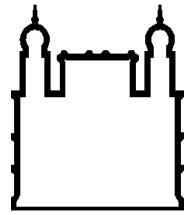




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ISOTIPOS DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania* NO SORO E  
EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO BAÇO DE CÃES  
NATURALMENTE INFECTADOS com *Leishmania infantum***

**JULIANA COELHO SANTOS**

**SALVADOR – BAHIA – BRASIL  
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ISOTIPOS DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania* NO SORO E  
EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO BAÇO DE CÃES  
NATURALMENTE INFECTADOS com *Leishmania infantum***

**JULIANA COELHO SANTOS**

Orientador: Washington Luis Conrado dos Santos

Dissertação apresentada para  
obtenção do grau de Mestre em  
Patologia, área de concentração  
em Patologia Experimental

**SALVADOR – BAHIA – BRASIL  
2014**

ISOTIPOS DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania* NO SORO E  
EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO BAÇO DE CÃES NATURALMENTE  
INFECTADOS com *Leishmania infantum*

JULIANA COELHO SANTOS

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Dr. Daniel Abensur Athanzio  
Professor Associado I  
UFBA

---

Dr. Sérgio Marcos Arruda  
Pesquisador Titular  
CPqGM/FIOCRUZ

---

Dr. Washinton Luis Conrado dos Santos  
Professor Titular  
CPqGM/FIOCRUZ

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S237i	<p>Santos, Juliana Coelho Isotipos de anticorpos anti-<i>Leishmania</i> no soro e expressão de citocinas no baço de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> / Juliana Coelho Santos. - 2014. 120 f. : il. ; 30 cm.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2015.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Washington Luis Conrado dos Santos, Laboratório de Patologia e Biointervenção.</p> <p>1. Leishmaniose visceral canina. 2. Citocinas. 3. <i>Leishmania infantum</i>. 4. Imunidade. 5. Cães. I.Título.</p>
	CDU 599.742.1

*“Todo mundo ama um dia, todo mundo chora,  
Um dia a gente chega, no outro vai embora  
Cada um de nós compõe a sua história,  
e cada ser em si, carrega o dom de ser capaz,  
e ser feliz”.*

*(Tocando em Frente - Almir Sater/Renato Teixeira)*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu a MINHA mãe, o perfume das rosas e meu orientador...

Às minhas enciclopédias andantes tio Henrique e tia Lulu, sempre tirando todas as minhas dúvidas e me mostrando rotas de vida tão magníficas que jamais ousei sonhar... passando de barco pela filosofia de vida cubana e a pé pela música de Johann Pachelbel.

Ao meu amigo Paulo Antônio, funcionário dos Correios (agência Brejões-Ba) pelo orgulho estampado em seu rosto em ter uma amiga “doutora”. Mesmo que ainda não lhe tenha dito, poderá me chamar para sempre de “amiga”.

Ao meu amigo e orientador Dr. Washington Luis Conrado dos Santos por me aceitar sempre, mesmo com nossos gênios antagônicos, conseguindo perceber em mim uma eterna ansiedade e ávida busca por conhecimento. Ele sempre me entendia (ou fingia), e, nos momentos certos, me ajudava, cuidava e zelava como um verdadeiro pai. Ao senhor, com meu eterno carinho, MUITO OBRIGADO.

A Dr. Geraldo Gileno, Dr. Lain Pontes de Carvalho e Lenita Ramires, pela valiosa e especial contribuição com todo esse trabalho.

A Dra. Marilda Gonçalves, pela ajuda inestimável com a parte de biologia molecular. Tive o prazer de descobrir em Marilda uma amiga criança, conselheira divertidíssima e amante de desenhos animados.

A três boas pessoas que permaneceram ao meu lado como verdadeiros anjos durante meu trabalho, Elivani Jesus, Micely Hermida e Carolina Baleeiro, pela valiosa colaboração prática, apoio espiritual e pelo carinho a mim sempre dispensado.

A Tiana Baqueiro e Joilson Ramos de Jesus pela contribuição dada na padronização da técnica de ELISA para IgE e freqüentes atualizações a respeito da vida animal em Valença.

Aos amigos do velho LIMC (atual LPBI) tão pacientes e atenciosos por agüentarem meus risos e gritos, choros e bravas reclamações, sempre em disparada pelos corredores. Eu sempre os compensei fazendo o cafezinho da tarde.

Aos amigos do antigo LPBC (atual LPBI) pelo suporte e amizade. Em especial a Dr. Luis Freitas e a doce Dra. Patrícia Veras.

A Dra. Sônia Andrade que se fez uma maravilhosa amiga em horas intermináveis de conversa.

Aos colegas do mestrado pelo incentivo e ajuda em momentos tão difíceis. Meu carinho especial a Juliana Perrone, Jorge Nihei e Paulo Melo.

À turma da pós-graduação, Rosália, Mara e Roberta, que nunca faziam cara feia quando eu ia lá umas cem vezes no dia.

A Ana Maria Fiscina e Athanael pela ajuda na composição e finalização dos trabalhos.

Aos amigos da informática pela atenção imediata, ajuda eficiente e constante além dos deliciosos momentos de companhia gratuita. Meu obrigado a Luiz, Aldérico, Chris e Hugo.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1	O PARASITO E A DOENÇA .....	14
2.2	DADOS EPIDEMIOLÓGICOS .....	15
2.3	ACHADOS CLÍNICOS NO CÃO COM LEISHMANIOSE VISCERAL .....	16
2.4	TESTES DIAGNÓSTICOS E PERFIS DE SUSCEPTIBILIDADE E RESISTÊNCIA NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA .....	17
2.4.1	Exames parasitológicos.....	17
2.4.2	Testes imunológicos .....	18
2.4.2.1	<i>Reações sorológicas</i> .....	18
2.4.2.2	<i>Reação de hipersensibilidade tardia</i> .....	19
2.5	REGULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	20
2.6	MARCADORES DE SUSCEPTIBILIDADE E RESISTÊNCIA NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA .....	23
2.6.1	Atividade da infecção e susceptibilidade na leishmaniose visceral canina .....	23
2.6.2	Sorologia e susceptibilidade na leishmaniose visceral canina.....	24
2.6.3	Teste cutâneo da Leishmanina e susceptibilidade na leishmaniose visceral canina .....	25
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	27
3.1	OBJETIVO GERAL .....	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>4</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	28
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
5.1	ANIMAIS E ESPÉCIMES .....	30
5.2	PRODUÇÃO DE ANTÍGENO DE <i>LEISHMANIA</i> .....	30
5.3	TESTE CUTÂNEO DA LEISHMANINA .....	31
5.4	CULTURA ESPLÊNICA PARA A DETECÇÃO DE PARASITOS NO BAÇO.....	32



5.5	DISTRIBUIÇÃO DE IMUNOGLOBULINA IGG1, IGG2A E IGE CONTRA <i>LEISHMANIA</i> NOS SOROS DOS CÃES.....	33
5.6	RT-PCR PARA MENSURAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO BAÇO .....	35
5.6.1	Animais utilizados para a mensuração de citocinas no baço .....	35
5.6.2	Extração de Rna .....	36
5.6.3	Reação de transcrição reversa (RT).....	37
5.6.4	Reação da polimerase em cadeia (PCR) .....	38
5.7	EXPRESSÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	41
<b>6</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
6.1	ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS IGG1, IGG2 E IGE CONTRA <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> NOS SOROS DOS CÃES .....	43
6.1.1	Características da população estudada.....	43
6.1.2	IgG1 .....	44
6.1.3	IgG2 .....	45
6.1.4	IgE.....	46
6.2	EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO BAÇO ATRAVÉS DE RT-PCR .....	47
6.2.1	Expressão de IFN- $\gamma$ em tecido esplênico .....	48
6.2.2	Expressão de IL-4 em tecido esplênico .....	49
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>57</b>
<b>9</b>	<b>COMENTÁRIOS .....</b>	<b>58</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>59</b>
	<b>ANEXOS – Artigos produzidos durante o mestrado .....</b>	<b>62</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
APC	Célula apresentadora de antígenos
Con A	Concanavalina A
dATP	2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	Deoxicitidina 5'-trifosfato
dDTT	2'-deoxitimidina 5'-trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbono
dGTP	Adenosina 5'-trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTP	Dinucleotídeo tri-fosfato
DO	Densidade óptica
dTTP	2'-deoxitimidina 5'-trifosfato
HPRT	Hipoxantina-ribosil-transferase
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IgG1	Imunoglobulina G subclasse 1
IgG2	Imunoglobulina G subclasse 2
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
MAC	Complexo de ataque à membrana
NK	Células matadoras naturais
NO	Óxido nítrico
NPGB	Nitrofenol-p-guanidino benzoato
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoreto
RNA	Ácido ribonucléico
TCL	Teste cutâneo da Leishmanina
Th1	Células T <i>helper</i> 1
Th2	Células T <i>helper</i> 2
TLCK	Nap-tosil-L-lisina-clorometilcetona
TMB	Tetra-metil-benzidina
TNF	Fator de necrose tumoral

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 01</b>	Cão com leishmaniose visceral	06
<b>Figura 02</b>	Teste cutâneo da Leishmanina adaptado para cães	22
<b>Figura 03</b>	Controle dos experimentos para expressão da mensagem de IFN- $\gamma$	31
<b>Figura 04</b>	Controle dos experimentos para mensagem da expressão de IL-4	32
<b>Figura 05</b>	Distribuição de IgG1 sérica anti- <i>Leishmania</i> em animais de uma área endêmica de leishmaniose visceral	36
<b>Figura 06</b>	Distribuição de IgG2 sérica anti- <i>Leishmania</i> em animais de uma área endêmica de leishmaniose visceral	37
<b>Figura 07</b>	Distribuição de IgE sérica anti- <i>Leishmania</i> em animais de uma área endêmica de leishmaniose viscera	39
<b>Figura 08</b>	Expressão de IFN- $\gamma$ segundo HPRT	42
<b>Figura 09</b>	Expressão de IL-4 segundo HPRT	43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b>	Distribuição dos grupos de animais não infectados ou naturalmente infectados testados para distribuição de isotipos de imunoglobulinas anti- <i>L.chagasi</i> no soro	24
<b>Tabela 02</b>	Grupos polares de animais selecionados para mensuração de citocinas através de RT-PCR	26
<b>Tabela 03</b>	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos experimentos de semi-quantificação das mensagens para IFN- $\gamma$ e IL-4 em baços de cães	29
<b>Tabela 04</b>	Características gerais dos grupos de cães de uma área endêmica para leishmaniose visceral, classificados conforme a resposta a <i>L. chagasi</i> no teste cutâneo da Leishmanina (TCL) e a presença de parasitismo esplênico	35
<b>Tabela 05</b>	Características gerais de grupos de cães de uma área endêmica para leishmaniose visceral, classificados em grupos polares de resposta a <i>L. chagasi</i> conforme o teste cutâneo da Leishmanina (TCL) e a presença de parasitismo esplênico	40

SANTOS, Juliana Coelho. Isotipos de anticorpos anti-*Leishmania* no soro e expressão de citocinas no baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. 120 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

## RESUMO

Neste estudo foi analisada a distribuição de isotipos de imunoglobulinas IgG1, IgG2 e IgE envolvidas na resposta a *Leishmania* no soro e a expressão de mRNA para IFN- $\gamma$  e IL-4 *in situ* no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum* com diferentes perfis de susceptibilidade ou resistência à doença. A atividade sérica de anticorpos do isotipo IgG1 contra *Leishmania* tendeu a ser maior nos animais com teste cutâneo da Leishmanina negativo e com parasitismo esplênico (grupo *infectado potencialmente susceptível*,  $0,424\pm 0,401$ ) que nos outros grupos: com teste cutâneo da Leishmanina positivo e ausência de parasitismo esplênico (grupo *infectado potencialmente resistente*,  $0,226\pm 0,114$ ), ou com ambos teste cutâneo da Leishmanina e cultura esplênica positivos (grupo *em fase indeterminada da doença*,  $0,234\pm 0,125$ ) ou com ambos os parâmetros negativos (grupo *potencialmente não infectado*,  $0,159\pm 0,044$ ). Essa diferença não foi, contudo estatisticamente significativa (ANOVA,  $P=0,1450$ ). IgG2 específica anti-*Leishmania* foi maior (ANOVA  $P=0,0001$ ) no grupo *infectado potencialmente susceptível* ( $1,324\pm 0,322$ ) que nos demais grupos: *em fase indeterminada da doença* ( $0,930\pm 0,383$ ,  $P=0,05$ ), *infectado potencialmente resistente* ( $0,916\pm 0,401$ ,  $P=0,05$ ) e *potencialmente não infectado* (média  $0,299\pm 0,151$ ,  $P=0,001$ ). Foi também maior nos grupos *infectado potencialmente resistente* e *com infecção em fase indeterminada* que no grupo de animais *potencialmente não infectado*. Não houve diferenças entre os grupos (ANOVA  $p=0,4$ ) nos resultados séricos de IgE anti-*Leishmania*; o grupo potencialmente susceptível ( $0,749\pm 0,485$ ) tendeu a apresentar valores médios mais elevados que os grupos *potencialmente resistente* ( $0,518\pm 0,161$ ), ou com doença *em fase indeterminada* (média  $0,591\pm 0,331$ ) ou *potencialmente não infectados* ( $0,530\pm 0,121$ ), essas diferenças foram intensificadas pela alta atividade de anticorpos do isotipo IgE anti-*Leishmania* em um dentre os 11 animais examinados, não sendo estatisticamente significativa (ANOVA,  $P=0,4668$ ). Não foram observadas diferenças na expressão de mRNA para IFN- $\gamma$  e IL-4 no baço de animais não infectados ou naturalmente infectados com *L. infantum* com (a) teste cutâneo da Leishmanina positivo e cultura esplênica negativa ou com (b) teste cutâneo da Leishmanina negativo e parasitismo esplênico. Observou-se uma preponderância de anticorpos da subclasse IgG2 em animais com parasitismo esplênico independente da resposta ao teste cutâneo da Leishmanina. Tais resultados sugerem que a polarização da resposta imune a *Leishmania* pode variar em diferentes compartimentos como sangue e baço.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina, regulação imune, *Leishmania infantum*.

