4. Epistaxe:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3.5. Uveítes:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Sinais cutâneos:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.1. Alopecia:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.2. Descamação:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.3. Hiperqueratose:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.4. Eritema:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.5. Prurido:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.6. Úlceras:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.7. Nódulos:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.8. Pústulas:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.9. Onicogribose:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.10: Lesões oculares:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Classificação clínica: Sem sinais clínicos
 Com sinais clínicos

Comentários:

ANEXO 3

Soluções utilizadas na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

- **Solução de Tampão Fosfato (PBS) pH7,4**

Na ₂ HPO ₄ (Merck, Alemanha).....	1,20g
Na ₂ HPO ₄ . H ₂ O (Merck, Alemanha).....	0,22g
NaCl (Merck, Alemanha).....	8,50g
Água destilada q.s.p.....	1000mL

- **Solução de Azul de Evans 1:100**

Azul de Evans (Sigma).....	0,10g
Água destilada q.s.p.....	10,0mL

Azul de Evans.....	50µL
PBS – Tween 80 a 2%.....	2950µL

- **Salina Tamponada**

Solução 1

Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O (0,1M)	0,268g
Água destilada q.s.p.....	10mL

Solução 2

Na ₂ HPO ₄ . H ₂ O (0,1M).....	0,138g
Água destilada q.s.p.....	10mL

Tomar 9,45mL da solução 1, adicionar 0,55mL da solução 2 dando um pH 8,0.

- **Glicerina Tamponada**

Adicionar à glicerina PA (Merck) salina tamponada suficiente para alcançar pH7,4.

ANEXO 4

Soluções utilizadas na Reação Imunoenzimática (ELISA)

- **Solução de Tampão Fosfato (PBS) pH7,6**

NaCl (Merk, Alemanha).....	21,25g
Na ₂ HPO ₄ (Merk, Alemanha).....	3,30g
Na ₂ HPO ₄ . H ₂ O (Merk, Alemanha)	0,39g
Água destilada q.s.p.....	2500mL.

- **Tampão Carbonato/Bicarbonato (Coating Buffer)**

Na ₂ CO ₃ (Merk, Alemanha).....	1,59g
NaHCO ₃ (Merk, Alemanha).....	2,93g
Água destilada q.s.p.....	1000mL.

Esta solução permanece viável a 4°C por 15 dias.

- **Solução de Lavagem**

NaCl (Merk, Alemanha).....	9g
Tween 20 (Merk, Alemanha).....	0,5mL
Água destilada q.s.p.....	1000mL

- **Solução de Bloqueio**

PBS pH 7,6.....	1000mL
Caseína (Sigma, Alemanha).....	20g

Aquecer o PBS a aproximadamente 90°C, adicionar a caseína lentamente, agitando bastante com um bastão. Filtrar e conservar em -20°C.

- **Tampão de Incubação**

PBS pH 7,6.....	1000mL
Tween 20 (Merk, Alemanha).....	0,5mL
Caseína (Sigma, Alemanha).....	2,5g

Aquecer o tampão a aproximadamente 90°C, adicionar a caseína lentamente, agitando bastante com um bastão. Filtrar, adicionar o Tween e conservar a -20°C.

- **Tampão do Substrato ou Tampão do Ácido Cítrico**

Na ₂ HPO ₄	7,19g
Ácido Cítrico (Merck, Alemanha).....	5,19g
Água destilada q.s.p.....	1000mL

- **Solução do Substrato**

OPD (Sigma Aldrick, EUA).....	10mg
H ₂ O ₂ (30V).....	4μL
Tampão do Substrato.....	10mL

Preparar no momento do uso.

- **Ácido Sulfúrico 4N**

H ₂ SO ₄ concentrado (Merck, Alemanha).....	480mL
Água destilada q.s.p.....	1000mL

ANEXO 5

Meio utilizado nas transformações

- **Meio Luria-Bertani - Meio LB Líquido (100 mL)**

Triptona ----- 1g

Extrato de Levedura - 0,5g

NaCl ----- 1g

Adicionar 90 mL de água destilada e agitar até dissolver. Ajustar o pH para 7,0 com NaOH 5N e o volume da solução para 100 mL. Autoclavar.

ANEXO 6

Soluções utilizadas na purificação dos vetores

- **Solução I**

Glicose 50mM

Tris-HCl pH8,0 25mM

EDTA pH 8,0 10mM

- **Solução II**

NaOH 0,2N

SDS 1%

- **Solução III**

Acetato de potássio 3M

Ácido acético glacial 11,5%v/v