

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação**

**PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA E NÍVEIS DE  
CITOCINAS EM MACRÓFAGOS CANINOS COM  
DIFERENTES GRAUS DE SUSCEPTIBILIDADE À  
INFECÇÃO POR LEISHMANIA INFANTUM**

**ANDRÉIA PEREIRA TURCHETTI**

**Belo Horizonte  
Escola de Veterinária – UFMG  
2014**

Andréia Pereira Turchetti

**PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA E NÍVEIS DE CITOCINAS EM  
MACRÓFAGOS CANINOS COM DIFERENTES GRAUS DE  
SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO POR LEISHMANIA INFANTUM**

Dissertação apresentada a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

**Área de concentração:** Patologia Animal  
**Orientador:** Renato de Lima Santos

Belo Horizonte  
UFMG – Escola de Veterinária  
2014

T932p Turchetti, Andréia Pereira, 1988-  
Perfil de expressão gênica e níveis de citocinas em macrófagos caninos com diferentes graus de susceptibilidade à infecção por *Leishmania infantum* / Andréia Pereira Turchetti. – 2014.  
52 p. : il.

Orientador: Renato de Lima Santos  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.  
Inclui bibliografia

1. Cão – Doenças – Teses. 2. Leishmaniose visceral – Teses. 3. Citocinas – Teses.  
4. *Leishmania infantum* – Teses. I. Santos, Renato de Lima. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.708 96

Dissertação defendida e aprovada em 14 de fevereiro de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:



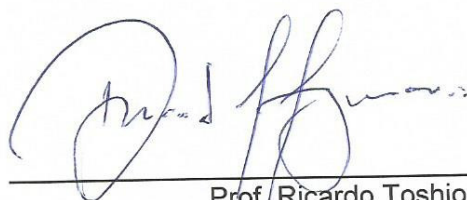
---

Prof. Renato de Lima Santos  
Presidente - Orientador



---

Dr. Olindo Assis Martins Filho  
Centro de Pesquisa René Rachou



---

Prof. Ricardo Toshio Fujiwara  
Escola de Veterinária da UFMG

Dedico este trabalho a todos os cães que possibilitaram sua execução.

“A vida é uma sucessão contínua de oportunidades”  
Gabriel García Marquez

“Seja a mudança que você quer ver no mundo”  
Dalai Lama

“Be the pig, not the chicken”

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para a conclusão de mais essa etapa.

A minha família, em especial, Rogério, Adriana e Débora, pelo apoio incondicional.

Ao Tutu pelo carinho, apoio, paciência e por fazer parte desta e das próximas emocionantes jornadas.

Aos meus tão especiais caninos, Fifi, Anita e Vida por terem feito dessa jornada mais leve.

Ao professor Renato por ter aberto portas e por ser mais do que um orientador, um exemplo de vida.

A professora Tatiane pela ajuda constante no dia a dia.

Aos colegas do laboratório de Patologia Molecular pelo aprendizado, companheirismo e ajuda.

Aos colegas do setor de Patologia, em especial ao Carlos, pela amizade.

Aos professores do Setor de Patologia, em especial ao professor Ernane, pelos ensinamentos.

Ao professor Ricardo Fujiwara por ter aberto seu laboratório de forma tão generosa.

Aos colegas do LIGP pelo companheirismo, em especial ao Daniel, pela ajuda com as leishmanias e a Michele, por garantir que eu me sentisse em casa.

A todos os cães que doaram sangue para a execução deste projeto e a todos que ajudaram nas coletas.

A CãoViver, em especial a Priscila, e a Antonieta, por abrirem suas portas.

A Sandrinha, pela amizade, pelos seus animais, pelo seu tempo e por ter me convidado para um novo e excitante projeto de vida.

A Escola de Veterinária por ser berço da minha formação.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A Deus, por ter me propiciado mais essa grande oportunidade.

---

## SUMÁRIO

---

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Leishmaniose visceral canina	
2.2 Sistema imune e imunidade inata	
2.3 Receptores semelhantes à Toll (TLR)	
2.4 TLR em cães	
2.4.1 TLR na piometra	
2.4.2 TLR nas doenças do trato respiratório superior	
2.4.3 TLR na osteoartrite	
2.4.4 TLR na doença inflamatória intestinal	
2.4.5 TLR na furunculose anal	
2.5 Sistema imune e leishmaniose visceral canina	
2.6 TLR na leishmaniose	
2.7 Receptores semelhantes à NOD (NLR)	
2.8 NLR em cães	
2.9 NLR na leishmaniose	
2.10 <i>Nramp1</i>	
2.11 <i>Nramp1</i> na leishmaniose	
3. OBJETIVOS	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Animais e coleta de sangue para triagem	
4.2 Extração de DNA de papa de leucócitos	
4.3 ELISA rK39	
4.4 PCR de papa de leucócitos	
4.5 Seleção de animais para isolamento e cultivo de macrófagos	
4.6 Isolamento e cultivo de macrófagos caninos	
4.7 Cultivo de <i>Leishmania infantum</i>	
4.8 Infecção <i>in vitro</i> dos macrófagos caninos com <i>Leishmania infantum</i>	
4.9 Determinação de carga parasitária e percentual de sobrevivência intracelular de <i>Leishmania infantum</i> em macrófagos caninos	
4.10 Determinação de diferentes graus de susceptibilidade à leishmaniose visceral canina	
4.11 Extração de RNA	
4.12 Gel de RNA	
4.13 Confecção de cDNA	
4.14 Quantificação de mRNA de genes da imunidade inata através de qPCR	
4.15 Dosagem de citocinas por ELISA	
4.16 Dosagem de NO	
4.17 Análises estatísticas	
5. RESULTADOS	29
5.1 Triagem de animais	
5.2 Isolamento e cultivo de macrófagos caninos	
5.3 Determinação de carga parasitária e percentual de sobrevivência intracelular de <i>Leishmania infantum</i> em macrófagos caninos	

5.4	Determinação de cães resistentes e susceptíveis a leishmaniose visceral	
5.5	Quantificação de mRNA de genes da imunidade inata através de qPCR	
5.6	Dosagem de citocinas por ELISA	
5.7	Dosagem de NO	
5.8	Estudo de correlação entre expressão gênica e sobrevivência intracelular de <i>Leishmania infantum</i>	
6.	DISCUSSÃO	39
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
9.	ANEXOS	48
9.1	Soluções	
9.2	Certificado do CETEA	



---

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1</b> – TLR, ligantes, patógenos associados a estes e localização celular.	16
<b>Tabela 2</b> – Lista de genes e iniciadores que foram utilizados para qPCR.	27
<b>Tabela 3</b> – Resumo dos resultados de triagem dos cães para infecção por <i>Leishmania</i> sp.	29
<b>Tabela 4</b> – Número médio de amastigotas por macrófagos com 24 e 72 horas pós infecção experimental com <i>Leishmania infantum</i> e percentual de sobrevivência individual. Animais selecionados como resistentes ou susceptíveis estão destacados.	30

---

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1** – Freqüência observada para intervalos de classe de 5% de percentual de sobrevivência de *Leishmania infantum* em macrófagos caninos. O percentual de sobrevivência foi obtido dividindo-se a média do número de amastigotas intracelulares com 72 horas pós infecção pela média do número de amastigotas intracelulares com 24 horas pós infecção. 31
- Figura 2** – Imagens representativas de macrófagos de animais resistentes (A e B) e susceptíveis (C e D) com 24 (A e C) e 72 horas (B e D) pós infecção com *Leishmania infantum*. May-Grunwald/Giemsa, 40 x. 31
- Figura 3** – Transcrição de *Nramp1*, NOD1, NOD2, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 e TLR9 em macrófagos caninos derivados de monócitos. Cada coluna representa a média aritmética de dez animais em duplicata com barra de erro padrão. 32
- Figura 4** – Transcrição de genes da imunidade inata em macrófagos de cães resistentes e susceptíveis a infecção por *Leishmania infantum*. (A) *Nramp1*, (B) NOD1, (C) NOD2, (D) TLR1, (E) TLR2, (F) TLR3, (G) TLR4, (H) TLR5, (I) TLR6, (J) TLR7 e (K) TLR9 em macrófagos caninos derivados de monócitos. Os pontos representam a média da duplicata de cada um dos cinco animais analisados. Os traços representam a média aritmética da dispersão dos pontos. 33
- Figura 5** – Dosagem de citocinas por ELISA em sobrenadante de cultivo de macrófagos. Os macrófagos ( $4 \times 10^4$ /poço) de seis animais resistentes ou susceptíveis foram infectados em duplicata com *Leishmania infantum* cepa BH 46 em um MOI de 10:1 e os sobrenadantes coletados com 0, 24 e 72 horas pós infecção. O controle positivo consiste de macrófagos de quatro cães tratados com 1  $\mu$ g/mL de LPS. (A) IL-10, (B) IL-12, (C) TNF- $\alpha$  e (D) IFN- $\gamma$ . Cada coluna representa a média aritmética com erro padrão. Um asterisco (\*) indica que a diferença entre animais resistentes e susceptíveis no mesmo período pós infecção é estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). 35
- Figura 6** – Dosagem indireta de NO através da dosagem de nitrito pelo método de Griess em sobrenadante de cultivo de macrófagos. Os macrófagos ( $4 \times 10^4$ /poço) de seis animais resistentes ou susceptíveis foram infectados em duplicata com *Leishmania infantum* cepa BH 46 em um MOI de 10:1 e os sobrenadantes coletados com 0, 24 e 72 horas pós infecção. O controle positivo consiste de macrófagos de quatro cães tratados com 1  $\mu$ g/mL de LPS. Cada coluna representa a média aritmética com erro padrão. 37
- Figura 7** – Estudo de correlação de Pearson entre expressão gênica de NOD2 e sobrevivência intracelular de *Leishmania infantum* em macrófagos de cães. (A) Correlação feita com dez animais, independente de susceptibilidade a leishmaniose visceral, (B) correlação com cinco animais resistentes e (C) com cinco animais susceptíveis. Valores de r e P indicam correlação negativa entre expressão de NOD2 e sobrevivência intracelular em animais resistentes a leishmaniose. 38

---

LISTA DE ABREVIATURAS

---

cDNA	DNA complementar
CETEA	Comitê de ética em experimentação animal
CT	Ciclo limiar
dATP	Trifosfato de desoxiadenosina
dCTP	Trifosfato de desoxicitidina
DEPC	Dicarbonato de dietila
dGTP	Trifosfato de desoxiguanidina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Trifosfato de desoxiribonucleotídeos
dTTP	Trifosfato de desoxitimidina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de Imunoadsorção Enzimática
g	Gravidade
G	Guanina
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Gly	Glicina
GP	Glicoproteína
GSPL	Glicoesfingofosfolípide
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleucina
Ile	Isoleucina
IRF 5	Fator regulador de interferon 5
PCR	Reação em cadeia da polimerase
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
mA	Miliampere
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidade de infecção
mRNA	RNA mensageiro
ng	Nanograma
NK	Assassinas naturais
NLR	Receptor semelhante à NOD
nm	Nanometro
NO	Óxido nítrico
NOD	Domínio de ligação ao nucleotídeo
<i>Nramp1</i>	Proteína natural de resistência associada ao macrófago
OPD	Dicloridrato de o-fenilenodiamina
Poly I:C	Ácido poliniséico-policilidílico
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
PAMP	Padrões moleculares associados à patógenos
RNA	Ácido ribonucléico
Slc11a1	Família 11 transportadora de soluto membro a1
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SODB1	Superóxido dismutase B1
T	Timina
TGF- $\beta$	Fator de crescimento tumoral $\beta$
Th1	Linfócito auxiliar T tipo 1
Th2	Linfócito auxiliar T tipo 2
Thr	Treonina
TIRAP/Mai	Proteína adaptadora contendo o domínio TIR
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TLR	Receptor semelhante à Toll
U	Unidade
V	Volts
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ M	Micromolar

---

## RESUMO

A leishmaniose visceral é uma importante zoonose causada pelo protozoário *Leishmania infantum* (sinonímia *L. chagasi*), transmitida por flebotomíneos e que tem nos cães domésticos seu mais frequente hospedeiro vertebrado. Apesar de vários estudos da resposta imune do homem e de animais de laboratório frente à leishmaniose, muito pouco se sabe sobre a resposta dos cães à doença. Os cães podem desenvolver doença clínica e vir a óbito ou permanecerem como portadores assintomáticos. As razões para essa diferença de susceptibilidade não são conhecidas. Com o intuito de investigar se o sistema imune inato está associado com essa diferença, verificou-se o perfil de expressão basal de importantes genes da imunidade inata (Nrp1, NOD1, NOD2, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 e TLR9) em macrófagos caninos derivados de monócitos de sangue periférico de cães negativos para leishmaniose e citocinas (IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), além de óxido nítrico no sobrenadante do cultivo de macrófagos resistentes ou susceptíveis a infecção *in vitro* por *L. infantum*. A expressão constitutiva de NOD2 e TLR9 é extremamente reduzida, a de NOD1, TLR1 e TLR7 é baixa, e a de Nrp1 e TLR2 a 6 é mais elevada em macrófagos caninos derivados de monócitos. Não houve diferença significativa de expressão basal dos diferentes genes entre cães resistentes e susceptíveis a leishmaniose visceral. A expressão de TNF- $\alpha$  foi mais elevada com 24 horas nos animais resistentes quando comparados aos susceptíveis, assim como a expressão de IFN- $\gamma$  com 72 horas de infecção. A expressão de IL-10 foi menor com 24 horas nos animais resistentes. Não houve diferença de expressão de IL-12 entre resistentes e susceptíveis. Não houve produção de óxido nítrico detectável nos animais resistentes e susceptíveis. Estudo de correlação de Pearson identificou uma correlação negativa somente entre expressão gênica de NOD2 e sobrevivência intracelular de *L. infantum* nos cães resistentes a leishmaniose visceral. Este estudo contribuiu para melhor entender a imunidade inata do cão, em especial frente à infecção pela *L. infantum*.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*, macrófagos, cães, genes imunidade inata, citocinas

## ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is an important zoonosis caused by *Leishmania infantum* infection, which is transmitted by sand flies and has the domestic dogs as its main definitive host. Although there are several studies about the immune response of humans and laboratory animals to leishmaniasis, very little is known about the immune response of dogs to the disease. Dogs can either develop clinical signs and eventually died or remain as asymptomatic carriers. The reasons for this difference in susceptibility are still unknown. In order to investigate whether the innate immune system is associated with this difference, we profiled the basal expression of important genes in innate immunity (Nramp1, NOD1, NOD2, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 and TLR9) in canine monocyte-derived macrophages from animals negative to leishmaniasis, and cytokines (IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ ) and nitric oxide in the culture supernatant of macrophages resistant or susceptible to *in vitro* infection by *L. infantum*. Constitutive expression of TLR9 and NOD2 are negligible, NOD1, LR1 and TLR7 are low and Nramp1 and TLR2 to 6 are higher in canine monocyte-derived macrophages. There was no significant difference in expression of different genes between animals resistant or susceptible to canine visceral leishmaniasis. The secretion of TNF- $\alpha$  was higher in resistant animals 24 hours after infection when compared to susceptible animals, as well as the secretion of IFN- $\gamma$  at 72 hours post infection. The secretion of IL-10 was lower in resistant animals 24 hours after infection. There was no difference in secretion of IL-12 between resistant and susceptible dogs. There was no detectable production of nitric oxide in resistant or susceptible animals. Pearson's correlation study identified only a negative correlation between NOD2 gene expression and intracellular survival of *L. infantum* in animals resistant to visceral leishmaniasis. This study contributed to better understand the innate immune system of dogs, specially its response to the infection by *L. infantum*.