SANTOS, Juliana Coelho Isotypes of anti-*Leishmania* antibodies in serum and cytokine expression in the spleen of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. 120 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

## ABSTRACT

We analyzed the distribution immunoglobulin isotypes IgG1, IgG2 and IgE involved in the response to *Leishmania* and the mRNA expression for IFN- $\gamma$  and IL-4 *in situ* in the spleen of dogs naturally infected with IgG1 antibody anti-*Leishmania* serum activity was higher in animals with negative Leishmanin skin test and splenic parasitism (infected and potentially susceptible to VL group,  $0,424\pm 0,401$ ) than in other groups: positive Leishmanin skin test and negative splenic parasitism (infected and potentially resistant to VL group,  $0,226\pm 0,114$ ), or both positive Leishmanin skin test and splenic parasitism (infected with undefined susceptibility status group,  $0,234\pm 0,125$ ) or both negative parameters (non-infected group,  $0,159\pm 0,044$ ). This difference however was not statistically significant (ANOVA,  $P=0,145$ ). Specific IgG2 anti-*Leishmania* was higher (ANOVA  $P=0,0001$ ) in infected and potentially susceptible to VL group ( $1,324\pm 0,322$ ) than in the other groups: infected with undefined susceptibility status ( $0,930\pm 0,383$ ,  $P=0,05$ ), infected and potentially resistant to VL ( $0,916\pm 0,401$ ,  $P=0,05$ ) and non infected group ( $0,299\pm 0,151$ ,  $P=0,001$ ). Was also higher in infected and potentially resistant to VL and infected with undefined susceptibility status groups than in group of non-infected animals. There was no significant differences (ANOVA  $p=0,4$ ) between different groups in seric IgE anti-*Leishmania*, infected and potentially susceptible to VL group ( $0,749\pm 0,485$ ) showed media higher than in infected and potentially resistant to VL group ( $0,518\pm 0,161$ ), or in infected with undefined susceptibility status group ( $0,591\pm 0,331$ ) or non-infected group ( $0,530\pm 0,121$ ), these differences were intensified for the higher IgE antibody activity in one between 11 examined animals, although this was not statistically significant (ANOVA,  $P=0,4668$ ). There was no difference in IL-4 or IFN- $\gamma$  mRNA expression in the spleen among groups of animals non-infected or naturally infected with *L. infantum*, with (a) strong LST and negative spleen culture for the parasite or with (b) negative LST and parasite in the spleen We could observe an interesting preponderance of antibodies from the IgG2 class in animals with splenic parasitism independently of the LST response. Our results suggest that the polarity of immune response to *Leishmania* may vary in different compartments such as blood and spleen.

Key words: Visceral canine leishmaniasis, immune regulation, *Leishmania infantum*.

## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma zoonose de distribuição mundial, causada no Brasil por um protozoário da espécie *Leishmania (infantum) chagasi* (LAINSON e SHAW, 1978; MENDES *et al.*, 2003), tendo o *Canis familiaris* como seu principal reservatório doméstico (ALENCAR, 1959).

A resistência à leishmaniose está ligada a uma resposta imune celular tipo Th1 (MURRAY e HARIPRASHAD, 1995; HEUFLER *et al.*, 1996; GAZZINELLI *et al.*, 1993), na qual são produzidas citocinas como o IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-2 e TNF- $\alpha$  (SANTOS-GOMES *et al.*, 2002), que são responsáveis por estimular a atividade microbicida dos fagócitos mononucleares, ativar células NK, induzir a produção de anticorpos opsonizantes (LEANDRO *et al.*, 2001), a diferenciação de linfócitos T CD4+ em células Th1 e suprimir a resposta imune do tipo Th2 (TRINCHIERI, 1993).

A instalação de um quadro clínico-patológico de leishmaniose visceral (LV) parece estar associada a uma resposta do tipo Th2 (MURRAY e HARIPRASHAD, 1995; BOGDAN e RÖLLINGHOFF, 1998) com produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10 (BOGDAN e RÖLLINGHOFF, 1998; PINELLI *et al.*, 1995). A produção de anticorpos IgG1 em cães (DEPLAZES *et al.*, 1995) e IgE em humanos (ATTA *et al.*, 1998) também parece estar associada com o desenvolvimento da doença.

Nesse trabalho examinamos o perfil de distribuição dos isotipos IgG1, IgG2 e IgE dos anticorpos anti-*Leishmania* no soro de cães não infectados ou naturalmente infectados com *L. infantum* e o padrão da produção de IFN- $\gamma$  e IL-4 no baço de grupos de animais com perfil de susceptibilidade ou resistência à enfermidade usando técnica de Transcrição Reversa (RT) do RNA seguida da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O PARASITO E A DOENÇA

A leishmaniose visceral é causada por um protozoário da ordem Kinetoplastida, família Tripanossomatidae, gênero *Leishmania*. Há duas formas da enfermidade, uma antroponótica (circula entre seres humanos) e outra zoonótica (acomete seres humanos e outros vertebrados). A forma antroponótica da leishmaniose visceral ocorre na Ásia e partes da África. O agente causal é a *Leishmania donovani* (KONTOS e KOUTINAS, 1993). A forma zoonótica ocorre na Europa, Oriente Médio, partes da África e nas Américas. A espécie associada a esta forma da doença é a *Leishmania infantum* (região do Mediterrâneo e outras partes da África e da Ásia) ou *Leishmania chagasi* (Novo Mundo) (KONTOS e KOUTINAS, 1993). Há evidências de que *L. chagasi* e *L. infantum* constituem uma mesma espécie (MAURICIO *et al.*, 2000; 2001), tendo sido provavelmente, introduzida nas Américas a partir da colonização luso-espanhola. O parasito apresenta duas formas principais durante seu ciclo evolutivo: amastigota, forma intracelular, existente em hospedeiros vertebrados e promastigota, forma existente no tubo digestivo dos hospedeiros invertebrados ou em meios de cultura, sendo transmitido por pequenos insetos do gênero *Lutzomyia* nas Américas ou do gênero *Phlebotomus* na Europa (KONTOS e KOUTINAS, 1993).

A infecção do hospedeiro intermediário ocorre pela ingestão, durante o repasto sanguíneo, de formas amastigotas da *Leishmania* existentes no citoplasma de macrófagos presentes na pele do hospedeiro vertebrado ou no sangue circulante (KONTOS e KOUTINAS, 1993). Uma vez no tubo digestivo do inseto, as formas amastigotas transformam-se em promastigotas, que se multiplicam e, após três a quatro dias, as fêmeas



podem transmitir o parasito. Durante novo repasto sanguíneo ocorre a inoculação de formas promastigotas que se transformam em amastigotas e multiplicam em macrófagos, fechando o ciclo de transmissão (MONTROYA-LERMA *et al.*, 2003).

Os hospedeiros definitivos da *Leishmania* são mamíferos, dentre os quais os mais importantes são os canídeos, especialmente cães domésticos (*Canis familiaris*) e raposas (*Dusycion vetulus*) (ABRANCHES *et al.*, 1991; FUNASA, 2003). É possível que seres humanos sejam, na verdade, hospedeiros ocasionais, que contraem a doença através da picada do flebotomíneo infectado previamente, durante o repasto em canídeos (KONTOS e KOUTINAS, 1993). Outros hospedeiros menos comuns são gatos, esquilos e chacais (ALENCAR, 1959).

## 2.2 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

A leishmaniose visceral é endêmica em 88 países, cerca de 90% dos casos ocorrem em Bangladesh, Índia, Sudão e Brasil. Por ano cerca de 500.000 novos casos de VL são reportados em todo o mundo (DESJEUX, 1996). No Novo mundo, o Brasil ocupa o primeiro lugar em número de casos de leishmaniose visceral, com cerca de 3.500 casos por ano. A região Nordeste tem apresentado maiores índices de endemicidade, cerca de 66% dos casos. Nesta região o estado da Bahia ocupa o segundo lugar em ocorrência de casos de leishmaniose visceral (SVS-DASIS 2004), tendo apresentado 2.284 casos da doença entre 2000 e 2004 (FUNASA 2003; SVS-DASIS 2003; SVS-DASIS 2004). Este panorama tende, contudo, a ser alterado pela expansão da doença para centros urbanos e áreas rurais anteriormente livres da doença, nas regiões Sudeste (SILVA, *et al.*, 2001; FRANCA-SILVA *et al.*, 2003) e Centro-oeste (CORTADA *et al.* 2004). Somente o estado de Santa Catarina está livre da doença, enquanto o Paraná, o Rio Grande do Sul e o Distrito Federal, que eram zonas livres de LV, já identificaram seus primeiros casos (SVS-DASIS, 2004).

No Brasil, (PARANHOS-SILVA *et al.*, 1996; AGUILAR *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2001; CABRERA *et al.*, 2003) como em outras partes do mundo (AGUILAR *et al.*, 1998), a infecção canina apresenta distribuição superponível à humana. Com base nessa observação e em outros elementos como o desenvolvimento de intenso parasitismo na pele nas fases tardias da doença (DEANE e DEANE, 1955) e a capacidade de eficientemente transmitir a infecção a flebotomíneos (COURTENAY *et al.*, 2002; TRAVI *et al.*, 2001), cães têm sido considerado mais que hospedeiros definitivos; como principais reservatórios urbanos da *L. (chagasi) infantum*. Essa idéia tem colocado os cães como elementos centrais na disseminação e controle da leishmaniose visceral e a leishmaniose visceral canina como real problema de saúde pública.

### 2.3 ACHADOS CLÍNICOS NO CÃO COM LEISHMANIOSE VISCERAL

As principais alterações clínicas observadas na LVC são atrofia muscular, caquexia, anemia, dermatite exfoliativa, onicogribose, eritema, despigmentação e/ou hiperkeratose nasal e interdigital, linfadenomegalia, perifoliculite, hipertermia, hepatoesplenomegalia, glomerulonefrite, queda acentuada de pêlos, prostração, vômito, diarreia, melena, epistaxe, cerato-conjuntivite, pneumonia e icterícia. (KONTOS e KOUTINAS, 1993; ABRANCHES *et al.*, 1991; GREENE, 1990; KEENAN *et al.*, 1984; BARROUIN-MELO *et al.*, 2004) (Fig. 01).



Figura 01: Cão com leishmaniose visceral apresentando acentuado emagrecimento, áreas com alopecia e ulceração em bordo de orelha além de opacificação da córnea.

## 2.4 TESTES DIAGNÓSTICOS E PERFIS DE SUSCEPTIBILIDADE E RESISTÊNCIA NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Além dos achados clínico-laboratoriais descritos anteriormente, testes parasitológicos, imunológicos e de biologia molecular são utilizados, correntemente, para o diagnóstico e para a definição de susceptibilidade ou resistência de cães à LV.

### 2.4.1 Exames parasitológicos

Inclui uma série de testes qualitativos ou semi-quantitativos cujo objetivo é evidenciar a existência ou intensidade do parasitismo. Entre as técnicas comumente utilizadas temos: O *exame direto* que consiste na visualização do parasito em tecidos obtidos de forma invasiva (como punções e *imprints* de biópsias). Podem ter uma

sensibilidade variando entre 60 e 98% (DUARTE, 2001). A *cultura*, realizada com o aspirado esplênico, de linfonodo ou medula óssea em meios específicos, usualmente bifásicos (SIDDIG *et al.*, 1988; BARROUIN-MELO *et al.*, 2004) e a *histopatologia* de baço, pele, linfonodos ou medula óssea que pode ter sensibilidade aumentada pelo uso de anticorpos específicos para *Leishmania* em imunoistoquímica (WILLIAMS, 1995). Uma série de estudos têm demonstrado correlação entre a presença de infecção ativa através de cultura esplênica (PARANHOS-SILVA *et al.* 2003; da SILVA *et al.*, 2000; BARROUIN-MELO *et al.*, 2006) e susceptibilidade na LVC. A aplicação de métodos semiquantitativos como técnicas de Stauber ou de diluição limitante (CASTRO-SOUSA *et al.*, 2001) podem melhorar a acurácia da determinação da atividade da infecção. Mais recentemente a utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem permitido amplificar pequenas quantidades de DNA do parasito (WILLIAMS, 1995). Estima-se que a técnica tenha 90% de sensibilidade e 100% de especificidade (QIAO *et al.*, 1995). Uma variação deste procedimento, a técnica de *Real-Time PCR*, permite a quantificação da carga parasitária (NICHOLAS *et al.*, 2002). Limitações inerentes ao uso dessas técnicas como custos dos reagentes e a aparelhagem necessária à sua execução tem restringindo seu uso a laboratórios de pesquisa.

#### 2.4.2 Testes imunológicos

##### 2.4.2.1 Reações sorológicas

O *ensaio imuno-enzimático indireto* (ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*) é um dos métodos diagnósticos mais difundidos, para a identificação de anticorpos específicos anti-*Leishmania* no soro, plasma ou eluatos de sangue de animais com suspeita diagnóstica de infecção pelo parasito (LEHTONEN e VILJANEN, 1980). Esta técnica

utiliza normalmente a fração solúvel de lisados do parasito, como antígeno. Esses antígenos são imobilizados em placas de microtitulação e co-incubados com diluições do soro ou eluatos, seguido de um anticorpo anti-imunoglobulinas de cão conjugado com fosfatase alcalina ou com peroxidase. A reação é revelada através de reações enzimáticas. Na *imunoflorescência indireta* (IFI), o parasito íntegro é fixado em lâmina e a reação antígeno-anticorpo é visualizada pelo uso de anticorpo anti-imunoglobulina conjugado a fluoresceína (WILLIAMS, 1995). O imuno-ensaio “*dipstick*” (Traldi) combina a técnica de “dot blotting” com o uso de partículas de corante coloidal ligada a anticorpo e visualização direta em uma fita reativa (SNOWDEN e HOMMEL, 1991). Além de funcionar como testes diagnósticos, os testes sorológicos tem sido também utilizados como marcadores de susceptibilidade na leishmaniose visceral humana e canina (PARANHOS-SILVA *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2005). Adaptações têm sido procedidas nesses testes, para melhorar o poder de discriminação entre infecção e doença. Dentre essas adaptações podemos citar: a utilização de frações antigênicas (de OLIVEIRA MENDES *et al.*, 2003), antígenos recombinantes (KUMAR *et al.*, 2001; SINGH *et al.*, 2002; PORROZZI *et al.*, 2007), ou distribuição de isotipos de imunoglobulinas (de OLIVEIRA MENDES *et al.*, 2003; NIETO *et al.*, 1999; ATTA *et al.*, 1998) em resposta a antígenos de *Leishmania*.

#### 2.4.2.2 Reação de hipersensibilidade tardia

Esse tipo de reação intradérmica segue um padrão visto anteriormente com alta especificidade para doenças como hanseníase e tuberculose. O teste consiste usualmente na injeção intradérmica de um lisado de *Leishmania* em veículo salino. O primeiro relato de uma reação celular intradérmica forte usando extrato de cultura de *Leishmania* foi feito por Montenegro (1926), com uma positividade de 86,5% em seres humanos com sinais clínicos

de infecção. O teste, originalmente baseado em antígenos de *L. braziliensis*, foi amplamente utilizado como um marcador diagnóstico em casos de leishmaniose cutâneo-mucosa clínica ou, posteriormente definido como um marcador de infecção sub-clínica (MORAL *et al.*, 2002) com *Leishmania* (revisto por Manson Bahr, 1959). A idéia de que, além de um marcador de infecção o teste de Montenegro poderia refletir aspectos da resposta imune do hospedeiro a *Leishmania* desenvolveu-se a partir da observação de que, ao contrario do que ocorria com pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa, pacientes com leishmaniose visceral apresentavam teste negativo, que tendia a positivar com a cura da doença (EL-SAFI *et al.*, 2002; MUSA *et al.*, 2002). Guarín *et al.* (2007) sugerem que a proporção de linfócitos CD4+ e CD8+, fagócitos mononucleares e granulócitos são semelhantes entre as lesões encontradas na leishmaniose aguda e crônica e as reações observadas na reação de Montenegro. Uma série de outros estudos têm associado essa hipersensibilidade cutânea a antígenos de *Leishmania* à resistência na leishmaniose visceral, por seres humanos e cães (MOLANO *et al.*, 2003; BORJA-CABRERA *et al.*, 2002). Essa hipótese tem sido reforçada por estudos que mostram uma associação entre esse tipo de reação intradérmica e uma resposta imune do tipo Th1, onde há geração predominante de células produtoras de interleucina 12, associada a proteção contra a leishmaniose (GAZZINELLI *et al.*, 1993).

## 2.5 REGULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE VISCERAL

A LVC é caracterizada por promover hiperplasia de células do sistema fagocítico mononuclear, especialmente no baço, fígado e medula óssea, nos quais os parasitos se multiplicam com maior frequência (CORBETT e LAURENTI, 1998).

Após a inoculação do parasito na pele, as formas promastigotas penetram nos macrófagos, transformando-se em amastigotas e multiplicam-se nos vacúolos parasitóforos. A interação entre os ligantes dos parasitos e os receptores celulares ocorre direta ou indiretamente, através de moléculas como C3b/C3bi ou fibronectina. A C3bi funciona como uma proteína opsonizante que facilita a ligação de promastigotas com o receptor de complemento tipo três dos macrófagos. As promastigotas se protegem da lise pelo complemento por vários mecanismos, entre eles a liberação do complexo de ataque à membrana (MAC) e inativação de fatores do complemento (BOGDAN e RÖLLINGHOFF, 1997).

A evolução e severidade da LV em mamíferos dependem da resposta imune do hospedeiro, especialmente do perfil de produção de citocinas (BARRAL-NETTO, 1992; KAYE *et al.*, 2004). Esse perfil de produção de citocinas varia conforme a constituição genética do indivíduo (KARPLUS *et al.*, 2002), e pode ser influenciado por fatores inerentes ao parasito (STREIT *et al.*, 2001), e outros fatores que interferem com a resposta imuno-inflamatória no sítio da inoculação. Como exemplo temos alguns produtos presentes na saliva do vetor (KAMHAWI, 2000; WARBURG *et al.*, 1994) e infecções concomitantes (SANTIAGO *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.* 2000).

Em modelos experimentais observa-se que a resistência à *Leishmania* está associada à ativação de células T CD4<sup>+</sup> do tipo Th1, com uma produção significativa de citocinas como IFN- $\gamma$  (STRAUSS-AYALI *et al.*, 2007) e IL-2, ambas dependentes do estímulo induzido por IL-12 (GAZZINELLI *et al.*, 1993; HEUFLER *et al.*, 1996; TRINCHIERI, 1993).

Carvalho *et al.* (1985), demonstraram que na doença humana ativa há uma produção menor de IL-12, IFN- $\gamma$  e IL-2 pelos linfócitos do sangue periférico estimulados *in vitro* com antígenos de *Leishmania*. Nos macrófagos, a capacidade leishmanicida está

provavelmente ligada à capacidade de produzir óxido nítrico (NO) em resposta ao estímulo com IFN- $\gamma$  (QADOUMI *et al.*, 2002; PINELLI *et al.*, 1999), produzido pelas células Th1 e pelas células NK.

A susceptibilidade a leishmaniose é usualmente associada à indução de uma resposta do tipo Th2 com produção de IL-4 (PINELLI *et al.*, 1995; STRAUSS-AYALI *et al.*, 2007) e de fatores capazes de desativar macrófagos (IL-10, TGF- $\beta$  e prostaglandina E<sub>2</sub>). Neste tipo de resposta também é induzida a diferenciação de células B para a produção de anticorpos das classes IgG1 (BOGDAN e RÖLLINGHOFF, 1997), IgE (ATTA *et al.*, 1998; MENDES *et al.*, 2003), IgA e IgM (RODRÍGUEZ-CORTÉS *et al.*, 2007). Dentre os fatores relacionados ao parasito que podem contribuir para a gênese deste tipo de resposta, temos (1) a alta taxa de infecção por *Leishmania*, que interfere na apresentação de antígenos aos linfócitos T e, conseqüentemente no curso da doença (SAHA *et al.*, 1995; PINELLI *et al.*, 1999); (2) substâncias como o lipofosfoglicano (LPG), um glicoconjugado da superfície da *Leishmania*, que promove efeitos inibitórios sobre as enzimas lipossomais e hidrolíticas das células hospedeiras (PRASHAD, 1999).

Tanto em seres humanos quanto em cães, o perfil de susceptibilidade na leishmaniose está associado à presença de sinais clínico-laboratoriais de doença incluindo baixa resposta imune celular (teste cutâneo da Leishmanina negativo e resposta linfoproliferativa baixa ou ausente) e presença de resposta imune humoral exacerbada (altos níveis de anticorpos anti-*Leishmania* no soro) (BITTENCOURT e BARRAL-NETTO, 1995).

Atualmente, o modelo de polarização Th1/Th2 da resposta imune na LV vem sendo questionado. A presença do parasito em macrófagos induz a produção do fator de necrose tumoral (TNF), que potencializa a ação do IFN- $\gamma$  e juntos promovem a ativação do macrófago. Através da técnica imunoenzimática de ELISPOT, Kaye *et al.* (2004) observaram que células murinas produtoras de IFN- $\gamma$  (considerado indicativo de uma



resposta imune protetora) e IL-4 (relacionada a susceptibilidade na leishmaniose) são encontradas em uma razão de aproximadamente 2-3:1, com variações relativas ao tempo e ao órgão dos animais infectados por *L. chagasi*. Aparentemente, em muitos sistemas utilizados para estudo da LV a relação dicotômica entre as respostas Th1 e Th2 e sua relação com doença ou resistência à enfermidade tem sido, na prática, difícil de ser mantida (KAYE *et al.*, 2004). Por exemplo, o principal marcador histopatológico no fígado de resistência às espécies de *Leishmania* que causam lesões viscerais é a presença de granulomas (MURRAY, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 1993). Granulomas maduros mostrando um halo extenso de células mononucleares podem ser observados ao redor das células de *Kupffer* que internalizaram amastigotas, mas parecem não conseguir ativar uma resposta inflamatória eficaz (KAYE *et al.*, 2003; dos-SANTOS *et al.*, 2004).

## 2.6 MARCADORES DE SUSCEPTIBILIDADE E RESISTÊNCIA NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Inúmeros marcadores têm sido propostos para definição da susceptibilidade ou resistência à leishmaniose em cães. Muitas dessas proposições têm sido baseadas em estudos desenvolvidos em outras espécies como camundongo ou homem, além de um limitado número de experimentos realizados em cães. A principal limitação do uso desses testes é a ausência de definições quanto à correspondência entre os resultados obtidos e o real estado de susceptibilidade ou proteção do cão contra a doença.

### 2.6.1 Atividade da infecção e susceptibilidade na leishmaniose visceral canina

A atividade do parasitismo em órgãos internos ou na pele, avaliados pelo isolamento de parasitos tem mostrado correlação com sinais clínicos de doença em cães

naturalmente ou experimentalmente infectados com *L. infantum chagasi* (PARANHOS-SILVA *et al.*, 2003; TRAVI *et al.*, 2001; BARROUIN-MELO *et al.*, 2006). Alguns autores, porém, têm demonstrado a presença de parasitismo esplênico em cães assintomáticos, durante a necropsia, associado por vezes a achados compatíveis com a presença de resposta imune celular (OLIVEIRA *et al.*, 1993). É possível que a punção não quantitativa do baço, medula óssea ou de linfonodo possa refletir apenas parcialmente a intensidade da infecção nesses órgãos. Na realidade, em condições de infecção subclínica, tem sido demonstrada a presença de parasitos nesses órgãos através de técnica de PCR, sendo as tentativas de isolamento do parasito consistentemente improdutivas (PARANHOS-SILVA *et al.*, 2003).

#### 2.6.2 Sorologia e susceptibilidade na leishmaniose visceral canina

Além do uso como marcador de infecção na LVC, a identificação de altos níveis de anticorpos específicos anti-*Leishmania* têm sido relacionada à atividade de parasitismo e a presença de sinais clínicos de doença (PARANHOS-SILVA *et al.*, 2003; BARROUIN-MELO *et al.*, 2006, SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2006; RIERA *et al.*, 1999; MARTINEZ-MORENO *et al.*, 1995). Na realidade, os testes sorológicos atualmente utilizados para diagnóstico de leishmaniose visceral canina, parecem exibir uma performance adequada para o diagnóstico de doença, mas inadequada para o diagnóstico de infecção em geral (COURTENEY *et al.*, 2002; ASHFORD *et al.*, 1995). Como parâmetro isolado, porém, o potencial da sorologia para definir o estado de susceptibilidade ou resistência na leishmaniose visceral canina não é conhecido. Fatores como infecção inicial (PARANHOS-SILVA *et al.*, 2003; COURTENEY *et al.*, 2002) podem influenciar o resultado dos testes. Ainda que altos níveis séricos de anticorpos anti-*Leishmania* no soro dos animais tenham sido associados a susceptibilidade, não há definição clara sobre

intensidades de reação que pudessem separar infecções clínicas de sub-clínicas. Tentativas de melhorar a sensibilidade dos testes sorológicos na definição de infecção e doença têm sido feitas introduzindo-se antígenos purificados (de OLIVEIRA-MENDES *et al.*, 2003) ou recombinantes (SCALONE *et al.*, 2002), como substrato das reações e o exame do perfil de distribuição de imunoglobulinas (ALMEIDA *et al.*, 2005; de OLIVEIRA-MENDES *et al.*, 2003) produzidas em resposta a infecção por *Leishmania*. Os estudos examinando o perfil de distribuição de imunoglobulinas séricas parecem demonstrar um aumento da resposta por IgG1 em cães com doença ou evoluindo para doença (KUMAR *et al.*, 2001; NIETO *et al.*, 1999; DEPLAZES *et al.*, 1995). Essa informação não emerge, porém de maneira clara dos vários estudos. Recentemente, a utilização de anticorpos monoclonais anti-subclasses de imunoglobulinas caninas Quinnell *et al.* (2003) apresentaram resultados diferentes das tendências sugeridas nos outros estudos que utilizam anticorpos policlonais.

### 2.6.3 Teste cutâneo da Leishmanina e susceptibilidade na leishmaniose visceral canina

Embora o teste cutâneo da Leishmanina seja utilizado como indicador de infecção prévia com *Leishmania* e de proteção na leishmaniose visceral humana e canina, uma série de variáveis relativas aos testes necessita melhor definição. Por exemplo, não sabemos em que extensão o teste cutâneo da Leishmanina reflete, em cães, um estado de proteção. O ponto de corte para positividade, estabelecido em reações de 5 mm requer validação em cães, utilizando-se casuística mais ampla e testes estatísticos. Sobre a própria natureza da lesão definida como teste positivo: alguns autores têm considerado apenas áreas de induração (edema tenso, com bordos elevados passível de delimitação) como reação positiva (CARDOSO *et al.*, 1998; PARANHOS-SILVA *et al.*, 2001). Outros porém, consideram também áreas de hiperemia como representativo de resposta positiva

(SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2000). Em uma série de estudos recentemente desenvolvidos em nosso laboratório, Paranhos-Silva (tese), foi observado uma tendência ao teste de Montenegro associar-se com ausência de parasitismo esplênico e sinais de doença. Esta tendência não foi, contudo, confirmada por testes estatísticos. Na realidade, a intensidade da reação do teste de Montenegro *plotada* contra a frequência de parasitismo esplênico descreve uma curva de característica polinomial Paranhos-Silva (tese). Examinando-se reações com intensidade entre 5 e 9 mm observa-se uma correlação positiva entre a intensidade da reação a frequência de animais com parasitismo esplênico. Esses dados corroboram com as observações por da Silva e colaboradores (da SILVA *et al.*, 2000) que detectaram parasitismo por PCR, e sinais de doença em animais com áreas de induração variando entre 5 e 10 mm. Reações mais intensas porém, entre 10 e 14 mm, guardam uma associação inversa com a frequência de parasitismo esplênico. O número de animais naturalmente infectados com este tipo de reação mais intensa foi, contudo pequeno, não permitindo conclusões definitivas.

Neste estudo pretendemos avançar na definição do potencial de alguns dos marcadores comuns de susceptibilidade e resistência na leishmaniose visceral canina. Nosso objetivo é verificar se a associação de dois ou mais marcadores laboratoriais usualmente considerados como representativos de susceptibilidade ou resistência na leishmaniose visceral canina poderia oferecer maior segurança na definição do estado de resposta do cão à infecção. Para isso tomamos como referência potencial de susceptibilidade o parasitismo ativo definido pela cultura esplênica positiva. Como principal marcador de resistência selecionamos o teste da Leishmanina positivo. A partir destes dois marcadores que, como vimos acima, não são definitivos, associamos a distribuição de imunoglobulinas séricas em resposta a infecção com *Leishmania* e o perfil de expressão de IFN-gama e IL-4 no baço de cães infectados com o parasito.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar parâmetros de resposta imune celular (*in situ*) e humoral em cães com marcadores de susceptibilidade ou resistência à leishmaniose visceral.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Avaliar o perfil de distribuição de imunoglobulinas em resposta a infecção natural com *Leishmania* em cães com marcadores de susceptibilidade ou resistência à doença;

3.2.2 Avaliar o perfil de expressão das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4 no baço de cães com marcadores de susceptibilidade ou resistência à leishmaniose visceral.