Key words: *Leishmania infantum*, macrophages, dogs, innate immunity genes, cytokines.

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma importante zoonose causada, no Brasil, por protozoários da espécie *Leishmania infantum* (sinonímia *L. chagasi*). A doença é transmitida pela picada do mosquito palha, *Lutzomia longipalpis*, e tem os cães domésticos como hospedeiros de maior prevalência. Nos cães, a leishmaniose visceral apresenta inúmeras formas clínicas, que vão desde infecções assintomáticas à doença crônica, sistêmica, debilitante que leva ao óbito. A evolução da doença está associada à resposta imunológica dos animais infectados. Em cães susceptíveis, a resposta Th2, caracterizada por redução da atividade macrofágica, é predominante, o que faz com que a multiplicação da *Leishmania* spp. não seja controlada. Embora a resposta imune adaptativa influencie o desenvolvimento da doença, a identificação de componentes da imunidade inata que contribuam para resistência ou susceptibilidade natural do cão a leishmaniose visceral é uma importante linha de pesquisa para a identificação de cães resistentes à doença. Devido à importância para saúde pública da leishmaniose visceral, esta identificação pode ter um impacto significativo no controle da doença. Alguns genes da imunidade inata já tiveram seu papel investigado na leishmaniose visceral canina, como o Nramp1 e o MHC (complexo principal de histocompatibilidade). Outros genes, como o do grupo dos TLR (receptores semelhantes à Toll), muito importante em várias doenças, foram investigados na leishmaniose, principalmente cutânea, humana e em modelos animais, mas nunca nos hospedeiros definitivos. Já a família dos NLR (receptores semelhantes à NOD) nunca foi investigada na leishmaniose. Como os TLR e NLR já se mostraram importantes no desenvolvimento de outras doenças em cães, o objetivo deste trabalho foi investigar o papel destes genes, em associação a produção de citocinas como IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , além do NO na resistência ou susceptibilidade a leishmaniose visceral canina. Os resultados visam contribuir para melhor entendimento da resposta imune inata do cão frente à infecção e, conseqüentemente, melhor entendimento da

doença com objetivo futuro de favorecer o controle da doença canina e humana.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Leishmaniose visceral canina

Leishmaniose é uma importante zoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania*, da ordem *Kinetoplastidae*, família *Trypanosomatidae* (Grimaldi e Tesh, 1993). As espécies de *Leishmania* do complexo donovani estão associadas com a forma visceral da doença, incluindo *L. infantum* (sinonímia *L. chagasi*), principal espécie presente no Brasil (Mauricio et al., 1999).

A leishmaniose visceral tem ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais com transmissão endêmica em 98 países e incidência de 58.000 casos por ano. Na América Latina, a doença já foi descrita em mais 10 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil (Alvar et al., 2012). Em 2006, a transmissão da doença para o homem estava presente em todas as regiões do País, sendo a região Nordeste a mais afetada (Tomaz-Soccol et al., 2009, Harhay et al., 2011). Originalmente, a doença era restrita à área rural, mas vem se expandindo com grande velocidade nos centros urbanos, possivelmente devido a migrações e expansão das cidades (Diniz et al., 2008, Harhay et al., 2011). Atualmente, a doença é considerada um grande problema de saúde pública, considerando sua incidência elevada e potencial letalidade, principalmente, em pacientes não tratados, crianças e imunodeficientes.

O ciclo de vida da *Leishmania* spp. inicia-se quando um mamífero infectado com a forma amastigota do parasita no interior de macrófagos é picado pelo flebotômíneo hematófago e transmite as formas amastigotas ao invertebrado. No inseto, o protozoário multiplica-se e amadurece para a forma infectante, promastigota metacíclico, que será transmitida a outro mamífero que venha a ser picado pela fêmea do vetor. Para que a infecção se estabeleça no novo hospedeiro, a *Leishmania* spp., parasita intracelular obrigatório, tem que internalizar nos macrófagos e resistir à destruição (Grimaldi e Tesh, 1993).

No Brasil, o principal vetor da leishmaniose é o flebotômíneo, *Lutzomia longipalpis*, e os hospedeiros vertebrados são principalmente os cães domésticos (*Canis familiaris*). Embora vários mamíferos sejam reservatórios de *Leishmania* spp. (Souza et al., 2014), os cães são considerados os reservatórios mais importantes e desempenham papel epidemiológico fundamental em áreas urbanas por oferecer maior risco de transmissão ao homem devido à proximidade entre as espécies (Diniz et al., 2008).

A leishmaniose visceral em cães apresenta formas clínicas variáveis, desde infecções assintomáticas à doença crônica sistêmica, caracterizada por emagrecimento progressivo, linfadenomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia, dermatopatias e nefropatias que podem levar o animal a óbito (Saridomichelakis, 2009). Cães infectados com o protozoário podem ser susceptíveis ou resistentes ao desenvolvimento da doença, o que é definido pela resposta do sistema imune ao protozoário.

### 2.2. Sistema imune e imunidade inata

O termo imunidade historicamente significa proteção contra doenças, em especial, as infecciosas. O sistema imunológico é formado por um conjunto de células e moléculas que atuam de forma coletiva e coordenada em resposta à introdução de substâncias estranhas no organismo (Abbas et al., 2008).

O sistema imune é responsável pela proteção do organismo contra patógenos ou contra moléculas estranhas. Ele é dividido em sistema imune inato (ou natural) e adaptativo (ou adquirido). Enquanto o sistema imune inato proporciona uma resposta imediata contra patógenos, a resposta tardia é mediada pela imunidade adquirida, que é específica, após a aquisição de memória imunológica.

A imunidade inata é uma linha de defesa inicial, que consiste de mecanismos celulares e bioquímicos que estão programados a responder rapidamente e de

uma mesma maneira a estruturas que são comuns a grupos de microrganismos semelhantes. Fazem parte da resposta imune inata as barreiras físicas e químicas, como a pele; as células fagocitárias, como neutrófilos e macrófagos, e células natural killer; as proteínas do sangue, incluindo frações do sistema complemento; e as citocinas. Os mecanismos da imunidade inata são específicos para estruturas comuns a grupos de microrganismos. Duas famílias de receptores que reconhecem esses padrões moleculares associados a patógenos são os receptores semelhantes a Toll e semelhantes a NOD (Abbas *et al.*, 2008).

### 2.3. Receptores semelhantes à Toll (TLR)

Receptores semelhantes à Toll, como do inglês *Toll-like receptors* (TLR), são proteínas que fazem parte do sistema imune inato. Os TLR são parte de uma família de receptores (proteínas transmembrânicas de tipo I) conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões, ou PRR (do inglês, *pattern recognition receptor*). São receptores responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos, também conhecidos como PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*) ou MAMP (*microbe-associated molecular patterns*) e ativação de células do sistema imune. Os PAMP são

expressos por um amplo espectro de agentes infecciosos e são considerados ligantes dos TLR (Lee *et al.*, 2012).

Os TLR receberam esse nome devido a similaridade com a proteína codificada pelo gene Toll. Em 1985, Christiane Nusslein-Volhard, ao fazer uma mutação em um gene, posteriormente denominado Toll, fez com que a mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*) ficasse com uma aparência estranha, na qual a porção ventral do corpo estava subdesenvolvida. Surpresa, a pesquisadora, que posteriormente recebeu um prêmio Nobel por seus trabalhos na área, exclamou em alemão *Das war ja toll*, o que significa “isso é ótimo” (Hansson e Edfeldt, 2005). O primeiro relato de TLRs em humanos foi feito por Medzhitov *et al.* (1997).

Os TLR ativam a via de NF- $\kappa$ B, que regula a expressão de citocinas, através de várias moléculas incluindo o MyD88 e TIRAP/Mai (Athman e Philpott, 2004). A ativação da via do NF- $\kappa$ B conduz ao início da resposta adaptativa imune pela produção de citocinas inflamatórias tais como a IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-12, e a indução de moléculas de co-estimulação, tais como a CD80, CD86 e CD40 (Lee *et al.*, 2012).

A Tabela 1 detalha os ligantes de cada TLR e a localização deste na célula.

Tabela 1: TLR, ligantes, patógenos associados a estes e localização celular.

TLR	Ligantes	Patógenos	Localização
<b>TLR1</b>	Lipopeptídeos	Bactérias	Membrana plasmática
<b>TLR2</b>	Lipopeptídeos, lipoproteínas e glicolípides	Bactérias	Membrana plasmática
	Zymosan	Fungos	
	Ácido lipoteicóico	Bactérias Gram positivo	
<b>TLR3</b>	RNA cadeia dupla, poly I:C	Vírus	Endossomo
<b>TLR4</b>	Lipopolissacarídeos (LPS)	Bactérias Gram negativo	Membrana plasmática
<b>TLR5</b>	Flagelina	Bactérias	Membrana plasmática
<b>TLR6</b>	Lipopeptídeos	Mycoplasma	Membrana plasmática
<b>TLR7</b>	Imidazoquinolina e RNA fita simples	Pequenos compostos sintéticos	Endossomo
<b>TLR8</b>	Pequenos compostos sintéticos e RNA fita simples	Vírus	Endossomo
<b>TLR9</b>	CpG DNA não metilado	Bactérias	Endossomo
<b>TLR10</b>	Desconhecido	Desconhecido	Membrana plasmática



## 2.4. TLR em cães

Enquanto em humanos e em animais de laboratórios, como camundongos, a importância dos TLR na patogênese e terapêutica de inúmeras doenças já é explorada há anos, os estudos em cães são mais recentes e extremamente limitados (Cristofaro e Opal, 2006, Turin e Riva, 2008). Em humanos, inúmeras doenças infecciosas, metabólicas e autoimunes, como leishmaniose, diabetes e lúpus eritematoso, são relacionadas com diferentes níveis de expressão e polimorfismos de TLR.

Os primeiros estudos de TLR em cães tratavam somente da caracterização, clonagem e expressão dos receptores em tecidos caninos saudáveis (Hashimoto *et al.*, 2005; Swerdlow *et al.*, 2006; Okui *et al.*, 2008; Astakhova *et al.*, 2009). Huber *et al.* (2011) caracterizou anticorpos anti-TLR4, 5 e 9 para auxiliar estudos futuros destas proteínas via ELISA, Western blotting e imunohistoquímica. Burgener e Jungi (2008) demonstraram a possibilidade de uso de anticorpos anti-TLR humanos e murinos para tecidos caninos, o que facilita investigações futuras. Atualmente em cães, a importância dos TLR já foi demonstrada na furunculose anal, na doença inflamatória do intestino, na piometra, na aspergilose nasal, na rinite linfo-plasmocítica e na osteoartrite (Muir *et al.*, 2007; Burgener *et al.*, 2008; House *et al.*, 2008; House *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2010; Kuroki *et al.*, 2010; Allenspach *et al.*, 2010; Kathrani *et al.*, 2010; McMahon *et al.*, 2010; Chotimanukul e Sirivaidyapong, 2011; Mercier *et al.*, 2012). O estudo de TLR em cães tem o potencial de esclarecer a patogenia de diversas doenças que os acometem.

### 2.4.1. TLR na piometra

Procurando entender melhor a patofisiologia da piometra, a principal afecção reprodutiva infecciosa nas cadelas, Chotimanukul e Sirivaidyapong (2011) estudaram a expressão de TLR4 no endométrio de cadelas saudáveis em diferentes fases do ciclo estral e também em animais com piometra. A hipótese era de que mecanismos imunes haviam evoluído de forma a proteger o trato reprodutivo contra patógenos. Vale ressaltar que o TLR4 tem como ligante o

lipopolissacarídeo (LPS), endotoxina de bactérias Gram-negativo, incluindo as principais bactérias que invadem o útero causando piometra, como da *Escherichia coli*. Foi encontrada uma expressão de TLR4 maior no estroma endometrial do que no epitélio endometrial e glandular durante o proestro. Durante o diestro, tanto o estroma quanto o epitélio glandular expressavam mais TLR4 do que a superfície do endométrio. Quando observada a expressão de TLR4 no epitélio glandular, no diestro esta foi maior do que todas as outras fases do ciclo. Os animais com piometra tinham uma expressão de TLR4 no epitélio de superfície extremamente aumentada, o que demonstra uma resposta do sistema imune inato a infecções endometriais. Os autores sugerem que os diferentes níveis de expressão de TLR4 no endométrio nas diferentes fases do ciclo estão relacionados com mudanças fisiológicas nos tipos celulares do endométrio, na população de leucócitos, nas citocinas e nos hormônios sexuais. Estudo semelhante com TLR2 demonstrou que, em cadelas com piometra, o epitélio glandular expressa mais TLR2 que o epitélio de superfície. A expressão de TLR2 no epitélio glandular foi significativamente maior em cadelas no estro, diestro e com piometra quanto comparado com cadelas em anestro (Chotimanukul e Sirivaidyapong, 2012).

Ainda estudando o complexo hiperplasia endometrial cística-piometra, Silva *et al.* (2010), dentre outros parâmetros, avaliaram a transcrição de genes que codificam TLR2 e TLR4 em úteros na fase de diestro, na presença ou na ausência de piometra por *E. coli*. Os resultados mostram que piometra induzida por *E. coli* é capaz de induzir um aumento na expressão de TLR2 e TLR4 no endométrio canino em diestro. A ativação dos TLR, provavelmente por LPS e lipoproteínas constituintes da *E. coli*, levou a um aumento na expressão de genes de síntese de prostaglandinas, que regulam a resposta inflamatória local.

### 2.4.2. TLR nas doenças do trato respiratório superior

Mercier *et al.* (2012), estudaram a aspergilose sino-nasal e a rinite linfo-

plasmocítica canina, doenças que tem a patogênese pouco compreendida. Sabendo que o sistema imune inato está relacionado com a etiologia da rinosinusite crônica humana, os autores indagaram se uma disfunção no sistema imune inato dos cães não poderia causar a aspergilose e a rinite. Mercier *et al.* (2012) avaliaram a expressão dos TLR1 ao 10 na mucosa nasal de animais sadios e doentes. Em cães com aspergilose, a expressão de TLR 1 a 4 e 6 ao 10 estava aumentada. Já em casos de rinite, houve uma superexpressão de TLR 1, 2, 6, 7 e 8. Os autores levantam a hipótese de um desequilíbrio na expressão de TLR levar ao desenvolvimento de doenças no trato respiratório superior, assim como ocorre em humanos.

#### 2.4.3. TLR na osteoartrite

Dois trabalhos estudaram a importância de TLR na osteoartrite canina (Muir *et al.*, 2007 e Kuroki *et al.*, 2010). Muir *et al.* (2007) não detectaram diferenças significativas de TLR2 e 9 no líquido sinovial de animais com osteoartrite em comparação com animais saudáveis. Kuroki *et al.* (2010) estudaram a expressão de TLR2 e 4 em tecidos sinoviais de cães saudáveis, naturalmente e experimentalmente acometidos pela osteoartrite. Enquanto a expressão de TLR2 não se alterou entre os grupos, a de TLR4 foi maior nos tecidos do grupo na qual a osteoartrite foi induzida pela transecção do ligamento cruzado cranial. Inclusive, somente neste grupo a proteína TLR4 foi detectada, o que sugere que a ativação do sistema imune inato desempenha um importante papel na patofisiologia de, pelo menos, alguns casos de osteoartrite canina.

#### 2.4.4. TLR na doença inflamatória intestinal

As enteropatias, em especial a doença inflamatória intestinal, principalmente em cães da raça Pastor Alemão, mais susceptível, são as patologias mais estudadas em medicina veterinária quanto ao papel de TLR em suas patogêneses (Burgener *et al.*, 2008; Allenspach *et al.*, 2010; Kathrani *et al.*, 2010; McMahan *et al.*, 2010).