#### 4 JUSTIFICATIVA

A *Leishmania infantum chagasi* é um microorganismo implicado como agente causal da leishmaniose visceral humana (LVH) e canina (LVC) no continente americano e na Europa. A doença humana tem uma letalidade de cerca de 11,5% (SILVA, 2001), está em expansão no Brasil e em outros países da América. Uma série de evidências suporta a idéia de que o cão é o principal reservatório da *Leishmania infantum chagasi* e que intervenções que reduzam a quantidade de cães capazes de transmitir a doença, através de vacina ou tratamento, teriam forte impacto sobre a enfermidade humana. A utilização de uma vacina contra a LVC teria, portanto, interesse para saúde pública e em medicina veterinária. Para viabilizar a escolha racional de candidatos a vacina para LVC, capaz de induzir ou exacerbar uma resposta imune protetora, é necessário o conhecimento prévio dos mecanismos envolvidos nesta resposta.

Trabalhamos com a hipótese de no baço existir uma polarização da resposta à infecção em cães, que poderia ser indicada por uma significativa produção de citocinas, IFN- $\gamma$ , em cães resistentes e IL-4 em cães susceptíveis à doença, refletindo a dicotomia de resposta Th1/Th2, observada em células do sangue periférico de cães com leishmaniose estimuladas com antígeno de *Leishmania*. Nossa hipótese é que também há uma dicotomia na resposta humoral na qual IgG2 estaria com níveis elevados em animais com resposta protetora (Th1) e tanto IgG1 quanto IgE estariam aumentadas na instalação da doença (em animais susceptíveis). Vários outros autores também pesquisaram IgG1 e IgG2 em cães, mas com resultados contraditórios e definição de populações com base em parâmetros diferentes.

Pretendemos com este trabalho verificar se a utilização em conjunto de diferentes marcadores associados a susceptibilidade (parasitismo esplênico) ou resistência (DTH a

antígenos de *Leishmania*) a LVC apontam para uma melhor discriminação das populações caninas em relação à resposta à infecção.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS E ESPÉCIMES

Para este estudo, foram utilizados soro e fragmentos de tecido esplênico de cães errantes, sem raça definida, capturados na região urbana de Jequié – Bahia (área endêmica para LV), em colaboração com o Centro de Referência em Endemias Pirajá da Silva (PIEJ) e a Prefeitura Municipal. Os animais receberam uma identificação numérica e foram mantidos no canil municipal por um período mínimo de 48 horas. Nesse período amostras de sangue foram coletadas para a detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania* por ELISA (PARANHOS-SILVA *et al.*, 2003) e foi realizado o teste cutâneo de Montenegro para investigar a presença de reação de hipersensibilidade tardia a antígeno de *Leishmania*. Os animais com testes positivos ou não reclamados pelos seus donos foram sacrificados. Material esplênico foi coletado para exame da expressão de citocinas por RT-PCR e para cultura para isolamento de *Leishmania*. Apesar de um exame clínico detalhado não ter sido realizado nos animais, dados sobre estado nutricional (normal, emagrecido e caquético) e sobre a presença de lesões cutâneas foram anotados. Os procedimentos foram realizados em conformidade com as recomendações da Comissão de Ética no Uso de Animais, da FIOCRUZ ([http:// www. fiocruz. br/presidencia/vppdt/ceua.htm](http://www.fiocruz.br/presidencia/vppdt/ceua.htm)). Detalhes dos procedimentos técnicos utilizados são apresentados a seguir.

### 5.2 PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS DE *LEISHMANIA*

Promastigotas de *Leishmania infantum chagasi* (MHOM/BR2000/Merivaldo2, isoladas de um paciente com leishmaniose visceral da área endêmica de Jequié, Bahia e caracterizadas por perfil imunoenzimático e pela utilização de anticorpos monoclonais,



pelo grupo do Dr. Gabriel Grimaldi Jr., Fiocruz, Rio de Janeiro) foram cultivadas em meio de Schneider's com 10% de soro bovino fetal (HyClone, Utah, USA). Culturas de *Leishmania* em fase logarítmica e em fase estacionária de crescimento foram centrifugadas, lavadas três vezes em solução salina tamponada com fosfato 0,15M, pH 7,4 (PBS) a 4°C, e lisadas por repetidos ciclos de congelamento e descongelamento, seguido por sonicação. O controle da lise dos parasitos foi feito por microscopia óptica. Os lotes de antígenos utilizados para ELISA foram processados em presença de uma mistura de inibidores enzimáticos PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoreto), TPCK (n-2-p-tosil-L-fenilalanina clorometilcetona), TLCK (Nap-tosil-L-lisina-clorometilcetona) e NPGGB (Nitrofenol-p-guanidino benzoato). Nenhum inibidor enzimático ou outra substância preservante foi adicionada aos lotes de antígeno utilizados nos testes de Montenegro. A concentração de proteína de cada lote de antígeno foi estimada através de reação com fluorescamina, conforme descrito por Udenfriend *et al.* (1975). As suspensões de antígeno foram congeladas a -70 °C até o uso.

### 5.3 TESTE CUTÂNEO DA LEISHMANINA

Cada animal foi injetado intradermicamente, na parede abdominal na região adjacente à linha mamária na com 100 µl de uma solução salina contendo 125 µg de antígeno de *L. infantum chagasi*. O mesmo volume do diluente puro foi injetado como controle em área semelhante da parede abdominal. Quarenta e oito horas após a injeção, os eixos maiores das áreas de induração foram medidos por um indivíduo sem conhecimento prévio dos locais de injeção do antígeno (ver figura 02). Os resultados são expressos em milímetros, correspondendo à média dos maiores eixos perpendiculares entre si da reação. A padronização dos sítios de injeção e concentração do antígeno foram estabelecidas em

experimentos preliminares realizados em nosso laboratório, utilizando concentrações entre 125 a 500  $\mu\text{g}$  de antígeno. Foram consideradas positivas as reações com diâmetro de induração iguais ou superiores a 5 mm com base em definições previamente publicadas (CARDOSO *et al.*, 1998; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2000; PARANHOS-SILVA *et al.*, 2001; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001).



Figura 2: Teste cutâneo da Leishmanina adaptado para cães. Note a área de induração em relevo (seta).

#### 5.4 CULTURA ESPLÊNICA PARA A DETECÇÃO DE PARASITOS NO BAÇO

Após o sacrifício dos animais a cavidade peritoneal foi aberta, o baço foi exposto, evitando-se o contato da cápsula esplênica com a pele ou materiais contaminados do exterior. Agulhas 18G x 38mm conectadas a seringas de 10 ml foram introduzidas no baço,

e o tecido esplênico aspirado sob pressão. O material esplênico foi transferido para meio de cultura bifásico NNN-Schneider e as culturas examinadas semanalmente por um período de até dois meses ou até tornarem-se positivas.

## 5.5 DISTRIBUIÇÃO DOS ISOTIPOS DE IMUNOGLOBULINAS IGG1, IGG2 E IGE CONTRA *LEISHMANIA* NOS SOROS DOS CÃES

Para estabelecer a distribuição de imunoglobulinas dos subtipos IgG1, IgG2 e IgE na resposta humoral de cães a *L. infantum chagasi*, foram utilizados soros de 55 animais classificados em quatro categorias definidas como *potencialmente não infectado*: com teste cutâneo da Leishmanina negativo, cultura esplênica negativa (sete animais); *infectado potencialmente resistente* animais que apresentavam teste cutâneo da Leishmanina positivo e cultura esplênica negativa (15 animais); *infectado potencialmente susceptível* animais com teste cutâneo da Leishmanina negativo e cultura esplênica positiva (23 animais); *infectados em fase indeterminada da doença*: animais com teste cutâneo da Leishmanina positivo e cultura esplênica positiva (10 animais). As amostras de soro foram colhidas e armazenadas à temperatura de -20°C até o momento de utilização. Nem todos os animais foram testados para todos os isotipos de imunoglobulinas, devido à indisponibilidade de quantidade suficiente de amostras de soro. Um sumário do número de animais submetidos a testes para cada isotipo de imunoglobulinas é apresentado na tabela 1.

Tabela 01: Distribuição dos grupos de animais não infectados ou naturalmente infectados testados para distribuição de isotipos de imunoglobulinas anti-*L. infantum chagasi* no soro.

CATEGORIA	ISOTIPOS TESTADOS		
	IgG1	IgG2	IgE
Potencialmente não infectado	4	4	5
Infectado potencialmente resistente	11	11	8
Infectado potencialmente susceptível susceptível	17	17	11
Infectados em fase indeterminada da doença	8	8	8
TOTAL	40	40	32

Placas de poliestireno de 96 poços foram sensibilizadas com antígeno de *L. chagasi* (2,5 µg/ml, 100µl/poço) em tampão carbonato-bicarbonato, *overnight* a 4°C. Após o bloqueio dos sítios de ligação inespecífica com PBS contendo 10% de leite desnatado e 0,05% de *Tween-20*, os soros foram dispostos nas placas em duplicata diluídos a 1:400 (concentração definida em ensaios prévios realizados em nosso laboratório) em um tampão de ELISA constituído por PBS contendo 10% de leite desnatado e 0,05% de *Tween-20*. Após lavagem, foram adicionados à placa anticorpos anti-IgG1 e anti-IgG2 de cão, ambos produzidos em cabra, conjugados com peroxidase (Bethyl Laboratories, Texas, EUA). Esses conjugados foram titulados previamente e estabelecida a diluição de 1:1600 e 1:800 respectivamente como ótimas para uso nos ensaios. A cada etapa do experimento as placas foram submetidas a uma hora de incubação em câmara úmida a 36°C. Entre as etapas as placas foram lavadas quatro vezes com PBS contendo 0,05% de *Tween-20*. As reações foram reveladas com 150µl de TMB (Tetra-Metil-Benzidina - Sigma-Aldrich, Minnessota, USA) e interrompidas com 30µl de ácido sulfúrico 4M conforme descrito (PARANHOS-SILVA, 2003). As reações foram lidas a um comprimento de onda de 450nm. Em todos os experimentos executados, controles positivos (soro de um animal conhecidamente

infectado) e negativos (soro de um animal conhecidamente não infectado) foram adicionados em duplicata em cada placa diluídos em PBS com 10% de leite desnatado com 0,05% de *Tween-20*.

Algumas modificações descritas por Baqueiro (2002), foram introduzidas na ELISA para dosar IgE específica anti-*Leishmania* nos soros dos cães: Os soros teste foram diluídos a 1:100 em PBS contendo 5% de leite desnatado e 0,05% de *Tween-20* e adicionados às placas em duplicata. As placas foram então, incubadas por duas horas em câmara úmida a 36° C e posteriormente a 4°C *overnight* também em câmara úmida. Em seqüência, foi colocado o segundo anticorpo anti-IgE de cão produzido em cabra, conjugado a peroxidase (Bethyl Laboratories, Texas, EUA), previamente titulado, diluído 1:25 em PBS contendo 5% de leite desnatado e 0,05% de *Tween-20* e incubado por uma hora a 37°C. Entre cada etapa foram feitas duas lavagens com PBS contendo 0,05% de *Tween20* e duas com PBS puro. A revelação e a leitura da reação foram feitas conforme descrito acima.

## 5.6 RT-PCR PARA MENSURAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO BAÇO

### 5.6.1 Animais utilizados para a mensuração de citocinas no baço

Para a avaliação da expressão de citocinas no baço foram utilizados materiais de 19 animais classificados em três grupos de acordo com a intensidade do TCL, cultura esplênica e atividade de anticorpos séricos anti-*Leishmania* dosados por ELISA (Tabela 03). Utilizou-se apenas animais com respostas polarizadas nestes testes. Desde que estudos preliminares de nosso laboratório (PARANHOS-SILVA, 2003) sugerem que apenas animais com áreas de induração nos TCL maiores que 10mm têm uma tendência a apresentar menor frequência de cultura esplênica positiva, e que animais com atividade de

anticorpos anti-*Leishmania* no soro têm mais frequentemente infecção ativa e sinais clínico-laboratoriais de doença, elegemos esses critérios para a definição dos grupos de animais utilizados nesse experimento: O grupo de cães *potencialmente não infectados*: animais com baixa atividade de anticorpos séricos anti-*Leishmania* no ELISA, cultura esplênica negativa para *Leishmania* e TCL negativo. O grupo de cães *infectados e potencialmente resistentes*: animais com alta atividade de anticorpos anti-*Leishmania* no ELISA, cultura negativa e  $TCL \geq 10,0\text{mm}$ . O grupo de cães *infectado e potencialmente susceptíveis*: com níveis variados de atividade de anticorpos anti-*Leishmania* no ELISA, cultura positiva e TCL negativo.

Tabela 02: Grupos polares de animais selecionados para mensuração de citocinas através de RT-PCR

Grupos	IgG sérico	Cultura esplênica	TCL <sup>1</sup>
Potencialmente não infectado	↓	-	-
Infectados potencialmente resistentes	↑	-	≥10 mm
Infectados potencialmente susceptíveis	↕	+	-

<sup>1</sup>TCL – Teste cutâneo da leishmanina

### 5.6.2 Extração de RNA

A extração de RNA do tecido esplênico foi realizada por precipitação com fenol-guanidina utilizando TRIzol® (Gibco BRL, Nova York, EUA) e seguindo o protocolo recomendado pelo fornecedor, que consta de: Em um tubo tipo Tissue Grider, foi colocado um fragmento de tecido de baço, ainda congelado, medindo aproximadamente 3x3 mm, adicionado 1mL de TRIzol® e homogeneizado. O sobrenadante (que contém RNA) foi transferido para um tubo Eppendorf e centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos a 4° C, para

remover materiais insolúveis e de alto peso molecular como membranas, polissacarídeos e moléculas de DNA. Foram adicionados 200µL de clorofórmio e o tubo foi agitado vigorosamente, incubado à temperatura ambiente por três minutos, seguindo-se de uma centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi então cuidadosamente pipetado e transferido para outro tubo, ao qual foi adicionado 500µL de álcool isopropílico. O material foi incubando a temperatura ambiente por 10 minutos, seguindo-se de nova centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos. O RNA precipitou-se no fundo do tubo. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com etanol a 75%, agitado e centrifugado a 7.500 x g por cinco minutos a 4° C. Após essa última centrifugação o sobrenadante foi retirado e o *pellet* seco a temperatura ambiente, e posteriormente ressuspenso em 20 µL de água tratada com DEPC, e a concentração de RNA foi estimada através de luz ultra-violeta (UV) com comprimento de onda de 260nm. A integridade do RNA extraído foi finalmente avaliada em gel de agarose a 1,5%.

### 5.6.3 Reação de transcrição reversa (RT)

Para a reação de transcrição reversa foram utilizados reagentes do kit para transcrição reversa da Gibco BRL, Nova York, EUA, seguindo o protocolo recomendado pelo fornecedor. A mistura para RT foi preparada adicionando-se 2 µL de água estéril e livre de RNAase, 1 µL de Oligo DT, 1 µL de enzima transcriptase reversa, 1 µL de inibidor de RNAase a um tubo tipo Eppendorf seguindo-se de 4 µL de tampão de primeira fita para síntese de DNA (cinco vezes concentrado), 2 µL de cada desoxiribonucleotídeo trifosfato (DNTP's) dATP, dCTP, dGTP e dTTP e 0,1M DTT. Em cada tubo foram adicionados 19 µL da mistura e 1 µL do RNA da amostra a ser testada. No termociclador as amostras foram submetidas a uma temperatura de 42° C por 50 minutos para a transcrição reversa e

95° C por cinco minutos para inativação da enzima transcriptase reversa e o cDNA mantido temporariamente a 4° C até a realização da PCR.

#### 5.6.4 Reação da polimerase em cadeia (PCR)

Para a realização da PCR, uma mistura de reagentes foi preparada contendo 62,5 µL de água estéril e livre de RNAase, 3 µL de 50mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 µL de tampão Tris-HCl (10 vezes concentrado, pH 8,4), 1µL de oligo nucleotídeo iniciador a montante e a jusante para IFN-γ, IL-4 e HPRT.

Foi então adicionado 0,5µL da enzima Taq DNA polimerase, totalizando 80 µL por tubo. Os reagentes usados na mistura para PCR foram da Gibco BRL, Nova York, EUA. As amostras foram incubadas no termociclador e os ciclos ajustados a 95° C por um minuto, para denaturação do DNA e separação das fitas; 60° C por dois minutos, na qual há pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores e 72° C por dois minutos permitindo a enzima DNA polimerase ligar-se à região correspondente ao conjunto, iniciando-se então a extensão dos oligonucleotídeos iniciadores ligados às fitas do DNA.



Tabela 03: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos experimentos de semi-quantificação das mensagens para IFN- $\gamma$  e IL-4 em baços de cães dos diferentes grupos.

Primer	Seqüência de nucleotídeos	Número de pares de bases
IFN- $\gamma$ a jusante	5'GGT GGG TCT CTT TTC GTA 3'	18
IFN- $\gamma$ a montante	5' ACT CCT TTT CCG CTT CTT 3'	18
IL-4 a jusante	5' CAC TGC TCC AAA GAA CAC AAG C 3'	22
IL-4 a montante	5' AGG TCT TGT TTG CCA TGC TG 3'	20
HPRT a jusante	5' TAT GGA CAG GAC TGA ACG TCT TGC 3'	24
HPRT a montante	5' GAC ACA AAC ATG ATT CAA ATC CCT GA 3'	26

Os *primers* utilizados foram adquiridos da Gibco BRL, Nova York.

Para o estabelecimento das condições gerais de processamento para obtenção de sinais adequados da expressão de IFN- $\gamma$  e IL-4, utilizaram-se amostras de baço colhidas de um animal previamente injetado com concanavalina-A e de um cão sadio (sem enfermidades aparentes). Procederam-se reações com 25, 30, 35 e 40 ciclos, para escolher o número de ciclos mais adequado para os testes. Após o término dos ciclos a amostra foi mantida a 72° C por 10 minutos para inativar qualquer resíduo de enzima que ainda pudesse estar ativa. Os produtos das reações foram congelados a -70° C até o momento da análise por eletroforese em gel de agarose a 2%.

Para avaliar o tamanho das seqüências amplificadas e intensidade da mensagem foi realizada eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. Após análise da expressão das bandas, processaram-se as amostras para IFN- $\gamma$  com 30 ciclos e para IL-4 com 35 ciclos. Com esses números de ciclos as reações encontravam-se em fase logarítmica da curva de amplificação do DNA, o que permitiam discriminação de diferenças entre amostras.

Como controles adicionais da reação, foram realizados experimentos com uma amostra que exibia bandas bem definidas para IFN- $\gamma$  e IL-4, de três maneiras: uma amostra

com os dois *primers* de citocina (a jusante e a montante), uma amostra só com o *primer* a jusante e outra só com o *primer* a montante. Não houve amplificação quando apenas um dos *primers* foi utilizado, nos testes (figuras 3 e 4).

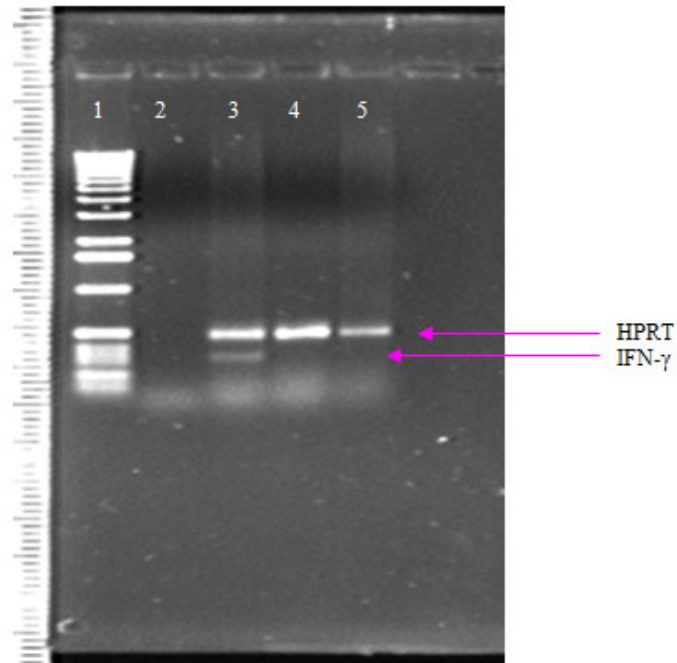


Figura 03: Experimentos controle dos para expressão da mensagem de IFN- $\gamma$  (as bandas superiores são referentes a HPRT, as inferiores são referentes a IFN- $\gamma$ ): Na raia 1, está o marcador de peso molecular; na raia 2, água; na raia 3, a amostra com os dois oligonucleotídeos iniciadores a jusante e a montante; na raia 4, a amostra sem o oligonucleotídeo a jusante e na raia 5, a amostra sem o oligonucleotídeo a montante para IFN- $\gamma$ . Note que há amplificação da mensagem apenas quando os dois *primers* são utilizados.

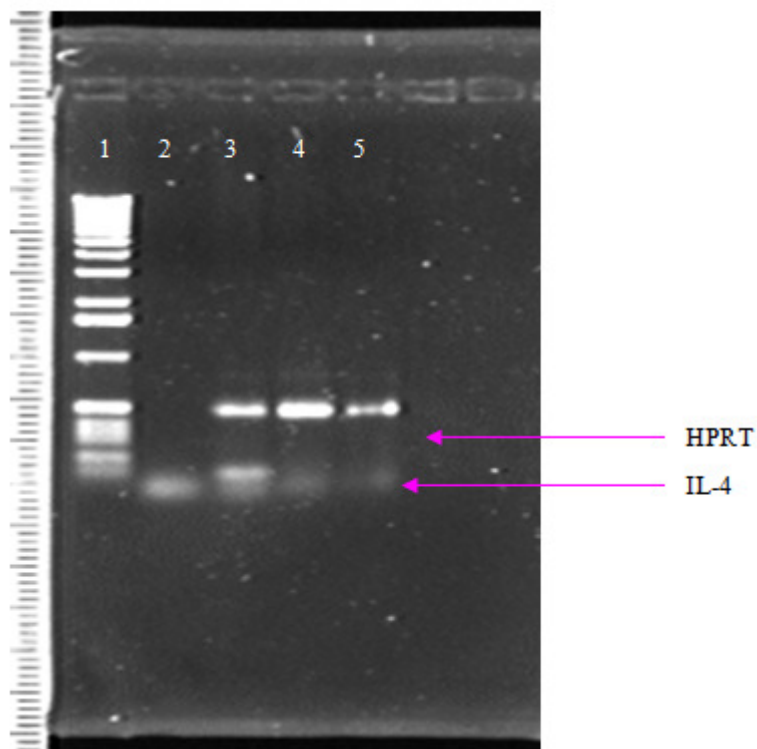


Figura 04: Controle dos experimentos para mensagem da expressão de IL-4 (as bandas superiores são referentes a HPRT, as inferiores são referentes a IL-4). Na raia 1, está o marcador de peso molecular, na raia 2, água, na raia 3, a amostra com os dois oligonucleotídeos iniciadores a jusante e a montante, na raia 4, a amostra sem o oligonucleotídeo a jusante e na raia 5, a amostra sem o oligonucleotídeo a montante para IL-4. Note que há amplificação da mensagem apenas quando os dois *primers* são utilizados (raia 3).

A semiquantificação das bandas foi feita utilizando o programa *Eagle Eye Sight* (Stratagene Eagle Sight, versão 3.2) que permite a análise da cada banda isoladamente, e os resultados são expressos como uma razão citocina/HPRT (HPRT%)

## 5.7 EXPRESSÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados estão expressos em forma de gráficos ou tabelas onde os valores numéricos representam números absolutos ou proporções. A significância estatística das diferenças observadas entre os grupos foi determinada utilizando-se testes paramétricos de

comparação de médias (ANOVA). Quando foi encontrada significância estatística pelo teste F, a diferença entre dois grupos foi identificada usando o teste de Student-Newman Kleus (GLANTZ, 1996). Para comparações envolvendo proporções foi utilizado o teste exato de Fisher. Foi estabelecida significância para os valores onde  $P < 0,05\%$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS IGG1, IGG2 E IGE CONTRA *LEISHMANIA INFANTUM* (*CHAGASI*) NOS SOROS DOS CÃES

#### 6.1.1 Características da população estudada

As características gerais dos animais utilizados para os experimentos de definição do perfil de distribuição dos isotipos de imunoglobulinas anti-*Leishmania* no soro de cães de uma área endêmica para leishmaniose visceral estão sumarizadas na tabela 3.

A proporção de animais com emagrecimento foi maior no grupo considerado susceptível. Essa diferença, porém, não foi estaticamente significativa (teste de Fisher,  $P=0,077$ ).

Tabela 04: Características gerais dos grupos de cães de uma área endêmica para leishmaniose visceral, classificados conforme a resposta a *L. chagasi* no teste cutâneo de Leishmanina (TCL) e a presença de parasitismo esplênico.

GRUPOS	N	CULTURA	TCL (mm)	SEXO <sup>a</sup> (M/F) <sup>b</sup>	SINAIS DE DOENÇA <sup>c</sup>	
					SIM	NÃO
Potencialmente resistente	15	-	5-12,5	8/5	7	8
Potencialmente susceptível	23	+	0-2,5	16/6	8	13
Em fase indeterminada	10	+	6-12	8/2	2	8
Potencialmente não infectado	7	-	0	1/3	1	5
<b>TOTAL</b>	<b>55</b>				<b>18</b>	<b>34</b>

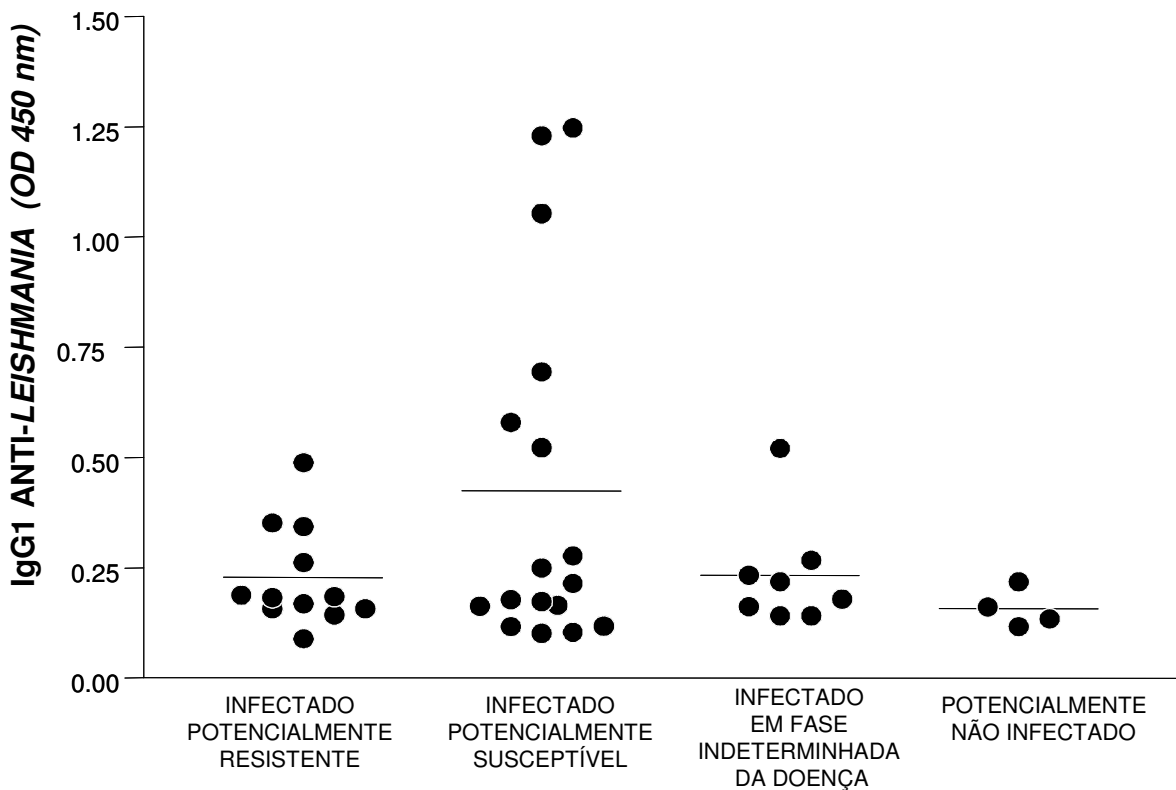
<sup>a</sup> Sexo não registrado em seis animais

<sup>b</sup> Macho (M) ou fêmea (F)

<sup>c</sup> Em três dos animais o estado geral não foi registrado.

### 6.1.2 IgG1

A atividade sérica de anticorpos do isotipo IgG1 contra *Leishmania* tendeu a ser maior nos animais com TCL negativo e com parasitismo esplênico (grupo *infectado potencialmente susceptível*,  $0,424 \pm 0,401$ ) que nos outros grupos: com TCL positivo e ausência de parasitismo esplênico (grupo *infectado potencialmente resistente*,  $0,226 \pm 0,114$ ), ou com ambos TCL e cultura esplênica positivos (grupo *em fase indeterminada da doença*,  $0,234 \pm 0,125$ ) ou com ambos os parâmetros negativos (grupo *potencialmente não infectado*,  $0,159 \pm 0,044$ ). Essa diferença não foi, contudo estatisticamente significativa (ANOVA,  $P=0,1450$ ).