Acredita-se que a doença inflamatória intestinal (IBD, do inglês “*inflammatory*

*bowel disease*”) resulte de uma interação desregulada entre o sistema imune do organismo e sua microflora comensal. Burgener *et al.* (2008) avaliaram a expressão de TLR2, 4 e 9, receptores que interagem com PAMP bacterianos, em biópsias de duodeno e cólon de animais com IBD, antes e após terapia com esteróides e também de animais saudáveis. Houve um aumento na expressão destes três TLR em tecidos de animais com IBD quando comparado com tecidos saudáveis, que não se reduziu após tratamento. Os autores discutem que a superexpressão de receptores responsivos a bactérias pode levar a um aumento na inflamação local pela interação com a flora comensal. A ausência de redução de expressão dos TLR após o tratamento pode ser justificada por uma predisposição genética a doença, assim como já foi descrito em humanos.

Ainda no estudo da IBD, Allenspach *et al.* (2010) avaliaram a expressão de TLR2, 4, 5 e 9 também em biópsias de intestino (duodeno, íleo e cólon). A expressão de TLR4 estava aumentada em todos os segmentos do intestino avaliados dos animais com IBD. Entretanto, a expressão de TLR5 estava muito baixa se comparada com a de animais saudáveis. Os autores relacionaram esses achados com diferentes floras comensais entre os grupos, em especial com um importante aumento de lactobacilos específicos em cães com IBD.

Mantendo essa linha de pesquisa, Kathrani *et al.* (2010) investigaram a presença de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP, do inglês “*single-nucleotide polymorphisms*”) de TLR2, 4 e 5, como já havia sido relatado em humanos com IBD. Foram identificados quatro SNP no gene TLR4 (T23C, G1039A, A1571T e G1807A) e três SNP no TLR5 (G22A, C100T e T1844C). O sequenciamento do DNA dessas regiões foram comparados entre 55 cães da raça Pastor Alemão com IBD e 61 da mesma raça saudáveis e demonstraram possíveis papéis de SNP na patogênese da IBD. O SNP G22A no TLR5 foi significativamente associado com IBD, enquanto os outros dois SNP no TLR5 foram considerados protetores para IBD. Os SNP A1571T e G1807A no TLR4 também foram

considerados associados com IBD, desde que na presença do SNP G22A.

McMahon *et al.* (2010) observaram que cães com IBD expressam mais TLR2 no duodeno que animais saudáveis. Além disso, a expressão de TLR2 foi correlacionada com a severidade clínica da doença, mas não com achados histopatológicos.

#### 2.4.5. TLR na furunculose anal

A furunculose anal é uma doença imuno-mediada que ocorre primariamente em cães da raça Pastor Alemão, que cursa com inflamação e ulceração de tecidos perianais com formação de fístulas. House *et al.* (2008) investigaram a resposta de TLR1, 2, 4, 6 e 9 de macrófagos derivados de sangue periférico de cães saudáveis e com furunculose anal a seus ligantes. Não foi observada diferença significativa entre os grupos.

House *et al.* (2009), com o intuito de investigar se TLR (1, 2, 4, 5, 6 e 9) estão relacionados com a susceptibilidade de cães da raça Pastor Alemão a furunculose anal, descobriram haver variação alélica para AHT H91 (associado a TLR5) e REN216 NO5 (associados a TLR1 e 6) de cães Pastor para outras raças. Esse achado provavelmente resulta de seleção artificial na raça e pode influenciar a resposta imune inata dos animais. Neste estudo, não foram observadas associações entre polimorfismos de TLR e a furunculose anal.

#### 2.5. Sistema imune e leishmaniose visceral canina

A evolução da leishmaniose visceral canina em animais infectados tem sido associada à resposta imunológica mediada por linfócitos T auxiliares. Em cães susceptíveis, a resposta Th2 é predominante, caracterizada por redução da atividade macrófágica, crítica para o controle da *Leishmania* spp. e produção abundante de anticorpos que além de ser não protetora, é lesiva (Reis *et al.*, 2009).

A resistência natural a leishmaniose visceral também tem sido investigada em cães. Predisposições ligadas a sexo e idade ou raça não foram ainda claramente

estabelecidas apesar de diversos estudos epidemiológicos (Palatnik-de-Sousa e Day, 2011). Genes ligados à imunidade como *Slc11a1* (família 11 transportadora de soluto membro a1), também conhecido como *Nramp1* (do inglês: *natural resistance-associated macrophage protein 1*) (Altet *et al.*, 2002; Sanchez-Robert *et al.*; 2008; Bueno *et al.*, 2009) e o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (Quinnell *et al.*, 2003) tem sido analisados. Verificou-se, por exemplo, que o polimorfismo do gene MHC II pode influenciar na susceptibilidade a leishmaniose visceral canina (Quinnell *et al.*, 2003). Mesmo em humanos e camundongos, a causa da diferença de susceptibilidade à doença não foi claramente elucidada, mas indica um importante papel dos TLR.

#### 2.6. TLR na leishmaniose

Vários trabalhos investigam o papel dos TLR na leishmaniose no homem ou em animais de laboratório, sendo que a maioria indica o papel destes receptores e suas moléculas adaptadoras no controle da leishmaniose cutânea. Safaiyan e colaboradores, estudando infecção por *L. major* em humanos, observaram que a ausência de cura espontânea está associada à menor habilidade de neutrófilos secretarem TNF- $\alpha$  e correlacionada com altos níveis de expressão de TLR2, 4 e 9 (Safaiyan *et al.*, 2011). *L. major* ativa o sistema imune inato via TLR2 através do reconhecimento dos seus lipofosfoglicanos (LPG) (Becker *et al.*, 2003; de Veer *et al.*, 2003; Kavoosi *et al.*, 2009). Além disso, estudos indicam que TLR2 é importante no controle da infecção por *L. (Viannia) panamensis* (Jayakumar *et al.*, 2011) ou *L. amazonensis* (Guerra *et al.*, 2010) em camundongos. O TLR4 também contribui para controle eficiente da infecção por *L. major* em camundongos, visto que animais que não expressam TLR4 funcional possuem cargas parasitárias maiores quando comparados com os controles (Kropf *et al.*, 2004). Interessantemente, Ajdary *et al.* (2011) demonstraram que alguns polimorfismos do TLR4 (Asp299Gly e Thr399Ile) são mais frequentes em humanos com leishmaniose cutânea crônica causada por *L. major* do que em pacientes saudáveis ou em fase aguda da doença sugerindo

associação destes polimorfismos com predisposição e intensidade da doença. Liese *et al.* (2007) indicam ainda a participação do TLR9 durante infecção por *L. major*. TLR9 é necessário para o controle da carga parasitária e da intensidade de lesões em camundongos infectados. Adicionalmente, a indução de IL-12 por *L. major* ou seu DNA em células dendríticas derivadas de medula óssea e para a citotoxicidade de células NK é dependente de TLR9.

Muraille *et al.* (2003) demonstraram a importância da via de sinalização do MyD88, molécula adaptadora das vias de sinalização dos TLR, exceto TLR3 nas lesões causadas por *L. major* em camundongos. Camundongos MyD88<sup>-/-</sup> da linhagem C57BL/6, que normalmente possuem uma resposta predominantemente Th1 e que apresentam cura espontânea das úlceras causadas por *L. major*, tiveram maior número de lesões que animais controles e número semelhante de lesões quando comparados à camundongos BALB/c, que apresentam resposta predominantemente Th2 frente a infecção por *L. major*. Os camundongos MyD88<sup>-/-</sup> apresentaram níveis de IL-4 aumentados e IFN- $\gamma$  e IL-12 diminuídos.

Existem poucos estudos investigando o papel dos TLR na leishmaniose visceral. *L. donovani* é capaz de ativar uma resposta Th1 pela ativação de TLR (Srivastava *et al.*, 2012). TLR3 e TLR4 são necessários para o reconhecimento de *L. donovani* por macrófagos ativados (Flandin *et al.*, 2006) e a infecção por *L. donovani* diminui a produção de IL-12 estimulada por TLR2, mas ativa a produção de IL-10 em macrófagos (Chandra e Naik, 2008). Adicionalmente, Cezário *et al.* (2011) sugerem que a infecção por *L. chagasi* em camundongos é modulada pela expressão de TLR2 e 4 e citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-17, TNF- $\alpha$  e fator de crescimento tumoral beta (TGF- $\beta$ ) influenciando na carga parasitária ao longo da infecção. Ativação de células NK na leishmaniose murina causada por *L. chagasi* necessita de TLR9 e IL-12 (Schleicher *et al.*, 2007). A ativação de IRF-5, fator de transcrição relacionado com a produção de citocinas mediado por TLR7, é essencial para o desenvolvimento de

resposta Th1 na infecção crônica por *L. donovani* em camundongos (Paun *et al.*, 2011).

Estudos têm também demonstrado o papel dos TLR durante infecção por *L. donovani* em camundongos. Karmakar *et al.* (2012) sugeriram que TLR4 atua como um receptor de glicoesfingofosfolípide de *L. donovani* (GSPL), ligante de células NKT, gerando uma resposta inflamatória necessária para destruir o parasito. Tratamento com GSPL induziu resposta efetiva de células T, capaz de controlar a infecção parasitária. A eficácia da glicoproteína GP29 de *L. donovani* em eliminar o parasito de macrófagos *in vitro* e *in vivo* foi associada com a indução de IL-12 mediada por TLR4 e pela inibição de IL-10 mediada por TLR2 (Paul *et al.*, 2012). Uma proteína recombinante de *L. donovani* (rSODB1) induz resposta protetora em camundongos, mas somente quando administrada conjuntamente com ligantes de TLR4 (Daifalla *et al.*, 2012). Enquanto em humanos e camundongos, a importância dos TLR na patogênese (e suas aplicações) da leishmaniose é estudada há mais de uma década, ainda não existiam estudos do seu papel em cães.

## 2.7. Receptores semelhantes à NOD (NLR)

Estudos mais recentes identificaram os receptores semelhantes à NOD (NLR) como uma família adicional de receptores da resposta imune inata que reconhecem PAMP no citoplasma, sugerindo que quando microorganismos escapam da vigilância extracelular, existe outra linha de reconhecimento no citosol das células do hospedeiro (Kanneganti *et al.*, 2007). Dentre os mais de 20 genes que codificam proteínas do tipo NLR estão o NOD1 e o NOD2, que reconhecem peptídeoglicanos da parede celular bacteriana. Os NLR, assim como os TLR, ativam a via de NF- $\kappa$ B, que regula a expressão de citocinas (Abbas *et al.*, 2008).

## 2.8. NLR em cães

No estudo de Mercier *et al.* (2012) sobre aspergilose sino-nasal e rinite linfoplasmocítica canina, os autores também avaliaram a expressão de NOD1 e NOD2 na

mucosa nasal de animais sadios e doentes. Em cães com aspergilose, a expressão de NOD2 estava aumentada quando comparada com sadios.

#### 2.9. NLR na leishmaniose

Não existem estudos do papel dos NLR na leishmaniose, seja visceral ou cutânea, em diferentes espécies.

#### 2.10. *Nramp1*

Outro importante gene da imunidade inata, o *Nramp1*, codifica a “proteína natural de resistência associada ao macrófago”, proteína transportadora de cátions bivalentes (como o ferro) que regula a ativação de macrófagos frente a doenças infecciosas e auto-imunes e a sobrevivência de patógenos intracelulares. O *Nramp1* foi inicialmente identificado em camundongos e relacionado à resistência natural contra *Leishmania* (Bradley *et al.*, 1977), *Salmonella* (Lissner *et al.*, 1983) e *Mycobacterium* (Gros *et al.*, 1981).

#### 2.11. *Nramp1* na leishmaniose

Vidal e colaboradores verificaram que camundongos *knockout* para o gene *Nramp1* perdem a resistência a infecção por *Leishmania donovani*, pois seus macrófagos permitem a multiplicação intracelular (Vidal *et al.*, 1995). Duas mutações importantes no gene *Nramp1* foram encontradas em dois cães susceptíveis a leishmaniose quando comparados a dois animais resistentes, uma região rica em guanina no promotor e uma deleção completa do exon 11 (Altet *et al.*, 2002). Entretanto, Bueno e colaboradores verificaram que a sequência do *Nramp1* era idêntica quando comparados dois cães resistentes e dois susceptíveis (Bueno *et al.*, 2009). Neste mesmo trabalho foi verificado que não houve diferença estatística entre expressão gênica de *Nramp1* entre resistentes e susceptíveis, apesar de uma tendência de maior expressão de mRNA em animais assintomáticos. Outro estudo achou uma associação positiva entre SNP na região promotora do gene *Nramp1* e a leishmaniose canina (Sanchez-Robert *et al.*, 2008). Portanto, a associação do *Nramp1* com resistência natural contra a *Leishmania* sp. em cães ainda não é bem definida.

### 3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto é identificar componentes da imunidade inata que contribuam para a resistência natural do cão à leishmaniose visceral. O objetivo geral será atingido pelos seguintes objetivos específicos:

- i) Identificar cães susceptíveis e resistentes à leishmaniose visceral através de determinação da carga parasitária e sobrevivência intracelular de *L. infantum* em macrófagos derivados de monócitos caninos infectados *in vitro*.
- ii) Verificar a associação entre susceptibilidade ou resistência de macrófagos caninos à infecção por *L. infantum* e níveis de transcrição gênica de *Nramp1*, NOD 1 e 2, TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9.
- iii) Verificar a associação entre susceptibilidade ou resistência de macrófagos caninos à infecção por *L. infantum* e níveis de produção de citocinas IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e NO.
- iv) Verificar se existe correlação entre sobrevivência intracelular de *L. infantum* e expressão gênica de *Nramp1*, NOD1 e 2, TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos das soluções utilizadas nesta seção encontram-se em anexo (Anexo 1).

##### 4.1. Animais e coleta de sangue para triagem

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, com o protocolo CETEA/UFMG 140/2009 (Anexo 2). Amostras de sangue de cães, sem raça definida, de ambos os sexos, com idade variando de um a oito anos, residentes na região da grande Belo Horizonte, foram coletadas através de punção da veia cefálica após assepsia local em tubos de coleta a vácuo contendo ativador de coagulação (partículas de sílica micronizadas) ou anticoagulante EDTA. Os tubos foram centrifugados para separação de papa de leucócitos e soro.

##### 4.2. Extração de DNA de papa de leucócitos

Os tubos contendo EDTA foram centrifugados a 1.000 g por 15 minutos a 20°C. A papa de leucócitos foi retirada e transferida para tubo de 1,5 mL livre de RNase, que foi novamente centrifugado a 1.000 g por 15 minutos de forma a desprezar o plasma restante. As amostras foram suspensas em 100 µL de tampão TE pH 8. A extração de DNA foi realizada pelo método da guanidina segundo Pitcher *et al.* (1989). Resumidamente, 500 µL de solução de extração a base de guanidina, EDTA e sarcosyl foram adicionados, os tubos foram invertidos lentamente e incubados a temperatura ambiente por 10 minutos e imediatamente resfriados em gelo por 5 minutos. Foram adicionados, sem misturar, 250 µL de acetato de amônio 7 M a -20°C. As amostras foram incubadas em gelo por 10 minutos e posteriormente 500 µL de clorofórmio-2-pentanol a -20°C foram adicionados e as amostras agitadas vigorosamente até formação de uma cor branca homogênea. As amostras foram centrifugadas a 18.000 g por 10 minutos. Aproximadamente 750 µL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo de 1,5 mL, tomando cuidado para não pegar a interfase. Em seguida, 405 µL de isopropanol a -20°C foram adicionados, os

tubos invertidos por 1 minuto e novamente centrifugados a 18.000 g por 5 minutos para precipitar o DNA. O sobrenadante foi descartado e pellet lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70% a temperatura ambiente através de centrifugação a 18.000 g por 5 minutos. O precipitado final foi suspenso em aproximadamente 25 µL de água Milli-Q e as amostras aquecidas a 50°C por 10 minutos antes de serem submetidas à dosagem de DNA em espectrofotômetro. As amostras de DNA foram congeladas a -20°C até realização de PCR.