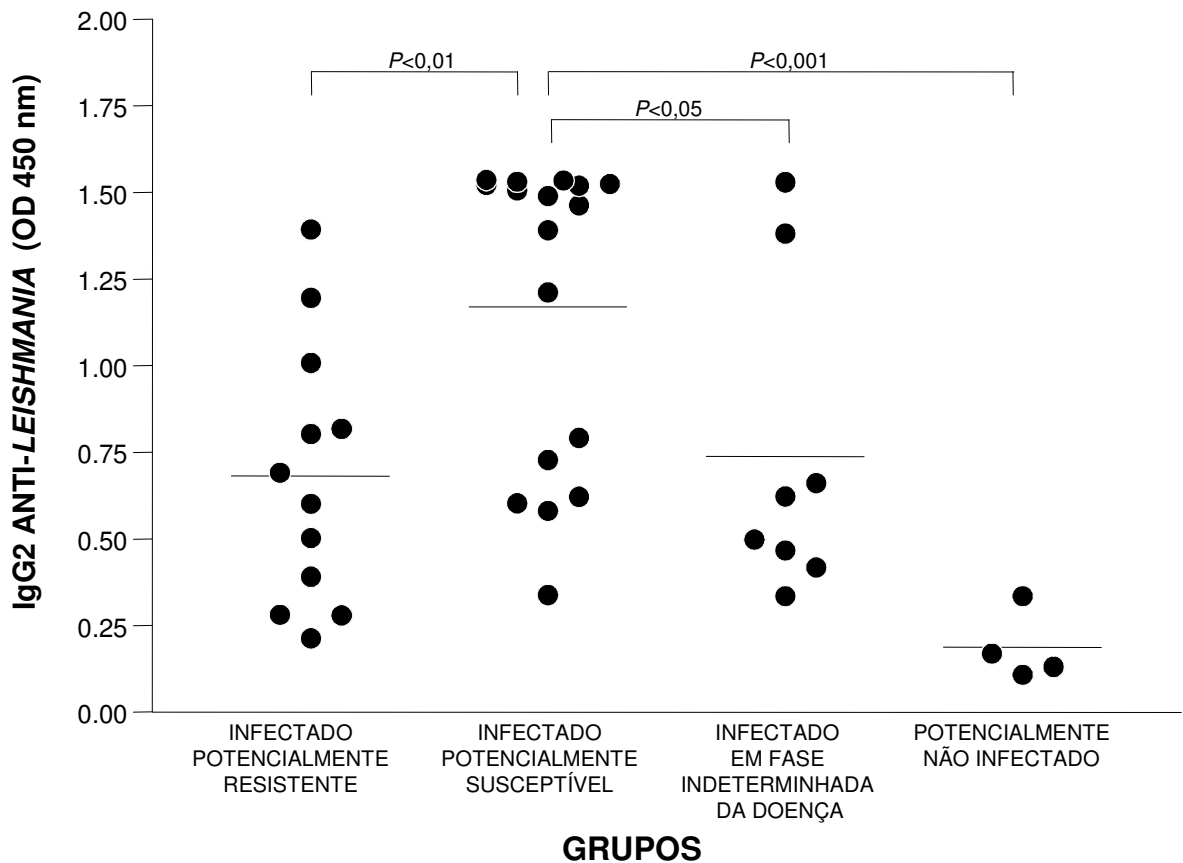


### GRUPOS

**Figura 05: Distribuição de IgG1 sérica anti-Leishmania em animais de uma área endêmica de leishmaniose visceral:** Há uma tendência de aumento da atividade sérica de anticorpos do isotipo IgG1 no grupo de animais potencialmente susceptíveis à leishmaniose visceral; teste cutâneo de Montenegro negativo e cultura de aspirado esplênico positiva para Leishmania. A diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa.

#### 6.1.3 IgG2

A atividade sérica de IgG2 específica foi maior (ANOVA  $P=0,0001$ ) no grupo *infectado potencialmente susceptível* ( $1,324 \pm 0,322$ ) que nos demais grupos: *em fase indeterminada da doença* ( $0,930 \pm 0,383$ ,  $P=0,05$ ), *infectado potencialmente resistente* ( $0,916 \pm 0,401$ ,  $P=0,05$ ) e *potencialmente não infectado* (média  $0,299 \pm 0,151$ ,  $P=0,001$ ). Foi também maior nos grupos *infectado potencialmente resistente* e *com infecção em fase indeterminada* que no grupo de animais *potencialmente não infectado*.

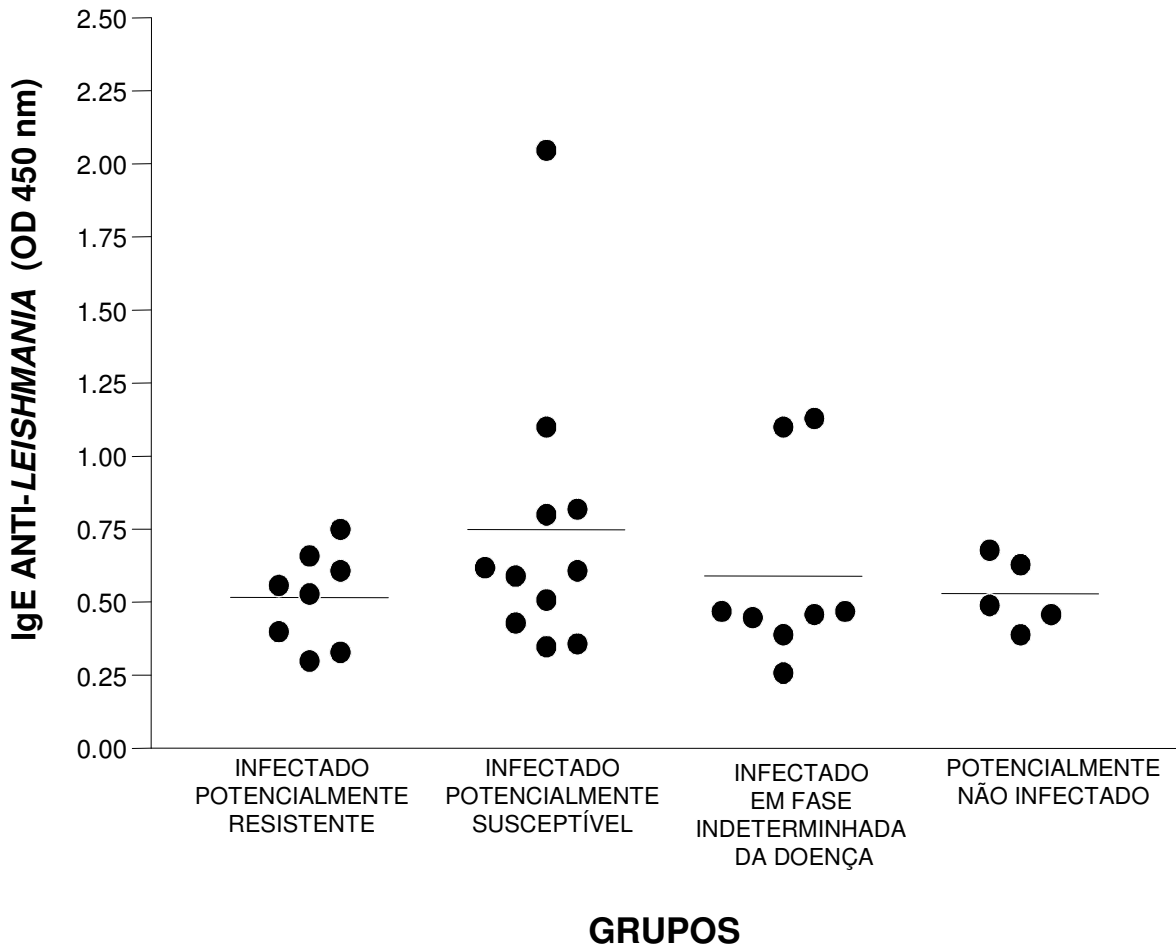


**Figura 06: Distribuição de IgG2 sérica anti-*Leishmania* em animais de uma área endêmica de leishmaniose visceral:** A atividade sérica de anticorpos do isotipo IgG2 foi maior no grupo de animais *potencialmente susceptíveis* a leishmaniose visceral que nos demais grupos e nos grupos com evidência de infecção que no grupo sem evidência de infecção (ANOVA,  $P < 0,0001$ ).

#### 6.1.4 IgE

Embora o grupo potencialmente susceptível ( $0,749 \pm 0,485$ ) tenha apresentado valores médios mais elevados que os grupos *potencialmente resistente* ( $0,518 \pm 0,161$ ), ou com doença em *fase indeterminada* (média  $0,591 \pm 0,331$ ) ou *potencialmente não infectados* ( $0,530 \pm 0,121$ ), essas diferenças foram intensificadas pela alta atividade de anticorpos do isotipo IgE anti-*Leishmania* em um dentre os 11 animais examinados, não sendo estatisticamente significativa (ANOVA,  $P = 0,4668$ ) (figura 6).





**Figura 07: Distribuição de IgE sérica anti-*Leishmania* em animais de uma área endêmica de leishmaniose visceral:** Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (ANOVA  $P= 0,4668$ ). Um animal (com valor médio de DO de 2,05) contribuiu predominantemente para a elevação da média do grupo *potencialmente susceptível* a leishmaniose.

## 6.2 ESTIMATIVA DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO BAÇO ATRAVÉS DE RT-PCR

As características gerais dos animais selecionados para as avaliações da expressão de citocinas no baço estão sumarizadas na tabela 4. Quatro dos sete animais do *grupo potencialmente não infectado*, apresentavam emagrecimento, dois tinham bom estado nutricional, em um o estado geral não foi registrado. Um desses animais, 163J99, apesar de apresentar bom estado geral, tinha tumor venéreo transmissível.

Tabela 05: Características gerais de grupos de cães de uma área endêmica para leishmaniose visceral, classificados em grupos polares de resposta a *L.infantum chagasi* conforme o teste cutâneo da Leishmanina (TCL) e a presença de parasitismo esplênico.

GRUPOS	N	CULTURA	TCL	SEXO <sup>a</sup> (M/F) <sup>b</sup>	EMAGRECIMENTO <sup>c</sup>	
					SIM	NÃO
Potencialmente resistente	4	-	10-12,5	2/	0	4
Potencialmente susceptível	8	+	0	4/2	4	3
Potencialmente não infectado	7	-	0	2/4	4	2

<sup>a</sup> Sexo não registrado em cinco animais.

<sup>b</sup> Macho (M) ou fêmea (F).

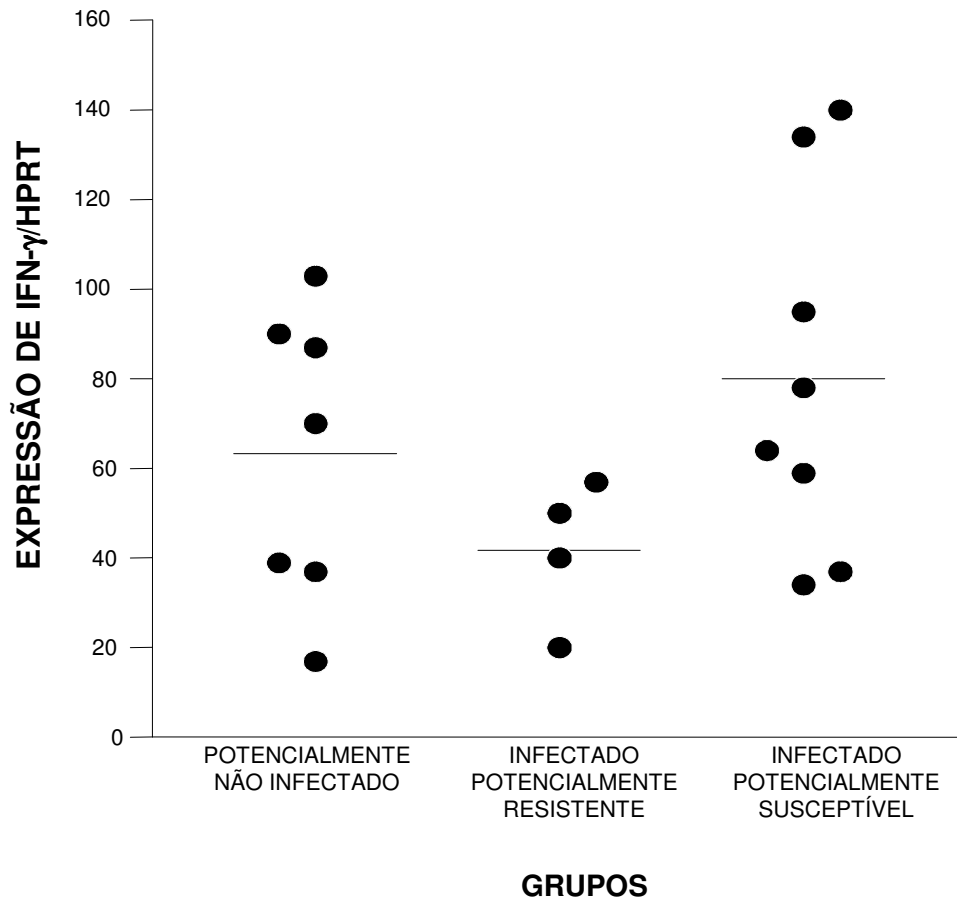
<sup>c</sup> Em dois dos animais o estado nutricional não foi registrado.

Apenas quatro animais foram identificados preenchendo os critérios de polarização de resposta ( $MST \geq 10\text{mm}$  e cultura negativa) para inclusão no grupo considerado *potencialmente resistente* a LVC. Esses animais tinham bom estado nutricional. Um deles, porém (animal 51J98), apresentava dermatite com alopecia focal e úlcera em olho esquerdo. Dos oito animais do grupo *potencialmente susceptível*, três apresentavam bom estado nutricional e quatro estavam emagrecidos. Em um dos animais o estado geral não foi registrado. Apesar de haver uma maior proporção de animais emagrecidos no grupo *potencialmente susceptível*, essa diferença não foi estatisticamente significativa (qui quadrado = 0,161).

### 6.2.1 Expressão de IFN- $\gamma$ em tecido esplênico

A expressão de RNAm para IFN- $\gamma$  nos baços dos cães *potencialmente não infectados* variou entre 17 e 103 %HPRT (média  $63 \pm 32$  %HPRT), nos cães *potencialmente resistentes*, entre 20 e 57 %HPRT (média  $42 \pm 16$  %HPRT) e nos cães *potencialmente*

*susceptíveis* de 34 a 140 %HPRT (média  $80 \pm 40$  %HPRT). A diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa ( $P=0,21$ ).

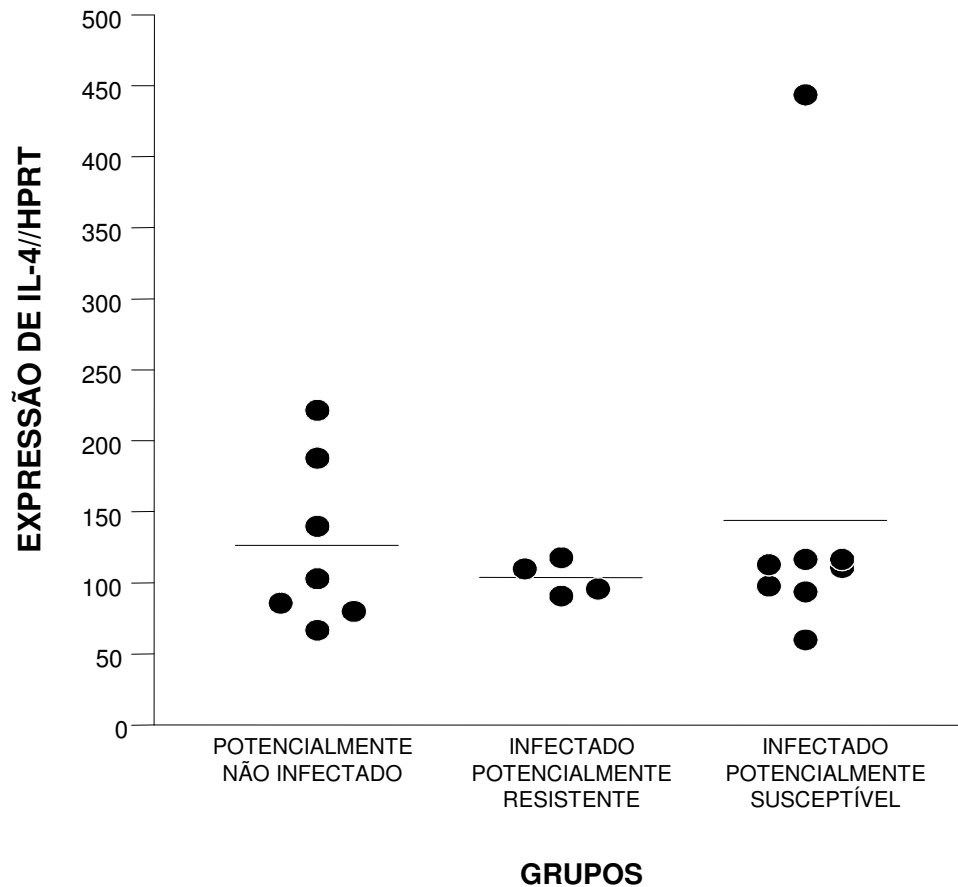


**Figura 08: Expressão de IFN- $\gamma$  segundo HPRT.** Expressão da citocina IFN- $\gamma$  (interferon gama) relativa à expressão de HPRT (hipoxantina-ribosil-transferase) no baço de cães de diferentes grupos. Não foram observadas diferenças entre os grupos em relação à expressão de IFN- $\gamma$  (ANOVA  $p=0,56$ ).

### 6.2.2 Expressão de IL-4 em tecido esplênico

A expressão de RNAm para IL-4 nos baços dos cães *potencialmente não infectados* variou entre 67 e 222 %HPRT (média  $127 \pm 59$  %HPRT), nos cães *resistentes* de 91 a 118 %HPRT (média  $104 \pm 12$  %HPRT) e nos cães *susceptíveis* entre 60 e 444 %HPRT (média

144±123 %HPRT). A diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa ( $P=0,758$ ). Um dos animais *susceptíveis*, porém apresentou alta expressão de IL-4, mais que duas vezes a média dos outros animais.



**Figura 09: Expressão de IL-4 segundo HPRT.** Expressão da citocina IL-4 (interleucina 4) relativa à expressão de HPRT (hipoxantina-ribosil-transferase) em baços de cães de grupos *não infectado*, *resistente* e *susceptível* à leishmaniose visceral canina. Não foram observadas diferenças entre os grupos em relação à expressão IL-4 (ANOVA  $p=0,758$ ).

## 7 DISCUSSÃO

Neste estudo, examinamos o perfil de distribuição de isotipos de imunoglobulinas nos soros de cães apresentando marcadores relacionados a susceptibilidade ou resistência a LVC. Os animais dos grupos com alguma evidência de infecção por *Leishmania* apresentaram níveis séricos de IgG2 específica mais altos que os observados no grupo controle. Por outro lado, apenas no grupo *potencialmente susceptível* foi observado uma tendência a aumento dos níveis séricos de anticorpos anti-*Leishmania* da sub-classe IgG1 e apenas um animal deste grupo apresentou níveis séricos elevados de IgE anti-*Leishmania*.

Nossas observações quanto os níveis séricos de IgG2 anti-*Leishmania* confirmam a observação por outros autores sobre a associação de elevados níveis de IgG2 com infecção (DEPLAZES *et al.*, 1995; BOURDOISEAU *et al.*, 1997; CAVALIERO *et al.*, 1999; NIETO *et al.*, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2005). A literatura é menos categórica em relação ao significado da atividade elevada de anticorpos da subclasse IgG1 anti-*Leishmania*. Nossos achados, ainda que não estatisticamente significantes, parecem apontar para uma tendência a elevação da atividade sérica específica de IgG1 apenas nos animais com infecção esplênica ativa e TCL negativa. Esse dado de certa forma corrobora com a maior parte dos trabalhos na literatura que mostram uma associação ou tendência de associação de níveis elevados de IgG1 específica com atividade da infecção como por exemplo: presença de sinais clínicos de doença (BOURDOISEAU *et al.*, 1997; NIETO *et al.*, 1999; INIESTA *et al.*, 2005), doença ativa pré-tratamento em relação ao período pós-tratamento (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; VERCAMMEN *et al.*, 2002), curso progressivo em relação a evolução para cura da doença (NIETO *et al.*, 1999), resposta desfavorável ao tratamento (DEPLAZES *et al.*, 1995; CAVALIERO *et al.*, 1999). Recentemente, Quinnell e colaboradores (2003), utilizando anticorpos monoclonais, encontraram uma estreita

relação de IgG1 com infecção mesmo em animais assintomáticos (QUINNELL *et al.*, 2003). Estudos comparativos são necessários para melhor compreensão das discrepâncias entre os dados obtidos por Quinnell *et al.* (2003) e os demais estudos, utilizando anticorpos policlonais. São mais difíceis de interpretar as observações de LEANDRO *et al.* (2001) que mostram apenas discreta variação nos níveis de IgG1 em cães submetidos a diferentes protocolos de infecção, não relacionada com sinais de doença ou atividade da infecção. Duas possíveis explicações para esse achado são o pequeno número de animais utilizados por aqueles pesquisadores em cada experimento e a ausência ou manifestação branda de doença nos animais estudados por eles.

Uma das possíveis explicações para o aumento na atividade sérica de anticorpos anti-*Leishmania* nos animais com parasitismo ativo (cultura esplênica positiva) e teste cutâneo da Leishmanina negativo é a ausência de controle da carga parasitária nesses animais por uma resposta imune celular efetora. Estudos quantitativos correlacionando parasitismo esplênico e níveis de imunoglobulinas são necessários para a confirmação dessa hipótese. Por outro lado, Solano-Gallego *et al.* (2000) não encontraram associações positivas ou negativas entre o TCL anti-*Leishmania* e níveis séricos de IgG1 ou IgG2 (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2000) em um estudo comparativo da susceptibilidade de raças caninas à leishmaniose visceral. Entre os possíveis elementos responsáveis pelas variações entre as nossas observações e as por Solano-Gallego *et al.* (2000), pode-se incluir o tipo de resposta considerada positiva no teste cutâneo da Leishmanina. Em nosso estudo, apenas áreas de induração maiores que 5mm foram consideradas como indicativas de reação positiva enquanto aqueles autores consideraram também a presença de áreas eritematosas.

Não foram observadas diferenças significativas na produção de IgE sérica entre os grupos de cães. Ainda assim, apenas um animal *potencialmente susceptível* teve níveis

altos de IgE sérica anti-*Leishmania*. Recentemente, Almeida *et al.* (2005) examinaram o perfil de distribuição de IgE sérica anti-*Leishmania* em cães de área endêmica, com infecção sintomática ou não e em animais de uma área livre de transmissão da doença. A sensibilidade do teste foi estimada em apenas 33%, com uma especificidade de 95% (ALMEIDA *et al.*, 2005). É possível que a baixa sensibilidade do nosso ensaio também reflita o perfil de distribuição encontrado em nossa mostra. Os testes sorológicos para identificação de anticorpos da subclasse IgE específica no soro lidam com uma complexidade superior aos utilizados para detecção de anticorpos das sub-classes IgM ou IgG. Acreditamos que os procedimentos técnicos para detecção de resposta específica por IgE ainda necessitam de aperfeiçoamento. Por outro lado esses e outros estudos indicam que apenas uma pequena fração de hospedeiros susceptíveis exibem resposta significativamente elevada com esse isotipo de imunoglobulina por exemplo, em seres humanos Atta *et al.* (1998) conseguiram um bom nível de detecção desse isotipo de anticorpo específico em pacientes com leishmaniose visceral patente. Por outro lado Shiddo *et al.* (1996), não encontraram diferenças na dosagem sérica de IgE total entre pacientes humanos com LV e controles, e detectaram IgE específica em apenas três dentre 20 pacientes com leishmaniose visceral. Esses dados parecem indicar que variações técnicas observadas na resposta do hospedeiro podem influenciar os baixos níveis de IgE específica anti-*Leishmania*, mesmo em condições de susceptibilidade.

Neste trabalho não observamos diferenças estatisticamente significantes na expressão de mensagens para IFN- $\gamma$  e IL-4 nos baços de cães não infectados ou infectados com marcadores de resistência ou susceptibilidade a *Leishmania* analisadas por RT-PCR. Esta observação contrasta com os dados obtidos de experimentos utilizando células do sangue estimuladas *in vitro* com antígeno de *Leishmania*, que têm revelado correspondência entre susceptibilidade e resistência à doença e um perfil de produção de

citocinas Th1 ou Th2 respectivamente (CARVALHO *et al.* 1994, PINELLI *et al.* 1995). Bomfim *et al.* (1996) mostraram em humanos, correlação positiva entre o quadro clínico da leishmaniose cutâneo-difusa e o perfil de expressão de IFN- $\gamma$  e IL-10 em células do sangue periférico e tecido das lesões. Esse estudo mostra que é possível a identificação de variações relevantes na expressão de citocinas em tecidos infectados por parasitos do gênero *Leishmania*. Quinnell *et al.* (2001), porém, não encontraram correlação entre expressão de IL-4, IL-10 e IL-18 e produção de anticorpos e resposta linfoproliferativa, em material da medula óssea de cães com LV. Caldas *et al.* (2005) sugerem que IL-10 e IFN- $\gamma$  são as moléculas que determinam o curso da leishmaniose visceral em humanos, embora uma polarização total Th1/Th2 ainda não esteja muito clara já que não há uma predominância dos níveis plasmáticos dessas citocinas. IL-10 e IFN- $\gamma$  permanecem por certo tempo em seus níveis séricos mesmo após tratamento da infecção (CALDAS *et al.*, 2005). Em conjunto com os dados obtidos nesse trabalho, as observações mencionadas acima sugerem que existem diferenças na expressão da resposta imune a IFN- $\gamma$  pelo mesmo patógeno em diferentes compartimentos orgânicos (WILSON *et al.*, 1996; ENGWERDA e KAYE, 2000).

Quais seriam as possíveis explicações para a ausência de diferenças no perfil de expressão de citocinas no baço de cães resistentes e susceptíveis examinados nesse trabalho?

Talvez a infecção por *Leishmania* não produza uma polarização completa da resposta imune no baço de cães, como ocorre em certas linhagens de camundongos isogênicos. É possível que este tipo de polarização seja rara em cães, como ocorre em seres humanos ou mesmo camundongos de outras linhagens que exibem um padrão intermediário de resposta (linhagens como C57BL/10 e DBA/2J) (BARRAL-NETTO, 1985).



Adicionalmente, cães errantes, como os utilizados neste estudo, podem estar submetidos a uma exposição importante a uma variedade de patógenos que podem modular a resposta imune a *Leishmania* (SANTIAGO *et al.*, 1999). No estudo realizado em nosso laboratório foi observada uma maior correlação entre infecção por *Leishmania* e presença de sinais clínicos de doença em animais domiciliados que em cães de rua (BARROUIN-MELLO *et al.*, 2004). Esse dado sugere que outros fatores além de leishmaniose podem estar envolvidos na produção de sinais de doença e portanto, interferem com a resposta imune em cães de rua.

O baço tem a função de monitorar antígenos presentes na circulação sanguínea (ABBAS *et al.*, 1998). Portanto, é possível que em um dado momento apresente respostas diferenciadas de perfil Th1 e Th2 a múltiplos antígenos em microambientes distintos, podendo explicar a discrepância entre as observações feitas com células isoladas, *in vitro* estimuladas apenas com antígenos de *Leishmania*. Na realidade, só os animais com maior comprometimento do estado geral, exibiram alta produção de IL-4 no estudo de Quinnell *et al.* (2001). Interessante notar que apenas um cão de nosso estudo, emagrecido e com ELISA alta exibiu IL-4 substancialmente elevada.

Outra possibilidade é que em cães, haja uma compartimentalização da resposta imune com perfis diferenciados no baço e no sangue periférico, sendo este fato também observado em outras condições nas quais padrões de resposta imuno-inflamatória foi examinada em células isoladas do sangue ou dos sítios de lesão (PINELLI, 2004; QUINNELL, 2003).

Por fim, não podemos excluir a possibilidade de que a técnica de RT-PCR seja adequada para a avaliação do perfil de produção de citocina em lesões originadas em órgãos não diretamente envolvidos com a resposta imune (BOMFIM *et al.*, 1996), mas não em órgãos linfóides, nos quais uma avaliação espacial (morfológica), da distribuição das

células que estão produzindo as citocinas pode ser mais adequada. Nesse caso, técnicas como hibridização *in situ* (CERDAN *et al.*, 1998) ou imunistoquímica (SILVA, 1999) poderiam trazer informações mais precisas. Um limite ao uso da imunistoquímica é o reduzido painel de anticorpos disponível como marcadores da resposta imune canina.