##### 4.3. ELISA rK39

A ausência de infecção por *Leishmania* spp. nos cães foi avaliada por exame sorológico por ELISA com antígeno rK39. Brevemente, placas de 96 poços de fundo reto foram sensibilizadas com 100 µL de antígeno K39 recombinante a 5 µg/mL em tampão carbonato. As placas foram incubadas a 4°C por no mínimo 12 horas antes de serem lavadas quatro vezes com solução de lavagem. As placas foram então incubadas com 150 µL de solução de bloqueio por 90 minutos a temperatura ambiente para minimizar reações inespecíficas. A solução de bloqueio foi descartada e substituída por 100 µL de amostras (soros diluídos 1:80 em solução de lavagem), controles positivos (soro de animais de região endêmica, clinicamente e laboratorialmente positivos para leishmaniose diluídos 1:80), controles negativos (soro de animais saudáveis de região não endêmica diluídos 1:80) e brancos (solução de lavagem) em duplicata, que foram incubados por pelo menos 12 horas a 4°C. As placas foram novamente lavadas quatro vezes com solução de lavagem e incubadas com 100 µL de anticorpo secundário IgG anti-cão diluído 1:5000 em solução de lavagem a 37°C por 40 minutos sob abrigo de luz. As placas foram mais uma vez lavadas quatro vezes com solução de lavagem e incubadas por 10 minutos sob abrigo de luz com 100 µL de solução de revelação. Após os 10 minutos foram acrescentados 40 µL de ácido sulfúrico 4N para parar a reação. As placas tiveram absorbância medida em leitor de ELISA a 490 nm. Amostras foram consideradas negativas quando absorbância foi menor que o *cut off*, média da

absorbância dos controles negativos mais duas vezes o desvio padrão dos controles negativos.

#### 4.4. PCR de papa de leucócitos

Para confirmar a ausência de DNA do protozoário no sangue dos animais negativos pelo ELISA, PCR de papa de leucócitos foi realizado conforme descrito por Diniz *et al.* (2008) para amplificação de DNA do kinetoplasto de *Leishmania* da família *donovani*. Brevemente, 1 µL de DNA de papa de leucócitos de 100 a 500 ng/µL foi adicionado à solução contendo 23 µL supermix (22 mM Tris-HCl pH 8,4, 55 mM KCl, 1,65 mM MgCl<sub>2</sub>, 220 µM dGTP, 220 µM dATP, 220 µM dTTP, 220 µM dCTP, 22 U taq DNA polimerase/mL), 0,5 µL de iniciadores a 10 uM (5'-CTTTTCTGGTCCC GCGGGTAGG-3' e 5'-CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3'), 0,7 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM e 0,2 µL taq DNA polimerase (5U/µL). Os parâmetros de ciclagem foram: desnaturação inicial por 4 minutos a 94°C, 49 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 59°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos seguidos por uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR, de 145 pares de base, foram visualizados em gel de agarose 2% em tampão TBE. Em cada reação foram incluídos controles positivos (DNA de papa de leucócitos de animais de região endêmica, clinicamente e laboratorialmente positivos para leishmaniose), negativos (DNA de papa de leucócitos de animais saudáveis e laboratorialmente negativos para leishmaniose) e brancos (supermix sem adição de DNA).

#### 4.5. Seleção de animais para isolamento e cultivo de macrófagos

Animais clinicamente saudáveis e negativos para leishmaniose visceral, por ELISA com antígeno rK39 e PCR de papa de leucócitos foram selecionados para derivação de macrófagos.

#### 4.6. Isolamento e cultivo de macrófagos caninos

A obtenção de macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico foi feita conforme descrito por Bueno *et al.* (2005) de forma estéril e em material livre de pirógenos. Resumidamente, 60 mL de sangue periférico foram coletados da veia jugular de cães negativos para leishmaniose em seringas de 60 mL contendo 264 µL de heparina (5.000 U/mL). O sangue foi diluído com PBS em uma proporção 1:1. Delicada e vagarosamente, 30 mL de sangue em PBS foram colocados em cima de uma coluna de gradiente de densidade com 15 mL de Histopaque 1077 em quatro tubos plásticos cônicos estéreis de 50 mL de forma a não misturar as camadas. Os frascos foram centrifugados a 400 g com freio e aceleração zerados por 40 minutos a 18°C, com formação de quatro camadas: PBS com plasma, células mononucleares, Histopaque e hemácias. Com auxílio de pipeta Pasteur, a camada de mononucleares foi transferida para outro tubo de 50 mL e completado com PBS até 50 mL. Os tubos foram centrifugados a 400 g por 10 minutos a 18°C, o sobrenadante desprezado e 5 mL de tampão de lise de hemácias adicionado. Após 5 minutos de incubação sob homogeneização, 45 mL de PBS foram adicionados. Os tubos foram centrifugados a 400 g por 10 minutos a 18°C e o procedimento repedido caso necessário. Após lise completa das hemácias, o sobrenadante foi descartado e o pellet suspenso em 50 mL de PBS. Os tubos foram novamente centrifugados a 400 g por 10 minutos a 18°C, o sobrenadante descartado e as células obtidas suspensas em 12 mL de RPMI completo. A suspensão de células foi transferida para garrafa de teflon de 125 mL com tampa de rosca e mantida em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo foi trocado com 24 horas para retirada de células não aderentes e a cada três dias por 10 dias, para a completa diferenciação de monócitos em macrófagos.

#### 4.7. Cultivo de *Leishmania infantum*

Promastigotas de *Leishmania infantum* cepa de referência da Organização Mundial de Saúde MHOM/BR/1970/BH46 foram cultivadas até fase metacíclica infectante em meio Schneider suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado, penicilina (100



U/mL) e estreptomicina (50 µg/ml) em estufa B.O.D. a 25°C.

#### 4.8. Infecção *in vitro* dos macrófagos caninos com *Leishmania infantum*

A infecção por *L. infantum* foi feita conforme Bueno *et al.* (2009). Resumidamente, após 10 dias de diferenciação, as garrafas de teflon foram colocadas em gelo por 30 minutos e agitadas vigorosamente para que as células desprendessem. A suspensão de células foi transferida para tubos plásticos cônicos estéreis que foram centrifugados a 2000 g por 10 minutos a 18°C. O sobrenadante foi descartado e as células suspensas em 1 mL de RPMI completo. A quantidade de células viáveis foi determinada através de contagem em câmara de Neubauer em azul de tripan a 0,5%. A suspensão de células foi diluída para uma concentração final de  $8 \times 10^4$  macrófagos/mL e 500 µL foram transferidos para quatro poços de *chamber slides* (4 x  $10^4$  macrófagos/poço). As células restantes foram centrifugadas a 2000 g por 10 minutos a 18°C, o sobrenadante descartado e adicionado 1 mL de Trizol e imediatamente congelado a -80°C até extração de RNA. Após 24 horas, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C (tempo zero) e os macrófagos infectados em duplicata com *L. infantum* cepa BH46 em uma multiplicidade de infecção de 10, após contagem em câmara de Neubauer em isotono. Após 24 ou 72 horas de infecção, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C e as lâminas das *chamber slides* destinadas à contagem de parasitas.

#### 4.9. Determinação de carga parasitária e percentual de sobrevivência intracelular de *Leishmania infantum* em macrófagos caninos

As lâminas das *chamber slides* foram coradas pelo método de May-Grunwald/Giemsa. Brevemente, as lâminas foram cobertas com 20 gotas de May-Grunwald por três minutos, adicionadas 20 gotas de água destilada e incubado por mais dois minutos. A mistura foi despezada e as lâminas cobertas com 20 gotas de solução de Giemsa (uma gota de Giemsa para cada mL

de água destilada) por 12 minutos e posteriormente lavadas em água corrente.

O número de amastigotas de *L. infantum* intracelulares nos macrófagos de cada poço foi determinado nas células coradas através de contagem direta em microscópio óptico de 200 células escolhidas ao acaso em diferentes campos. O percentual de sobrevivência intracelular de *L. infantum* para cada animal foi determinado dividindo a média do número de amastigotas por macrófago com 72 horas de infecção pela média do número de amastigotas por macrófago com 24 horas de infecção vezes 100.

#### 4.10. Determinação de diferentes graus de susceptibilidade à leishmaniose visceral canina

Os seis animais que apresentaram menor percentual de sobrevivência intracelular foram considerados resistentes, enquanto os seis animais que apresentaram maior percentual de sobrevivência intracelular foram considerados susceptíveis de acordo com Bueno *et al.* (2009). Com os material destes doze animais selecionados foram realizados qPCR para determinação de expressão de genes da imunidade inata, ELISA para dosagem de citocinas e quantificação de NO.

#### 4.11. Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada pelo método do Trizol de acordo com o protocolo do fabricante com material tratado para eliminação de RNases. Brevemente, a solução de células em Trizol foi retirada do freezer -80°C e incubada em temperatura ambiente por cinco minutos para completar a dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio, seguido de agitação vigorosa por 15 segundos. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por dois minutos antes de serem centrifugados a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. Aproximadamente 550 µL da fase superior aquosa foram transferidos para outro tubo plástico de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 500 µL de isopropanol para precipitar o RNA. Os tubos foram invertidos

vagarosamente e incubados a temperatura ambiente por 10 minutos até nova centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com um mL de etanol 75%, seguido de homogeneização e centrifugação a 7.500 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet suspenso em aproximadamente 40 µL de água DEPC e incubado por 10 minutos a 55°C. Alíquotas para gel e dosagem de RNA em espectrofotômetro foram feitas e o RNA congelado a -80°C até confecção de cDNA.

#### 4.12. Gel de RNA

A 5,5 µL de RNA foram adicionados 2,5 µL de MOPS 10x, 4,5 µL de formaldeído 12,3 M e 12,5 µL de formamida. A mistura foi homogeneizada e incubada por 15 minutos a 55°C antes da adição de 5 µL de tampão de corrida e 1 µL de brometo de etídeo. As amostras foram aplicadas em gel de agarose a 1% em tampão MOPS com 18% de formaldeído, que foi corrido a 50 V, 400 mA por 150 minutos. As bandas de 28 e 18S foram avaliadas quanto à intensidade e degradação.

#### 4.13. Confecção de cDNA

cDNA foi produzido utilizando o kit TaqMan Reverse Transcription Reagents conforme instruções do fabricante. Brevemente, para cada 10 µL de reação adicionou-se 1 µL de tampão, 2,2 µL de MgCl<sub>2</sub>, 2 µL de dNTP, 0,5 µL de hexâmeros, 0,2 µL de inibidor, 0,25 µL de transcriptase reversa, 2,35 µL de água DEPC e 1,5 µL de RNA a 500 ng/µL, que passaram por 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 48°C e 95°C antes de serem congelados a -80°C até realização de qPCR.

#### 4.14. Quantificação de mRNA de genes da imunidade inata através de qPCR

A expressão de mRNA dos genes da imunidade inata TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9, NOD1 e 2 e *Nramp1*, além de β-actina e GAPDH usados como normalizadores, foi mensurada por PCR em tempo real. Para cada reação utilizou-se 2,5 µL de cDNA, 1 µL de cada iniciador a 10 µM conforme Tabela 2, 12,5 µL de SYBR Green PCR

Master Mix e 8 µL de água DEPC. Foi utilizado o termociclador Step One Plus com os seguintes parâmetros de ciclagem: 95°C por 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os dados foram analisados pelo método CT comparativo (Livak e Schmittgen, 2001). Os valores de CT foram normalizados com base na expressão de β-actina.

Tabela 2: Lista de genes e iniciadores que foram utilizados para qPCR.

Sequência alvo	Iniciadores
TLR1	5'-TGCCATCCTACCGTGAACCTCA-3' 5'-ACTGTGTGGCACTCAACCCCAGA-3'
TLR2	5'-TCCGACACAAGAATGCAAAG-3' 5'-GGCAAATCAGGGAAAATGA-3'
TLR3	5'-ACAGCTCCCCTTCACCTTTT-3' 5'-CCCTCCAACAGCTCATCATT-3'
TLR4	5'-GCCATTGCTTCTCCAAC TTC-3' 5'-TGGTTTAGGCCCTGATATGC-3'
TLR5	5'-CCAGGACCAGACG TTCAGAT-3' 5'-GCCCAGGAAGATGGTGTCTA-3'
TLR6	5'-GGGCAAGAAACACACCCTTA-3' 5'-CTTCACCCAGGCAGAATCAT-3'
TLR7	5'-GGAAGACCCAAGGGAGAAAC-3' 5'-GCTGTATGCTCTGGGAAAGG-3'
TLR9	5'-CGCAGACTCAACCTGTCCTT-3' 5'-GCCATGTATGTCCAGCTCCT-3'
NOD1	5'-AGAGCAAGGGTGAAGAAGCA-3' 5'-GAGAAGCCAATCTCCGACAG-3'
NOD2	5'-ACTGCTGTTGGCCTGACTTT-3' 5'-TGA ACTCATCAAAGCCATCG-3'
<i>Nramp1</i>	5'-CAGGCCTTCTACCAGCAAAC-3' 5'-ATGTCCACCTCCACCGTAAG-3'
GAPDH	5'-AAGGCTGAGAACGGGAAACT-3' 5'-TACTCAGCACCAGCATCACC-3'
$\beta$ -actina	5'-GGCATCCTGACCCTGAAGTA-3' 5'-CGCAGCTCGTTGTAGAAGGT-3'

#### 4.15. Dosagem de citocinas por ELISA

Os ensaios de ELISA para detecção de IL-10, IL-12/IL-23 p40, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  caninos no sobrenadante dos macrófagos caninos infectados com *L. infantum* por 0, 24 ou 72 horas foram feitos utilizando kits do sistema DuoSet ELISA Development Systems conforme orientações do fabricante. Brevemente, placas de 96 poços de meia área foram sensibilizadas com 25  $\mu$ L de anticorpo de captura diluído 1:180 em PBS. As placas foram incubadas a 4°C por no mínimo 12 horas antes de serem lavadas quatro vezes com tampão de

lavagem. As placas foram então incubadas com 75  $\mu$ L de reagente diluente por 60 minutos a temperatura ambiente para minimizar reações inespecíficas. A solução de bloqueio foi descartada e substituída por 25  $\mu$ L de amostras (sobrenadantes de cultivo), controles positivos (sobrenadantes de cultivo de macrófagos tratados com 1 $\mu$ g/mL de LPS), padrões (presentes nos kits e diluídos em reagente diluente) e brancos (reagente diluente) em duplicata, que foram incubados por 2 horas a temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas quatro vezes com tampão de lavagem e incubadas com 25  $\mu$ L

de anticorpo de detecção diluído 1:180 em reagente diluente por duas horas a temperatura ambiente. As placas foram mais uma vez lavadas quatro vezes com tampão de lavagem e incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente sob abrigo da luz com 25  $\mu\text{L}$  de solução de estreptavidina-peroxidase de raiz forte. A lavagem com tampão de lavagem foi repetida e 25  $\mu\text{L}$  de solução substrato foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente sob abrigo da luz. Após os 20 minutos foram acrescentados 12,5  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico para parar a reação. As placas tiveram absorbância medida em leitor de microplacas a 450 nm. Uma curva padrão foi gerada usando o Graphpad Prism 5 para cada citocina para mensuração das amostras em pg/mL.

#### 4.16. Dosagem de NO

A quantificação de NO foi determinada indiretamente pela mensuração do acúmulo de nitrito no sobrenadante dos macrófagos caninos infectados com *L. infantum* pela técnica do reagente de Griess. Brevemente, 1% sulfanilamida e 0,1% dicloridrato de N-(1 naftil) etilenodiamina em 2,5% de ácido fosfórico foram misturados em uma proporção 1:1. Em placas de 96 poços de fundo chato, 50  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de

cultivo foram adicionados a 50  $\mu\text{L}$  da mistura de Griess. A curva padrão foi feita através de oito pontos de diluição seriada de nitrito de sódio em RPMI completo de 200  $\mu\text{M}$  a 1,56  $\mu\text{M}$ . Após 10 minutos de reação, a absorbância foi lida em leitor de microplacas a 540 nm.

#### 4.17. Análises estatísticas

Os dados de dosagem de citocinas e NO foram comparados pela análise de variância para dois fatores (*Two-way* ANOVA, GraphPad Prism 5). Foram considerados valores significativos quando  $p < 0,05$ .

Os dados de expressão gênica foram normalizados com base na expressão de  $\beta$ -actina, por ter apresentado maior estabilidade. Após transformação logarítmica, as médias dos animais resistentes e susceptíveis foram comparadas pelo teste t de Student (GraphPad Prism 5). Foram considerados valores significativos quando  $p < 0,05$ .

Para avaliar a existência de correlação entre sobrevivência intracelular de *L. infantum* e expressão dos diferentes genes, a correlação de Pearson foi utilizada (GraphPad Prism 5). Foram considerados valores significativos quando  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Triagem de animais

Para triagem de animais negativos para infecção por *Leishmania* sp., 234 cães tiveram sangue coletado. Destes, 96 (41,03%) possuíam anticorpos anti-*Leishmania*, detectados através de ELISA com antígeno recombinante K39. Animais com sorologia negativa tiveram o DNA extraído da papa de leucócitos submetido a

PCR. 12 animais dos 138 avaliados foram positivos (8,7%) enquanto na maioria (91,3%) não foi possível detectar DNA do protozoário. Portanto, dos 234 cães, 126 (53,85%) foram considerados negativos para infecção por *Leishmania* sp. (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo dos resultados de triagem dos cães para infecção por *Leishmania* sp.

Teste sorológico para <i>Leishmania</i> ELISA rK39 (234 animais)	
Número de animais positivos (porcentagem)	Número de animais negativos (porcentagem)
96 (41,03%)	138 (58,97%)
Teste PCR papa de leucócitos	
Número de animais positivos (%)	Número de animais negativos (%)
12 (8,70%)	126 (91,30%)

### 5.2. Isolamento e cultivo de macrófagos caninos

Dos 126 cães clinicamente negativos para leishmaniose visceral, por ELISA com antígeno rK39 e PCR de papa de leucócitos, 48 animais clinicamente saudáveis foram selecionados e tiveram seus monócitos de sangue periférico derivados em macrófagos.

### *Leishmania infantum* em macrófagos caninos

Após derivação e infecção, o número de amastigotas de *L. infantum* intracelulares nos macrófagos em cada tempo foi determinado e o percentual de sobrevivência intracelular de *L. infantum* calculado para cada animal. Os dados estão dispostos na Tabela 4.

### 5.3. Determinação de carga parasitária e percentual de sobrevivência intracelular de

Tabela 4. Número médio de amastigotas por macrófagos com 24 e 72 horas pós infecção experimental com *Leishmania infantum* e percentual de sobrevivência individual. Animais selecionados como resistentes ou susceptíveis estão destacados em cinza.

Número do animal	Número médio de amastigotas por macrófagos com 24 h pós infecção	Número médio de amastigotas por macrófagos com 72 h pós infecção	Percentual de sobrevivência
1	6,78	0,63	9,22
2	7,18	0,75	10,38
3	5,81	0,62	10,58
4	11,97	1,44	11,99
5	5,82	0,71	12,20
6	7,28	0,92	12,57
7	6,36	0,96	15,05
8	8,85	1,40	15,79
9	12,12	2,12	17,46
10	9,18	1,62	17,65
11	3,95	0,72	18,11
12	6,10	1,12	18,38
13	9,56	1,86	19,41
14	4,37	0,86	19,61
15	9,13	1,93	21,15
16	8,35	1,77	21,22
17	8,52	1,81	21,30
18	8,37	1,80	21,51
19	8,28	1,84	22,22
20	7,09	1,61	22,72
21	9,49	2,21	23,30
22	12,30	2,92	23,73
23	7,93	1,89	23,82
24	6,85	1,63	23,85
25	7,24	1,73	23,94
26	7,45	1,83	24,50
27	8,59	2,47	28,70
28	4,34	1,29	29,74
29	10,21	3,07	30,03
30	9,21	2,81	30,47
31	9,64	2,97	30,76
32	12,64	4,28	33,86
33	4,52	1,57	34,72
34	11,19	3,94	35,17
35	11,27	4,12	36,53
36	9,04	3,32	36,69
37	8,19	3,32	40,56
38	5,71	2,32	40,66
39	11,98	4,96	41,40
40	14,37	6,22	43,27
41	10,31	5,27	51,14
42	11,84	6,33	53,42
43	11,09	6,11	55,12
44	8,84	4,88	55,15
45	16,05	10,22	63,64
46	10,61	7,14	67,28
47	10,17	7,22	71,03
48	12,24	9,74	79,58

Para visualizar a distribuição dos percentuais de sobrevivência intracelular de

*L. infantum*, a Figura 1 mostra a frequência para intervalos de classe de 5%

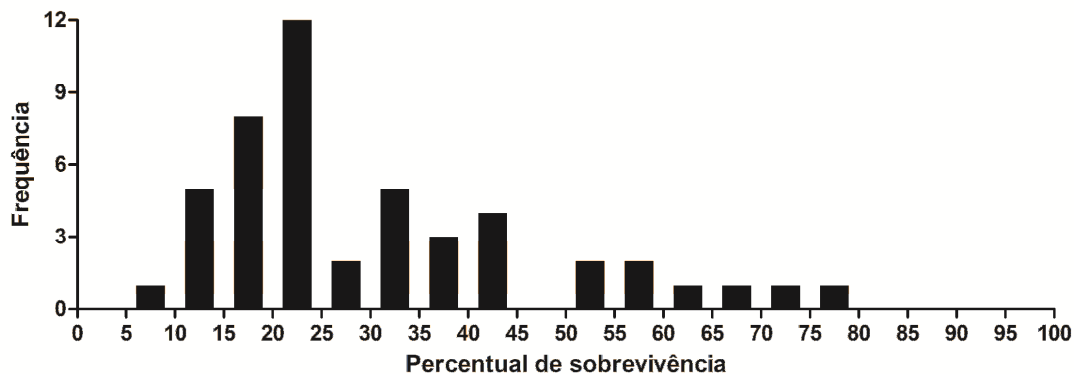


Figura 1. Frequência observada para intervalos de classe de 5% de percentual de sobrevivência de *Leishmania infantum* em macrófagos caninos. O percentual de sobrevivência foi obtido dividindo-se a média do número de amastigotas intracelulares com 72 horas pós infecção pela média do número de amastigotas intracelulares com 24 horas pós infecção.

#### 5.4. Determinação de cães resistentes e suscetíveis a leishmaniose visceral

Os seis animais que apresentaram menor percentual de sobrevivência intracelular foram considerados resistentes, enquanto os seis animais que apresentaram maior

percentual de sobrevivência intracelular foram considerados suscetíveis. Estes animais estão destacados em cinza na Tabela 4. Imagens representativas de macrófagos infectados com 24 e 72 horas pós infecção de animal resistente e suscetível são mostradas na Figura 2.

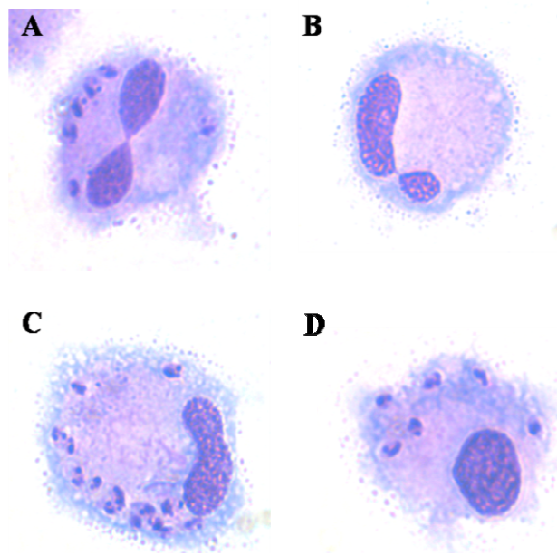


Figura 2. Imagens representativas de macrófagos de animais resistentes (A e B) e suscetíveis (C e D) com 24 (A e C) e 72 horas (B e D) pós infecção com *Leishmania infantum*. May-Grunwald/Giemsa, 40 x.

### 5.5. Quantificação de mRNA de genes da imunidade inata através de qPCR

O RNA extraído foi quantificado por espectrofotometria e avaliado por gel de RNA, demonstrando boa concentração e baixa degradação. Após confecção do cDNA, as amostras foram submetidas à qPCR para quantificação de mRNA de genes da imunidade inata. Os dados são mostrados nas Figuras 3 e 4. Importante ressaltar que não houve amplificação de  $\beta$ -actina nem demais genes em um animal de cada grupo, e, portanto, estes dados foram excluídos.

Enquanto a expressão constitutiva de NOD2 e TLR9 é ínfima, e a de NOD1, TLR1 e TLR7 é baixa, a expressão basal de *Nramp1* e TLR2 a 6 é mais elevada nos macrófagos caninos derivados de monócitos. Não houve diferença significativa de expressão dos diferentes genes entre animais resistentes e suscetíveis a leishmaniose visceral canina.

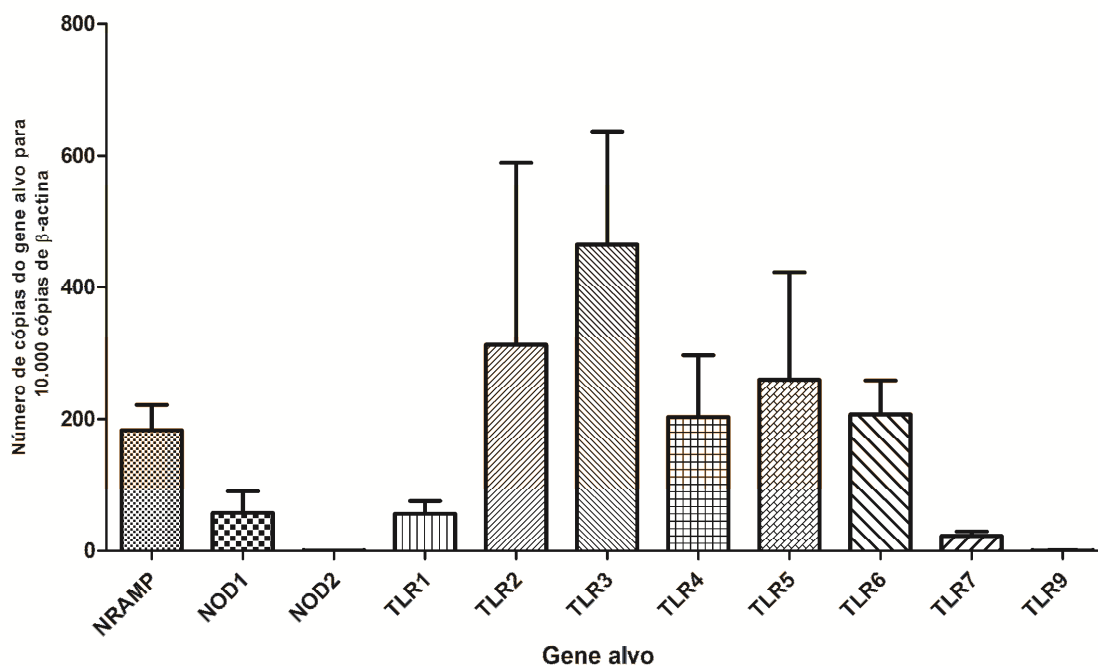
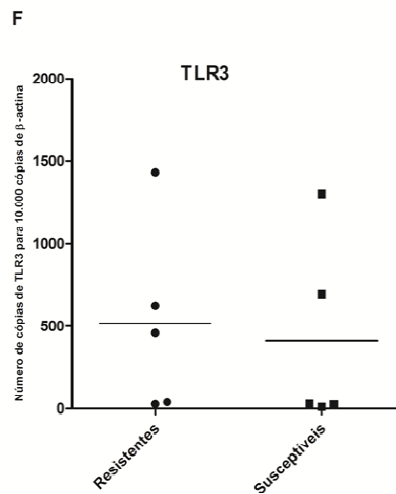
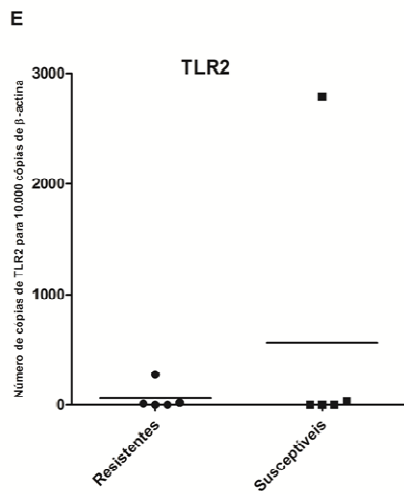
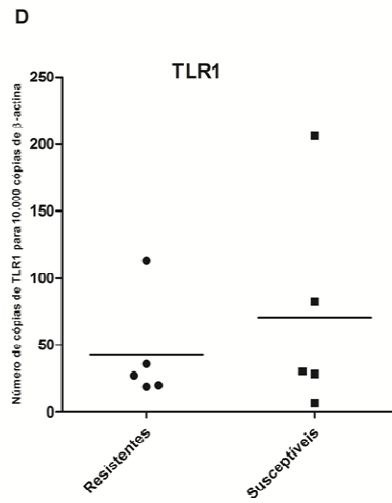
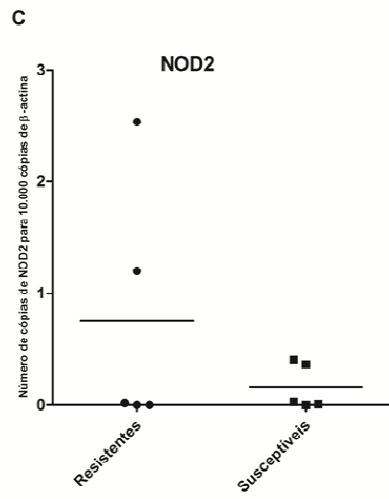
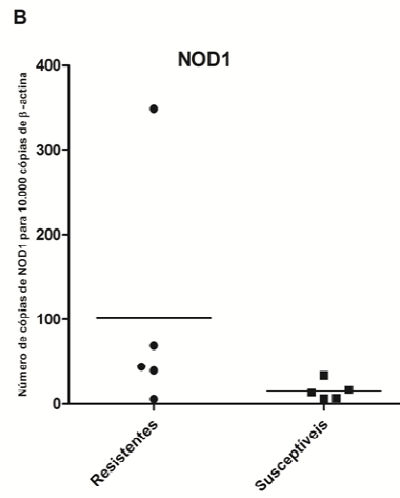
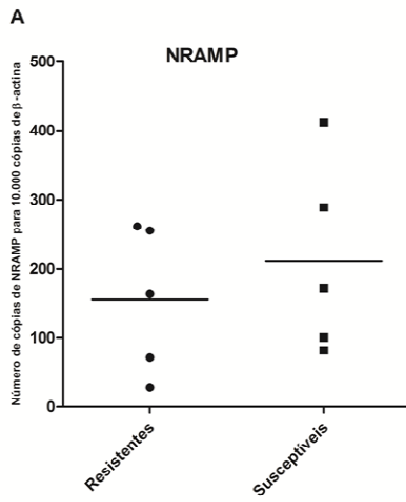


Figura 3. Transcrição de *Nramp1*, NOD1, NOD2, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 e TLR9 em macrófagos caninos derivados de monócitos. Cada coluna representa a média aritmética de dez animais em duplicata com barra de erro padrão.