## 8 CONCLUSÕES

1. Anticorpos da classe IgG2 constituem o principal componente da resposta humoral por IgG na leishmaniose visceral canina;
2. Alta atividade sérica de anticorpos da classe IgG2 anti-*Leishmania* indica infecção e não necessariamente doença ou susceptibilidade ao desenvolvimento de leishmaniose visceral em cães.

## 9 COMENTÁRIOS

1. Anticorpos da classe IgG1 anti-*Leishmania* tendem a elevar-se em animais com perfil de susceptibilidade ao desenvolvimento da LV: Há porém questões sobre a especificidade do conjugado utilizado para identificação desta imunoglobulina (dos-SANTOS *et al.*, 2008).
2. A técnica de RT-PCR semi-quantitativa utilizada nesse estudo não revelou diferenças na expressão de IL-4 ou IFN- em grupos de animais com resposta polarizada à infecção. Isso pode ser devido a uma baixa sensibilidade da técnica ou existência de microambientes com perfil de expressão de citocinas antagônicas no tecido esplênico do animal.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Revinter, 1988.
- ABRANCHES, P. et al. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. **Parasitol. Immunol.**, v. 13, p. 537-550, 1991.
- AGUILAR, C. M. et al. Urban visceral leishmaniasis in Venezuela. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 1, p. 15-16, 1998.
- ALENCAR, J. E. Calazar canino. **Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil**. Fortaleza: Imprensa Oficial, 1959.
- ALMEIDA, M. A. O. et al. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 106, p. 151-158, 2005.
- ATTA, A. et al. Anti-leishmanial IgE antibodies: a marker of active disease in visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, p. 426-430, 1998.
- BADARÓ, R. et al. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in american visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection specific responses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 35, p. 72-78, 1986.
- BARRAL-NETTO, M. **Imunização de camundongos BALB/c contra a infecção por *Leishmania mexicana amazonensis* utilizando promastigotas homólogas solubilizadas**. 1985. 177 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana). Universidade Federal da Bahia. Salvador.
- BARRAL-NETTO, M. et al. Transforming growth factor- $\beta$  in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science**, v. 257, p. 545-548, 1992.
- BARRAL-NETTO, M.; MACHADO, P.; BARRAL, A. Human cutaneous leishmaniasis: recent advances in physiopathology and treatment. **Eur. J. Dermatol.**, v. 5, p. 104-113, 1995.
- BARROUIN-MELO, S. M. et al. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **Vet. J.**, v. 171, p. 331-339, 2006.

BAQUEIRO, T. **Investigação sobre as espécies de ácaros e carga dos seus alérgenos em poeiras de leitos de indivíduos de diferentes grupos sociais.** 2002. Dissertação (Mestrado em Imunologia). Universidade Federal da Bahia. Salvador.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **Inter. J. Parasitol.**, v. 28, p. 121-134, 1997.

BOMFIM, G. et al. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. **Exper. Parasitol.**, v. 84, p. 188-194, 1996.

BORJA-CABRERA, G. P. et al. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-Quil-A saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). **Vaccine**, v. 20, p. 3277-3284, 2002.

BOURDOISEAU, G. et al. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 59, n. 1-2, p. 21-30, 1997.

CABRERA, M. A.A. et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.45, n. 2, p. 79-83, 2003.

CALDAS, A. et al. A. Balance of IL-10 and Interferon- $\gamma$  plasma levels in human visceral leishmaniasis: Implications in the pathogenesis. **BMC Infect. Dis.**, v. 5, n. 113, p. 1471-2334, 2005.

CARDOSO, L. et al. Use of a leishmanin skin test in the detection of canine Leishmania-specific cellular immunity. **Vet. Parasitol.**, v. 79, p. 213-220, 1998.

CARVALHO, E. M. et al. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. **J. Clin. Invest.**, v. 76, p. 2066-2069, 1985.

CARVALHO, E. M. et al. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 152, p. 5949-5956, 1994.

CASTRO-SOUSA, F. et al. Dissociation between vasodilatation and leishmaniasis infection-enhancing effects of sand fly saliva and maxadilan. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 997-999, 2001.

CAVALIERO, T. et al. Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 13, n. 4, p. 330-334, 1999.

CERDAN, M. G. et al. Accurate spatial and temporal transgene expression driven by a 3.8-kilobase promoter of bovine beta-casein gene in the lactating mouse mammary gland. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 49, p. 236-245, 1998.

CORBETT, C. E. P.; LAURENTI, M. D. Early detection of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in draining lymph node after subcutaneous inoculation in hamster. **Parasitol. Inter.**, v. 47, p. 307-310, 1998.

CORTADA, V. M. C. L. et al. Canine visceral leishmaniasis in Anastácio, Mato Grosso do Sul state, Brazil. **Vet. Res. Communications.**, v. 28, p. 365-374, 2004.

C.V.E. **Leishmaniose visceral americana**. Disponível em:  
<[http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/inf\\_lva2000.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/inf_lva2000.htm)> Acesso em: 12 set 2001.

DA SILVA, V. O. et al. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). **Vaccine**, v. 19, p. 1082-1092, 2001.

DEPLAZES, P. et al. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite Immunol.**, v. 17, p. 451-458, 1995.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Public health aspects and control. **Clin. Dermatol.**, v. 14, p. 417-423, 1996.

DOS-SANTOS, L. R. et al. Recombinant single-chain canine interleukin 12 induces interferon gamma mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of dogs with visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 98, p. 43-48, 2004.

DUARTE, M. I. S. **Novas técnicas na investigação da patologia e diagnóstico da leishmaniose**. Disponível em:  
<<http://www.fleury.com.br/mednews/0101/mdcontfcb0101.htm>> Acesso em: 26 out 2001.

ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. **Immunol. Today**, v. 21, n. 2, p. 73-78, 2000.

EL-SAFI, S. H. et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Atbara River área, eastern Sudan: the outbreak of Barbar El Fugara village (1996-1997). **Microbes Infect.**, v. 4, p. 1439-1447, 2002.

FRANÇA-SILVA, J. C. et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic área of Montes Claros municipality, Minas Gerais state, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 111, p. 161-173, 2003.

FUNASA. **Leishmaniose visceral, aspectos epidemiológicos.** Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br/index.htm>> Acesso em: 12 set 2001.

FUNASA. **Casos confirmados por unidade da Federação de 1980-2001.** Brasília: Ministério da Saúde do Brasil, 2003. 28p.

GRAZZINELLI, R. T. et al. A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte independent induction of interferon- $\gamma$  by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 6115-6119, 1993.

GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat.** Philadelphia: Saunders Company, 1991. 769p.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for the future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, p. 230-250, 1993.

GUARÍN, N. et al. Comparative immunohistological analysis of Montenegro skin test reaction in asymptomatic infection and acute and chronic cutaneous leishmaniasis. **Biomédica**, v. 26, supl. 1, p. 38-48, 2007.

HEUFLER, C. et al. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon- $\gamma$  production by T helper 1 cells. **Eur. J. Immunol.**, v.26, p. 659-668, 1996.

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

JACKSON, H. A.; ORTON, S. M.; HAMMERBERG, B. IgE is present on peripheral blood monocytes and B cells in normal dogs with atopic dermatitis but there is no correlation with serum IgE concentrations. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 85, p. 225-232, 2002.



KAYE, P. M. et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunol. Rev.**, v. 201, p. 239-253, 2004.

KEENAN, C. M. et al. Visceral leishmaniasis in the german shepherd dog. **Vet. Pathol.**, v. 21, p. 80-86, 1984.

KONTOS, V. J.; KONTINAS, A. F. Old world canine leishmaniasis. **The compendium of small animal**, v. 15, p. 949-959, 1993.

KUMAR, R.; PAI, K.; PATHAK, K.; SUNDAR, S. Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of indian visceral leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 8, p. 1220-1224, 2001.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, v. 237, p. 595-600, 1978.

LEANDRO, C. et al. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 79, p. 237-284, 2001.

LEHTONEN, O. P.; VILJANEN, M. K. Antigen attachment in ELISA. **J. Immunol. Meth.**, v. 34, p. 61-70, 1980.

MAURICIO I. L. et al. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. **Parasitology**, v. 122, p. 393-403, 2001.

MENDES, C. O. et al. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniosis. **Vaccine**, v. 21, p. 2589-2597, 2003.

MONTOYA-LERMA, J. et al. Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lu. longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. **Acta Trop.**, v. 85, n. 1, p. 19-29, 2003.

MORAL, L.; RUBIO, E. M.; MOYA, M. A leishmanin skin test survey in the human population of Alacantí Region (Spain): implications for the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in southern Europe. **Trans. R. Trop. Med. Hyg.**, v. 96, p. 129-132, 2002.

MURRAY, H. W.; HARIPRASHAD, J. Interleukin 12 is effective treatment for an established systemic intracellular infection: experimental visceral leishmaniasis. **J. Exp. Med.**, v. 181, p. 387-391, 1995.

MURRAY, H. W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 82, p. 249-267, 2001.

MUSA, M. A. et al. The natural history of Sudanese post-kala-azar dermal leishmaniasis: clinical, immunological and prognostic features. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 96, p. 765-772, 2002.

NICHOLAS, L. et al. Real-Time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 1666-1669, 2002.

NIETO, C. G. et al. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 67, p. 117-130, 1999.

OLIVEIRA, M. A. P. et al. *Leishmania* sp: Comparative study with *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* in their ability to initialize IL-12 and IFN- $\gamma$  synthesis. **Exp. Parasitol.**, v. 95, p. 96-105, 2000.

PARANHOS-SILVA, M. et al. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p. 39-44, 1996.

PARANHOS-SILVA, M. et al. Skin reactions to thimerosal and *Leishmania* in dogs from a leishmaniasis endemic area: it is better to keep them apart. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 01-03, 2001.

PARANHOS-SILVA, M. et al. A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. **Vet. Parasitol.**, v. 114, p. 97-111, 2003.

PASPARAKIS, M. et al. Peyer's patch organogenesis is intact yet formation of B lymphocyte follicles is defective in peripheral lymphoid organs of mice deficient for tumor necrosis factor and its 55-kDa receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 6319-6323, 1997. Erratum in: **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 9510, 1997.

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Am. Soc. Microbiol.**, v. 62, p. 229-235, 1994.

PINELLI, E. et al. *Leishmania infantum* – specific Tcell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, p. 1594-1600, 1995.

PINELLI, E. et al. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum* – infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 237-243, 1999.

PORROZZI, R. et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in dogs. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 14, n. 5, p. 544-548, 2007.

PRASHAD, L. S. N. Kala azar. **Indian J. Pediatr.**, v. 66, p. 539-546, 1999.

QADOUMI, M.; DONHAUSER, N.; RÖLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 4638-4642, 2002.

QIAO, Z.; MILES, M. A.; WILSON, S. M. Detection of parasites of the *Leishmania donovani*-complex by a polymerase chain reaction-solution hybridization enzyme-linked immunoassay (PCR-SHELLA). **Parasitology**, v. 110, p. 269-275, 1995.

QUINNELL, R. J. et al. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 1421-1424, 2001.

QUINNELL, R. J. et al. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 91, p. 161-168, 2003.

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 183p.

RODRÍGUEZ-CORTÉZ, A. et al. Leishmania-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters in canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 116, p. 190-198, 2007.

SANTIAGO, H. C. et al. Coinfection with *Toxoplasma gondii* inhibits antigen-specific Th2 immune responses, tissue inflammation, and parasitism in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 4939-4944, 1999.

SANTOS-GOMES, G. M. et al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 88, p. 21-30, 2002.

SHIDDO, S. A. et al. Visceral leishmaniasis in Somalia. Significance of IgG subclasses and of IgE response. **Immunol. Lett.**, v. 50, p. 87-93, 1996.

SEDGWICK, J. D.; RIMINTON, D. S.; CYSTER, J. G.; KORNER, H. Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. **Immunol. Today.**, v. 21, p. 110-113, 2000.

SIDDIG, M.; GHALIB, H.; SHILLINGTON, C. D.; PETERSEN, E. A. Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. **Trans. R. Trop. Med. Hyg.**, v. 82, p. 66-68, 1988.

SILVA, E. S. et al. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 285-291, 2001.

SILVA, T.C. **A resposta imuno-inflamatória na Leishmaniose Tegumentar Humana.** 1999. 118f. Dissertação (Doutorado em Patologia)- Universidade Federal da Bahia. Salvador.

SINGH, S.; VEENA, K.; SINGH, N. Predicting kala-azar disease manifestations in asymptomatic patients with latent *Leishmania donovani* infection by detection of antibody against recombinant K39 antigen. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, n. 3, p. 568-572, 2002.

SNOWDEN, K.; HOMMEL, M. Antigen detection immunoassay using dipsticks and colloidal dyes. **J. Immunol. Methods**, v. 140, p. 57-65, 1991.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. The ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Vet. Parasitol.**, v. 90, p. 37-45, 2000.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. **Vet. Parasitol.**, v. 96, p. 265-276, 2001a.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Evaluation of the efficacy of two leishmanins in asymptomatic dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 102, n. 1-2, p. 163-166, 2001b.

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

SVS-DASIS. Vigilância em Saúde: Dados e indicadores selecionados. **Bol. Epidemiol.**, Brasília, v. 4, 2004.

SVS. Leishmaniose Visceral. C.V.E. **Leishmaniose visceral americana**. Disponível em: <[http://dtr2001.saude.gov.br/svs/epi/situacao\\_doencas/transmissiveis00.htm](http://dtr2001.saude.gov.br/svs/epi/situacao_doencas/transmissiveis00.htm)> Acesso em: 17 nov 2004.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and its role in the generation of Th1 cells. **Immunol. Today**, v. 14, p. 335-337, 1993.

VERCAMMEN, F. et al. Follow-up of *Leishmania infantum* naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and Western blot. **Acta Trop.**, v. 84, n. 3, p. 175-181, 2002.

WILLIAMS, J. E. *Leishmania* and *Trypanosoma*. In: GILLESPIE, S. H.; HAWKEY, P. M. (Eds.). **Medical Parasitology – a practical approach**. USA: Oxford University Press, 1995.

WILSON, M. E. et al. Suppression of IFN-gamma in hepatic granulomas correlates with tissue-specific replication of *Leishmania chagasi*. **J. Immunol.**, v. 156, n. 6, p. 2231-2239, 1996.

ZERPA, O. et al. Epidemiological and immunological aspects of human visceral leishmaniasis on Margarita Island, Venezuela. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 8, p. 1079-1083, 2002.