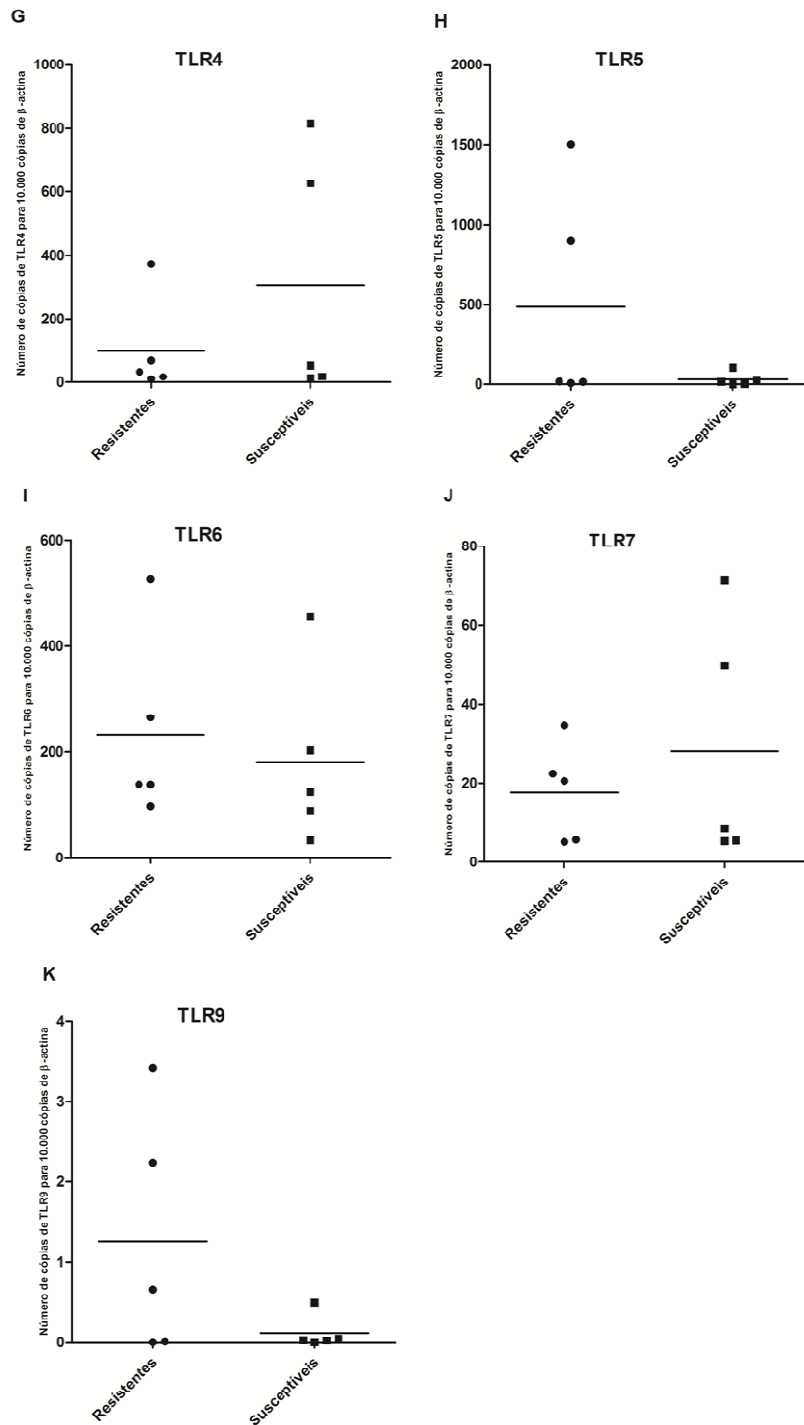
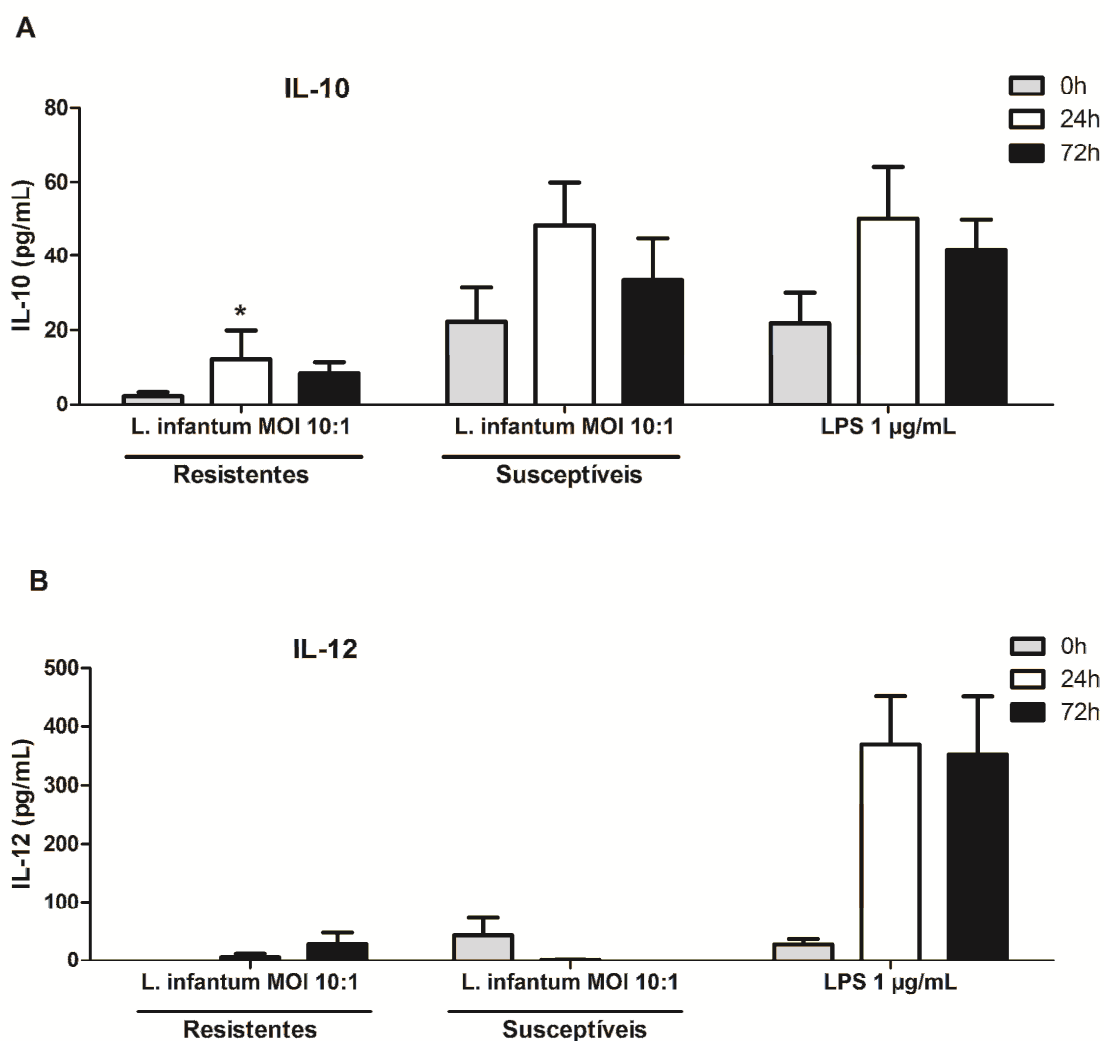


Figura 4. Transcrição de genes da imunidade inata em macrófagos de cães resistentes e susceptíveis a infecção por *Leishmania infantum*. (A) *Nramp1*, (B) *NOD1*, (C) *NOD2*, (D) *TLR1*, (E) *TLR2*, (F) *TLR3*, (G) *TLR4*, (H) *TLR5*, (I) *TLR6*, (J) *TLR7* e (K) *TLR9* em macrófagos caninos derivados de monócitos. Os pontos representam a média da duplicata de cada um dos cinco animais analisados. Os traços representam a média aritmética da dispersão dos pontos.

## 5.6. Dosagem de citocinas por ELISA

A detecção de IL-10, IL-12/IL-23 p40, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  caninos no sobrenadante dos macrófagos caninos infectados com *L. infantum* por 0, 24 ou 72 horas foi feito por um kit comercial de ELISA. Os resultados são mostrados na Figura 5. A secreção de TNF- $\alpha$  foi mais elevada com 24 horas nos animais resistentes quando comparados aos susceptíveis. A produção de IFN- $\gamma$  também

foi mais elevada nos cães resistentes, porém com 72 horas de infecção. Já a secreção de IL-10 foi menor nos animais resistentes com 24 horas. A produção de IL-12 foi muito baixa, não havendo diferença de expressão entre resistentes e susceptíveis. Conforme esperado, LPS induziu a expressão de IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$ .



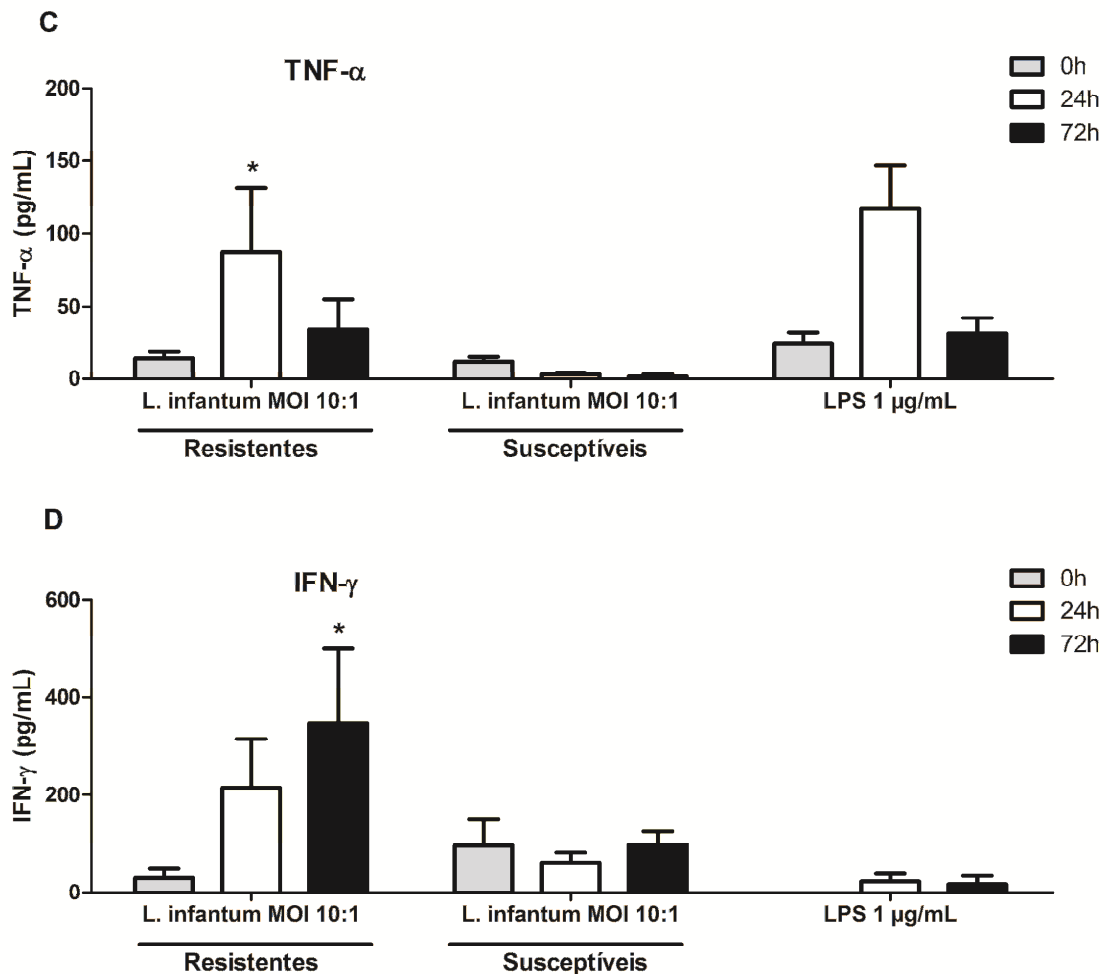


Figura 5. Dosagem de citocinas por ELISA em sobrenadante de cultivo de macrófagos. Os macrófagos ( $4 \times 10^4$ /poço) de seis animais resistentes ou susceptíveis foram infectados em duplicata com *Leishmania infantum* cepa BH 46 em um MOI de 10:1 e os sobrenadantes coletados com 0, 24 e 72 horas pós infecção. O controle positivo consiste de macrófagos de quatro cães tratados com 1  $\mu$ g/mL de LPS. (A) IL-10, (B) IL-12, (C) TNF- $\alpha$  e (D) IFN- $\gamma$ . Cada coluna representa a média aritmética com erro padrão. Um asterisco (\*) indica que a diferença entre animais resistentes e susceptíveis no mesmo período pós infecção é estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

### 5.7. Dosagem de NO

A dosagem indireta de NO através da quantificação de nitritos foi feita pelo método de Griess. Os resultados podem ser vistos na Figura 6. Conforme esperado,

LPS induziu a expressão de NO, porém não houve produção de NO nos animais resistentes e susceptíveis infectados com *L. infantum*.

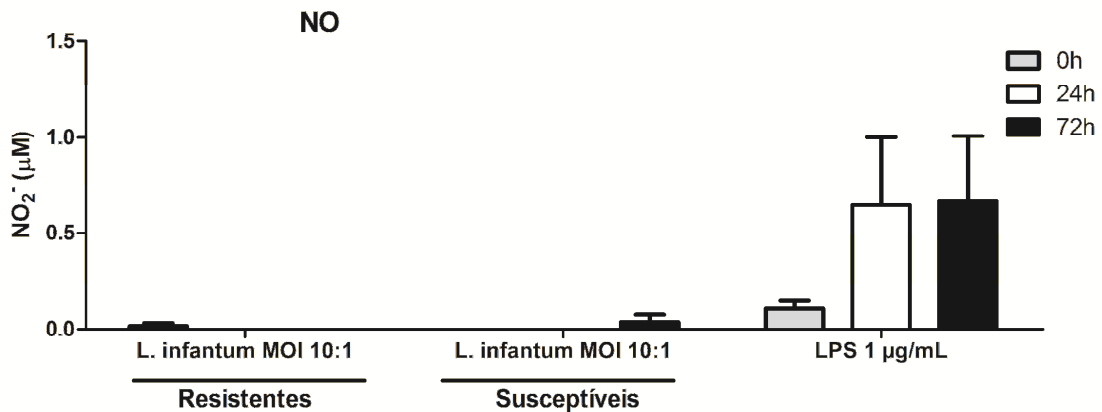


Figura 6. Dosagem indireta de NO através da dosagem de nitrito pelo método de Griess em sobrenadante de cultivo de macrófagos. Os macrófagos ( $4 \times 10^4$ /poço) de seis animais resistentes ou susceptíveis foram infectados em duplicata com *Leishmania infantum* cepa BH 46 em um MOI de 10:1 e os sobrenadantes coletados com 0, 24 e 72 horas pós infecção. O controle positivo consiste de macrófagos de quatro cães tratados com 1  $\mu\text{g/mL}$  de LPS. Cada coluna representa a média aritmética com erro padrão.

#### 5.8. Estudo de correlação entre expressão gênica e sobrevivência intracelular de *Leishmania infantum*

Para avaliar se existe correlação entre expressão dos diferentes genes da imunidade inata e sobrevivência intracelular

de *L. infantum* foi feito estudo de correlação de Pearson que identificou uma correlação negativa somente entre expressão de NOD2 e sobrevivência intracelular nos animais resistentes a leishmaniose visceral, conforme demonstrado na Figura 7.

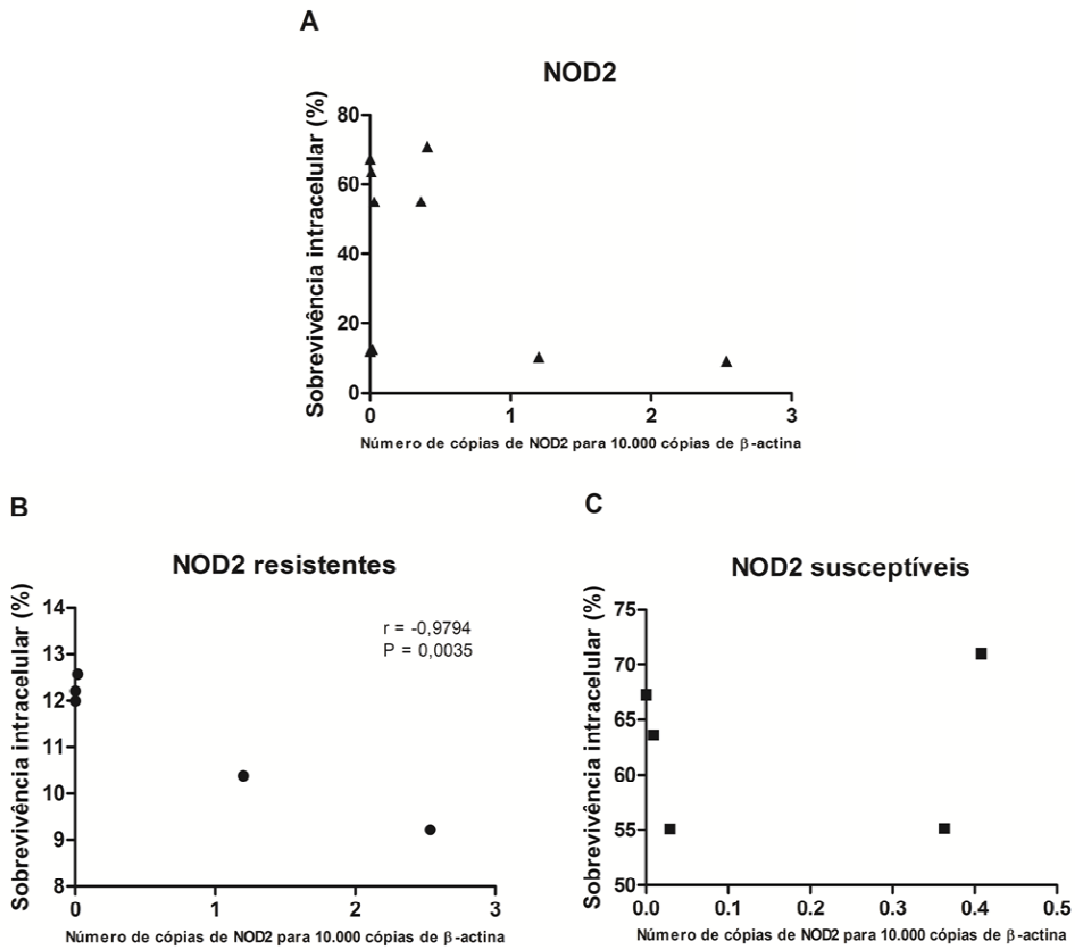


Figura 7. Estudo de correlação de Pearson entre expressão gênica de NOD2 e sobrevivência intracelular de *Leishmania infantum* em macrófagos de cães. (A) Correlação feita com dez animais, independente de susceptibilidade a leishmaniose visceral, (B) correlação com cinco animais resistentes e (C) com cinco animais susceptíveis. Valores de r e P indicam correlação negativa entre expressão de NOD 2 e sobrevivência intracelular em animais resistentes a leishmaniose.

## 6. DISCUSSÃO

Este trabalho avança o conhecimento na área de imunologia de cães, ao traçar o perfil de expressão basal de importantes genes associados à imunidade inata, como os das famílias dos NLR e TLR, além do *Nramp1*, em macrófagos de cães. Diferentemente de outras espécies (Fukui *et al.*, 2001, Chang *et al.*, 2009), este perfil nunca antes havia sido investigado em cães, abrindo portas para um melhor entendimento da imunidade inata canina frente não só a leishmaniose visceral como inúmeras doenças que acometem a espécie.

O perfil de expressão basal dos genes estudados indica que provavelmente os genes com alto nível de expressão constitutiva, *Nramp1* e TLR 2, 3, 4, 5, e 6, receptores de PAMP tanto de bactérias Gram positivo e negativo, quanto fungos e vírus, possuem papel importante e ativo no reconhecimento e controle de patógenos que afetam a espécie. Já NOD2 e TLR9, provavelmente, possuem função secundária na imunidade inata dos cães, devido a sua baixa expressão em macrófagos, células fagocitárias.

A dosagem de citocinas no sobrenadante de macrófagos primários caninos infectados com *L. infantum* gerou dados interessantes. Sobrenadantes de animais resistentes à leishmaniose visceral expressaram maiores quantidades de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e menores de IL-10. Estes achados estão em concordância com estudos na área. Cezário *et al.* (2011), avaliando a infecção por *L. infantum* em camundongos Balb/c, que são susceptíveis e permitem o desenvolvimento da infecção, verificaram que a produção de IL-10 manteve-se elevada durante todo o período de infecção e que no pico de infecção a produção tanto de IFN- $\gamma$  quanto de IL-12 diminuíram significativamente. Muraille *et al.* (2003) verificaram que em camundongos C57BL/6 MyD88 *knockout*, que apresentam perda da resistência natural

a infecção por *L. major*, a expressão de IFN- $\gamma$  e IL-12 é mais baixa. Interessantemente, cães vacinados contra leishmaniose visceral com vacinas comerciais, expressam maiores níveis de IFN- $\gamma$ , o que pode ajudar a debelar uma possível infecção (Araújo *et al.*, 2009). Em outro estudo, uma vacina viva atenuada de *L. donovani* levou, dentre outros, a maior produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12, compatível com a produção observada em cães resistentes neste trabalho (Fiuza *et al.*, 2013). Ainda, a eficácia de uma glicoproteína de *L. donovani* em eliminar o parasito de macrófagos *in vitro* e *in vivo* foi associada com a indução de IL-12 mediada por TLR4 e pela inibição de IL-10 mediada por TLR2 (Paul *et al.*, 2012). Pacientes com baixa produção de TNF- $\alpha$  não são capazes de curar espontaneamente lesões por *L. major* (Safaiyan *et al.*, 2011), o que confirma a importância de TNF- $\alpha$  na resistência a doença. De forma complementar, um estudo mostrou que monócitos de humanos portadores assintomáticos de *L. infantum* quando desafiados *in vitro* produzem quantidades superiores de TNF- $\alpha$  que pessoas não infectadas (Viana *et al.*, 2008).

A dosagem tanto de IL-12 quanto de NO foi muito baixa, provavelmente devido à menor sensibilidade das técnicas utilizadas e ao pequeno número de macrófagos utilizados em cultivo ( $4 \times 10^4$ /poço), limitação intrínseca do delineamento experimental. Portanto, não se deve concluir que não há diferença de produção de IL-12 e NO entre cães resistentes e susceptíveis a leishmaniose visceral, e sim uma limitação na mensuração das quantidades produzidas.

Apesar da expressão de NOD2 ter sido baixa, existe uma interessante correlação negativa entre expressão gênica e sobrevivência intracelular de *L. infantum* em animais resistentes, ou seja, quanto maior a expressão de NOD2, maior a chance de o animal ser resistente a

leishmaniose visceral. O papel de NOD2 na leishmaniose nunca foi investigado anteriormente em nenhum hospedeiro e pode ser uma futura linha de pesquisa para a identificação de animais naturalmente resistentes e consequente controle da doença.

Apesar de não ter sido o foco do trabalho, a prevalência de 46,15% (108/234) de animais positivos para infecção por *Leishmania* sp. na população testada é extremamente elevada e alarmante. É sabido que a região metropolitana de Belo Horizonte é endêmica para leishmaniose visceral canina. De acordo com Lopes (2009), em 2007 a frequência de soropositividade em cães de Belo Horizonte era de 9,3% de amostras oriundas das nove regionais e do centro de controle de zoonoses da cidade. É importante ressaltar que a população amostrada no presente estudo pode ser considerada viciada, pois consistia de cães errantes resgatados na região metropolitana de Belo Horizonte. Estes animais possuem mais fatores de risco para infecção por *Leishmania* sp. Mesmo assim, um estudo com animais da Sociedade Protetora de Minas Gerais, de origem semelhante aos utilizados neste trabalho, detectou 17% de soropositividade por imunofluorescência, valor ainda muito

abaixo do encontrado (Silva *et al.*, 2001). Os dados aqui mostrados chamam atenção para necessidade de estudos e políticas que favoreçam o controle da doença na região.

O fato de não terem sido encontradas diferenças de expressão constitutiva dos diferentes genes da imunidade inata entre cães resistentes e susceptíveis a leishmaniose visceral não exclui a possibilidade de participação destes genes na patogênese da doença. Como ocorrem em outras doenças caninas, como na doença inflamatória intestinal, polimorfismos no gene do TLR5 e não diferença no nível de expressão que são relacionados à maior susceptibilidade a doença (Kathrani *et al.*, 2010). Na leishmaniose cutânea humana, por exemplo, já foi demonstrado que polimorfismos no gene do TLR4 podem levar a um aumento da susceptibilidade e gravidade da infecção por *Leishmania major* (Ajdary *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos neste trabalho nos ajudam a compreender melhor não só a imunidade inata dos cães frente à leishmaniose visceral quanto nos fornecem importantes subsídios para estudos futuros com a espécie.



## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho investigou o papel de genes da imunidade inata em macrófagos de cães frente à leishmaniose visceral canina, com objetivo de identificar componentes que contribuam para a resistência natural do cão à doença. O estudo solidificou e desenvolveu metodologias. Além disso, demonstrou o perfil de expressão basal de importantes genes associados à imunidade inata em macrófagos caninos. Revelou que macrófagos de cães resistentes e susceptíveis à leishmaniose visceral apresentam expressão de citocinas distinta. Adicionalmente, foi traçada uma correlação entre a expressão de NOD2

e a sobrevivência do parasito intracelular. Resultados, estes, que abrem portas para futuros estudos. Devido à importância para saúde pública da leishmaniose visceral, esta importante linha de pesquisa visa contribuir para um melhor entendimento da resposta imune inata do cão frente à infecção, com consequente ampliação do conhecimento sobre a doença e impacto significativo em seu controle. Finalmente, o potencial de estudos com TLR, NLR e outros genes da imunidade inata em cães é extremamente amplo e pode auxiliar a desvendar a patogênese de inúmeras doenças que acometem essa espécie.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 6 ed. Brasil: Elsevier, 2008. 576 p.
- AJDARY, S.; GHAMILLOUIE, M. M.; ALIMOHAMMADIAN, M. H. *et al.* Toll-like receptor 4 polymorphisms predispose to cutaneous leishmaniasis. *Microbes Infect.*, v. 13, n. 3, p. 226-231, 2011.
- ALLENSPACH, K.; HOUSE, A.; SMITH, K. *et al.* Evaluation of mucosal bacteria and histopathology, clinical disease activity and expression of Toll-like receptors in German shepherd dogs with chronic enteropathies. *Vet. Microbiol.*, v. 146, n. 3-4, p. 326-235, 2010.
- ALTET, L.; FRANCINO, O.; SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Mapping and sequencing of the canine *Nramp1* gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. *Infect. Immun.*, v. 70, n. 6, p. 2763-2771, 2002.
- ALVAR, J; VÉLEZ, I. D.; BERN, C. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One*, v.7, n. 5, e35671, 2012.
- ARAÚJO, M. S.; ANDRADE, R. A.; SATHLER-AVELAR, R. *et al.* T-cell-derived cytokines, nitric oxide production by peripheral blood monocytes and seric anti-Leishmania (*Leishmania*) *chagasi* IgG subclass patterns following immunization against canine visceral leishmaniasis using Leishvaccine and Leishmune. *Vaccine*, v. 27, n. 7, p. 1008-1017, 2009.
- ASTAKHOVA, N. M.; PERELYGIN, A. A.; ZHARKIKH, A. A. *et al.* Characterization of equine and other vertebrate TLR3, TLR7, and TLR8 genes. *Immunogenetics*, v. 61, n. 7, p. 529-539, 2009.
- ATHMAN, R.; PHILPOTT, D. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 7, n. 1, p. 25-32, 2004.
- BECKER, I.; SALAIZA, N.; AGUIRRE, M. *et al.* Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 130, n. 2, p. 65-74, 2003.
- BRADLEY, D. J. Regulation of Leishmania populations within the host. II. Genetic control of acute susceptibility of mice to Leishmania donovani infection. *Clin. Exp. Immunol.* v. 30, p. 130-140, 1977.
- BUENO, R; MELLO, M. N.; MENEZES, C. A. *et al.* Phenotypic, functional, and quantitative characterization of canine peripheral blood monocyte-derived macrophages. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 5, p. 521-524, 2005.
- BUENO, R.; CARVALHO NETA, A. V.; XAVIER, M. N. *et al.* cDNA sequencing and expression of *Nramp1* (*Slc11a1*) in dogs phenotypically resistant or susceptible to visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 127, n. 3-4, p. 332-339, 2009.
- BURGENER, I. A.; JUNGI, T. W. Antibodies specific for human or murine Toll-like receptors detect canine leukocytes by flow cytometry. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 124, n. 1-2, p. 184-191, 2008.
- BURGENER, I. A; KONIG, A.; ALLENSPACH, K. *et al.* Upregulation of toll-like receptors in chronic enteropathies in dogs. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 22, n. 3, p. 553-560, 2008.

- CEZÁRIO, G. A.; DE OLIVEIRA, L. R.; PERESI, E. et al. Analysis of the expression of toll-like receptors 2 and 4 and cytokine production during experimental *Leishmania chagasi* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 106, n. 5, p. 573-583, 2011.
- CHANDRA, D.; NAIK, S. *Leishmania donovani* infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 154, n. 2, p. 224-234, 2008.
- CHANG, J. S.; RUSSELL, G. C.; JANN, O. et al. Molecular cloning and characterization of Toll-like receptors 1-10 in sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 127, n. 1-2, p. 94-104, 2009.
- CHOTIMANUKUL, S.; SIRIVAIDYAPONG, S. Differential expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) in healthy and infected canine endometrium. *Theriogenology*, v. 76, n. 6, p. 1152-1161, 2011.
- CHOTIMANUKUL, S.; SIRIVAIDYAPONG, S. The Localization of Toll-like Receptor 2 (TLR2) in the Endometrium and the Cervix of Dogs at Different Stages of the Oestrous Cycle and with Pyometra. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 47, n. 6, p. 351-355, 2012.
- CRISTOFARO, P.; OPAL, S. M. Role of Toll-like receptors in infection and immunity: clinical implications. *Drugs*, v. 66, n. 1, p. 15-29, 2006.
- DAIFALLA, N. S.; BAYIH, A. G.; GEDAMU, L. *Leishmania donovani* recombinant iron superoxide dismutase B1 protein in the presence of TLR-based adjuvants induces partial protection of BALB/c mice against *Leishmania major* infection. *Exp. Parasitol.*, v. 131, n. 3, p. 317-324, 2012.
- DE VEER, M. J.; CURTIS, J. M.; BALDWIN, T. M. et al. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur. J. Immunol.*, v. 33, n. 10, p. 2822-2831, 2003.
- DINIZ, S. A.; SILVA, F. L.; CARVALHO NETA, A. C. et al. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. *J. Infect. Dev. Ctries*, v. 2, n. 1, p. 24-33, 2008.
- FIUZA, J. A.; SANTIAGO, H. C.; SELVAPANDIYANE, A. et al. Induction of immunogenicity by live attenuated *Leishmania donovani* centrin deleted parasites in dogs. *Vaccine*, v. 31, p. 1785-1792, 2013.
- FLANDIN, J. F.; CHANO, F.; DESCOTEAUX, A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. *Eur. J. Immunol.*, v. 36, n. 2, p. 411-420, 2006.
- FUKUI, A.; INOUE, N.; MATSUMOTO M. et al. Molecular cloning and functional characterization of chicken toll-like receptors. A single chicken toll covers multiple molecular patterns. *J. Biol. Chem.*, v. 276, n. 50, p. 47143-47149, 2001.
- GRIMALDI, G.; 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.
- GROS, P.; SKAMENE, E.; FORGET, A. Genetic control of natural resistance to

- Mycobacterium bovis (BCG) in mice. *J. Immunol.* v. 127, p. 2417-2421, 1981.
- GUERRA, C. S.; SILVA, R. M.; CARVALHO, L. O. et al. Histopathological analysis of initial cellular response in TLR-2 deficient mice experimentally infected by Leishmania (L.) amazonensis. *Int. J. Exp. Pathol.*, v. 91, n. 5, p. 451-459, 2010.
- HANSSON, G. K.; EDFELDT, K. Toll to be paid at the gateway to the vessel wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 25, n. 6, p. 1085-1087, 2005.
- HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; COSTA, D. L. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol.*, v. 27, n. 9, p. 403-409, 2011.
- HASHIMOTO, M.; ASAHINA, Y.; SANO, J. et al. Cloning of canine toll-like receptor 9 and its expression in dog tissues. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 106, n. 1-2, p. 159-163, 2005.
- HOUSE, A. K.; GREGORY, S. P.; CATCHPOLE, B. Pattern-recognition receptor mRNA expression and function in canine monocyte/macrophages and relevance to canine anal furunculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 124, n. 3-4, p. 230-240, 2008.
- HOUSE, A. K.; BINNS, M. M.; GREGORY, S. P.; CATCHPOLE, B. Analysis of NOD1, NOD2, TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 and TLR9 genes in anal furunculosis of German shepherd dogs. *Tissue Antigens*, v. 73, n. 3, p. 250-254, 2009.
- HUBER, S.; ROOSJE, P. J.; JANDA, J. et al. Characterization of antibodies specific for canine TLR4, 5 and 9 by ELISA, Western blotting and immunohistochemistry. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 144, n. 3-4, p. 247-254, 2011.
- JAYAKUMAR, A.; CASTILHO, T. M.; PARK, E. et al. TLR1/2 activation during heterologous prime-boost vaccination (DNA-MVA) enhances CD8+ T Cell responses providing protection against Leishmania (Viannia). *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 5, n. 6, e1204, 2011.
- KANNEGANTI, T.; LAMKANFI, M.; NÚÑEZ, G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity*, v. 27, n. 4, p. 549-559, 2007.
- KARMAKAR, S.; BHAUMIK, S. K.; PAUL, J.; DE, T. TLR4 and NKT cell synergy in immunotherapy against visceral leishmaniasis. *PLoS Pathog.*, v. 8, n. 4, e1002646, 2012.
- KATHRANI, A.; HOUSE, A.; CATCHPOLE, B. et al. Polymorphisms in the TLR4 and TLR5 gene are significantly associated with inflammatory bowel disease in German shepherd dogs. *PLoS One*, v. 5, n. 12, e15740, 2010.
- KAVOOSI, G.; ARDESTANI, S. K.; KARIMINIA, A. The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to Leishmania major phosphoglycans (PGs). *Parasitology*, v. 136, n. 10, p. 1193-1199, 2009.
- KROPF, P.; FREUDENBERG, M. A.; MODOLELL, M. et al. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite Leishmania major. *Infect. Immun.*, v. 72, n. 4, p. 1920-1928, 2004.
- KUROKI, K.; STOKER, A. M.; SIMS, H. J.; COOK, J. L. Expression of Toll-like receptors 2 and 4 in stifle joint synovial tissues of dogs with or without

- osteoarthritis. *Am. J. Vet. Res.*, v. 71, n. 7, p. 750-754, 2010.
- LEE, C. C.; AVALOS, A. M.; PLOEGH, H. L. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 12, n. 3, p. 168-179, 2012.
- LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. TLR9 signaling is essential for the innate NK cell response in murine cutaneous leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.*, v. 37, n. 12, p. 3424-3434, 2007.
- LISSNER, C. R.; SWANSON, R. N.; O'BRIEN, A. D. Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium*: expression of the *Ity* gene in peritoneal and splenic macrophages isolated in vitro. *J. Immunol.* v. 131, p. 3006-3013, 1983.
- LIVAK, J.; SCHMITTGEN, D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LOPES, E. G. P. *Distribuição temporal e espacial da leishmaniose visceral em humanos e cães em Belo Horizonte-MG, 1993 a 2007*. 2009. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MAURICIO, I.L.; HOWARD, M.K.; STOTHARD, J.R. et al. Genetic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*, v. 119, p. 237-246, 1999.
- MCMAHON, L. A.; HOUSE, A. K.; CATCHPOLE, B. et al. Expression of Toll-like receptor 2 in duodenal biopsies from dogs with inflammatory bowel disease is associated with severity of disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 135, n. 1-2, p. 158-163, 2010.
- MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, v. 388, n. 6640, p. 394-397, 1997.
- MERCIER, E.; PETERS, I. R.; DAY, M. J. et al. Toll- and NOD-like receptor mRNA expression in canine sino-nasal aspergillosis and idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 145, n. 3-4, p. 618-624, 2012.
- MUIR, P.; SCHAEFER, S. L.; MANLEY, P. A. et al. Expression of immune response genes in the stifle joint of dogs with oligoarthritis and degenerative cranial cruciate ligament rupture. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 119, n. 3-4, p. 214-221, 2007.
- MURAILLE, E.; DE TREZ, C.; BRAIT, M. et al. Genetically resistant mice lacking MyD88-adaptor protein display a high susceptibility to *Leishmania major* infection associated with a polarized Th2 response. *J. Immunol.*, v. 170, n. 8, p. 4237-4241, 2003.
- OKUI, Y.; KANO, R.; MARUYAMA, H. et al. Cloning of canine Toll-like receptor 7 gene and its expression in dog tissues. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 121, n. 1-2, p. 156-160, 2008.
- PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; DAY, M. J. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasit. Vectors*, v. 4, p. 197, 2011.
- PAUL, J.; KARMAKAR, S.; DE, T. TLR mediated distinct IFN- $\gamma$ /IL-10 pattern induces protective immunity against

- murine visceral leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.*, v. 42, n.8, p. 2087-2099, 2012.
- PAUN, A.; BANKOTI, R.; JOSHI, T. et al. Critical role of IRF-5 in the development of T helper 1 responses to *Leishmania donovani* infection. *PLoS Pathog.*, v. 7, n. 1, e1001246, 2011.
- PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 8, p. 151-156, 1989.
- QUINNELL, R. J.; KENNEDY, L. J.; BARNES, A. et al. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics*, v. 55, n. 1, p. 23-28, 2003.
- REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 128, n. 1-3, p. 87-95, 2009.
- SAFAIYAN, S.; BOLHASSANI, A.; NYLEN, S. et al. Contribution of human neutrophils in the development of protective immune response during in vitro *Leishmania major* infection. *Parasite Immunol.*, v. 33, n. 11, p. 609-620, 2011.
- SANCHEZ-ROBERT, E.; ALTET, L.; UTZET-SADURNI, M. et al. *Slc11a1* (formerly *Nramp1*) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. *Vet. Res.*, v. 39, n. 3, p. 36, 2008.
- SARIDOMICHELAKIS, M. N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: epidemiologic and diagnostic implications. *Vet. Dermatol.*, v. 20, n. 5-6, p. 471-489, 2009.
- SCHLEICHER, U.; LIESE, J.; KNIPPERTZ, I. et al. NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. *J. Exp. Med.*, v. 204, n. 4, p. 893-906, 2007.
- SILVA, E. S.; ROSCOE, E. H.; ARRUDA, L. Q. et al. Leishmaniose visceral canina: estudo clínico-epidemiológico e diagnóstico. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.23, n.3, p.111-116, 2001.
- SILVA, E.; LEITÃO, S.; HENRIQUES, S. et al. Gene transcription of TLR2, TLR4, LPS ligands and prostaglandin synthesis enzymes are up-regulated in canine uteri with cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex. *J. Reprod. Immunol.*, v. 84, n. 1, p. 66-74, 2010.
- SOUZA, T. D.; TURCHETTI, A. P.; FUJIWARA, R. T.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Visceral leishmaniasis in zoo and wildlife. *Vet. Parasitol.*, 2014, in press (DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.12.025).
- SRIVASTAVA, A.; SINGH, N.; MISHRA, M. et al. Identification of TLR inducing Th1-responsive *Leishmania donovani* amastigote-specific antigens. *Mol. Cell. Biochem.*, v. 359, n. 1-2, p. 359-368, 2012.
- SWERDLOW, M. P.; KENNEDY, D. R.; KENNEDY, J. S. et al. Expression and function of TLR2, TLR4, and Nod2 in primary canine colonic epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 114, n. 3-4, p. 313-319, 2006.
- TOMAZ-SOCCOL, V.; CASTRO, E. A.; NAVARRO, I. T. et al. Allochthonous cases of canine visceral leishmaniasis in Paraná, Brazil: epidemiological implications. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 18, n. 3, p. 46-51, 2009.

TURIN, L.; RIVA, F. Toll-like receptor family in domestic animal species. *Crit. Rev. Immunol.*, v. 28, n. 6, p. 513-538, 2008.

VIANA, L. G.; ASSIS, T. S.; ORSINI, M. et al. Combined diagnostic methods identify a remarkable proportion of asymptomatic *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi carriers who present modulated

cytokine profiles. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 102, n. 6, p 548-555, 2008.

VIDAL, S.; TREMBLAY, M. L.; GOVONI, G. et al. The *Ity/Lsh/Bcg* locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. *J. Exp. Med.*, v. 182, n. 3, p. 655-666, 1995.

## 9. ANEXOS

### 9.1. Soluções

- Acetato de amônio 7 M

Acetato de amônio	57,75 g
Água Milli-Q q.s.p.	100 mL

- Clorofórmio 2-pentanol

Clorofórmio	96 mL
Álcool isopropílico	4 mL

- EDTA 0,5 M

EDTA	18,61 g
Água Milli-Q q.s.p.	100 mL
pH 8	

- Formaldeído 12,3 M

Formaldeído	41 mL
Água Milli Q tratada com DEPC q.s.p.	50 mL

- Isotono

Ácido cítrico	2,1 g
Cloreto de sódio (NaCl)	1,4 g
Formol PA	1 mL
Água destilada q.s.p.	200 mL

- PBS

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> bibásico	1,09 g
NaHPO <sub>4</sub> monobásico	0,32 g
NaCl	9 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL
pH entre 7,2 e 7,4	

- PBS para Elisa R & D Systems

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> bibásico	2,1708 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> monobásico	0,204 g
NaCl	7,946 g
KCl	0,2025 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL
pH entre 7,2 e 7,4	



- Reagente diluente

BSA	1 g
PBS	100 mL
pH entre 7,2 e 7,4	

- RPMI completo

RPMI	500 mL
Glutamina	5,5 mL
Aminoácidos não essenciais	5,5 mL
Piruvato	5,5 mL
Bicarbonato de sódio	12 mL
Penicilina/estreptomicina	5,5 mL
Soro fetal bovino inativado	50 mL

- Sarcosyl 10 %

N-Lauroylsarcosine sodium salt	10 g
Água Milli-Q q.s.p.	100 mL

- Solução de bloqueio (PBSC)

Caseína	20 g
PBS	1000 mL

- Solução de extração

Tiocionato de guanidina	30 g
EDTA 0,5 M pH 8	10 mL
Sarcosyl 10%	2,5 mL
Água Milli-Q q.s.p.	50 mL

- Solução de lavagem (PBS-tween)

PBS	1000 mL
Tween 20	0,5 mL
pH entre 7,2 e 7,4	

- Solução de revelação

OPD	0,02 g
Tampão citrato	30 mL
Peróxido de hidrogênio	12 µL

- Solução substrato

Tetrametilbenzidina	10 mL
Água oxigenada	10 mL

- Tampão carbonato (tampão de ligação)

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (carbonato de sódio)	1,59 g
NaHCO <sub>3</sub> (bicarbonato de sódio)	2,93 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL
pH 9,6, conservar a 4°C	

- Tampão citrato (tampão substrato)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (fosfato de sódio bibásico)	7,19 g
Ácido cítrico	5,19 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL
pH 5, conservar a 4°C	

- Tampão de corrida

EDTA 0,5 M pH 8	20 µL
Azul de bromofenol	0,025 g
Xileno cianol	0,025 g
Glicerol	5 mL
Água Milli Q tratada com DEPC q.s.p.	10 mL

- Tampão de lise de hemácias

Tris base	0,20587 g
Cloreto de amônio	0,77 g
Água Milli Q q.s.p.	100 mL

- Tampão MOPS (10x)

Acetato de sódio	6,804 g
EDTA	1,8612 g
MOPS	57,8 g
Água Milli Q tratada com DEPC q.s.p.	500 mL
pH 7	

- Tampão TBE

Tris base	10,8 g
Ácido bórico	5,5 g
EDTA	0,744 g
Água destilada q.s.p.	1000mL

- Tampão TE

Tris HCl 1 M pH 8	1 mL
EDTA 0,5 M pH 8	0,2 mL
Água Milli-Q q.s.p.	100 mL

- Tris HCl 1 M

Tris base  
Água Milli-Q q.s.p.  
pH 8

6,055 g  
50 mL

## 9.2. Certificado do CETEA



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

### CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 140/2009**, relativo ao projeto intitulado "**Pesquisa de doenças canina - Resistência a Leishmaniose**", que tem como responsável(is) **Renato de Lima Santos**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **23/ 09/2009**.

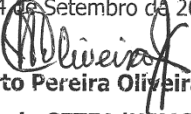
Este certificado expira-se em **23/ 09/ 2014**.

### CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 140/2009**, related to the project entitled "**Dog disease research - Resistance to Leishmaniosis**", under the supervisors of **Renato de Lima Santos**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **September 23, 2009**.

This certificate expires in **September 23, 2014**.

Belo Horizonte, 24 de Setembro de 2009.

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

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

(Mod.Cert. v1.0)