



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e  
Medicina Investigativa**

**TESE DE DOUTORADO**

**CONTRIBUIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DE UMA  
VACINA CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

**NAIARA CARVALHO TEIXEIRA BAGUES**

**Salvador- Bahia  
2016**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e  
Medicina Investigativa**

**CONTRIBUIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DE UMA  
VACINA CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

**NAIARA CARVALHO TEIXEIRA BAGUES**

Orientador: Geraldo Gileno de Sá Oliveira.  
Co-orientadora: Cristiane Garboggini M. de Pinheiro.

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, para a obtenção do grau de Doutora.

**Salvador- Bahia  
2016**

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

B148c Bagues, Naiara Carvalho Teixeira  
Contribuição para o desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose  
visceral canina. / Naiara Carvalho Teixeira Bagues. - 2016.  
98 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira, Laboratório de  
Patologia e Biointervenção.

Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) –  
Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2016.

1. Leishmaniose visceral. 2. Baço. 3. Vacina. 4. Carga parasitária. 5. Cão.  
I. Título.

CDU 616.993.161

"CONTRIBUIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA CONTRA LEISHMANIOSE  
VISCERAL CANINA"

NAIARA CARVALHO TEIXEIRA BAGUES

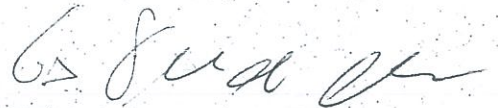
FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



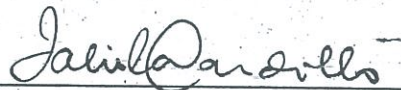
---

Dr. Ricardo Riccio Oliveira  
Professor Titular  
CPqGM/FIOCRUZ



---

Dr. Lucas Pedreira de Carvalho  
Professor Titular  
CPqGM/FIOCRUZ



---

Dra. Fabiola Cardillo  
Professor Titular  
CPqGM/FIOCRUZ

## DEDICATÓRIA

*Dedico a meu Pai Joaquim Lopes  
Teixeira (in memoriam)*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus orientadores Dr. Geraldo Gileno e Dra. Cristiane Pinheiro pelo apoio e incentivo durante todo o desenvolvimento do doutorado. Agradeço pela convivência, confiança e sugestões preciosas na elaboração do trabalho.

Aos pesquisadores Dr. Washington Luis, Dr. Lain Pontes-de-Carvalho, Dra. Patrícia Veras e Dra. Deborah Fraga pelas colaborações e sugestões dadas.

Ao CPQGM (Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz) e a PgBSMI (Pós-Graduação em Biotecnologia em saúde e Medicina Investigativa) pela infraestrutura disponibilizada para o desenvolvimento do estudo.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao Programa Brasil Sem Miséria pelo financiamento do projeto e pela bolsa de estudo concedida durante a execução deste trabalho.

À Elivani Sacramento, técnica e amiga do LPBI, pelos auxílios em experimentação sempre que necessário.

Aos técnicos Sérgio, Liliane e Rafela pelo apoio em suas respectivas áreas de serviço.

Às bibliotecárias do CPqGM, pelas orientações na elaboração da versão final desta tese.

A todos os amigos do LPBI e em especial aos amigos do grupo Bárbara Oliveira, Catiule Santos, Jéssica Mariane, Marcus Vinícius, Maria Carolina e Matheus Moreno pelo incentivo, conselho e carinho sempre que necessário.

Ao meu marido Thiago Bagues pelo amor e companheirismo dedicados a mim ao longo de todos esses anos.

A minha mãe e meus irmãos por cada gesto de amor e incentivo ao longo de toda a minha vida.

BAGUES, Naiara Carvalho Teixeira. Contribuição para o desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose visceral canina. 98 f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A Leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa e parasitária que se encontra em expansão no Brasil. A espécie que causa a doença no Brasil é a *Leishmania infantum*. O cão é o principal reservatório do parasita. Uma vacina contra leishmaniose visceral canina (LVC) pode favorecer o controle da doença. Este trabalho tem como objetivo contribuir para o desenvolvimento de uma vacina contra LVC.

**OBJETIVO:** O estudo do primeiro capítulo visou o desenvolvimento de um modelo para a avaliação de antígenos candidatos à vacina contra LVC. **METODOLOGIA:** Um experimento foi realizado para obtenção de cães resistentes a LVC. Os linfócitos dos animais deveriam ser capazes de reconhecer antígenos potencialmente úteis para o desenvolvimento de uma vacina. Para isso, uma cepa de *L. infantum* foi isolada de cão naturalmente infectado e doente (Camaçari, Bahia). Seis cães adultos e sadios foram inoculados com  $1 \times 10^8$  formas promastigotas em fase estacionária de cultura por via dérmica e acompanhados por dois anos. **RESULTADOS:** Os animais apresentaram: 1) área de induração e ulceração rasa no local da inoculação do parasita com cura espontânea em um período inferior a três meses, 2) ausência de manifestações clínicas e de alterações hematológicas e bioquímicas séricas, 3) produção baixa e flutuante de anticorpos da classe IgG reativos a antígenos de *Leishmania*, 4) resposta linfoproliferativa (em 4 de 6 cães) frente a estimulação com antígenos de *Leishmania*, 5) produção baixa de IFN- $\gamma$  em um ensaio realizado com sangue total incubado por 24h com antígenos de *Leishmania* (4 de 5 cães), 6) carga parasitária baixa em aspirado de baço, detectada por PCR em tempo real. **CONCLUSÃO:** Os animais desenvolveram uma forma subclínica da infecção ao lado de resposta imune humoral e celular fracas.

**OBJETIVO:** No segundo capítulo foi testado um ensaio de avaliação da produção de citocinas por células de sangue de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. O quantiFERON modificado permite a avaliação *in vitro* e de maneira rápida da produção de citocinas contra *Leishmania* em animais de área endêmica. **METODOLOGIA:** Antígeno solúvel e antígenos recombinantes de *L. infantum* (rLci2-NT-5R-CT e rLci2-NT-CT) foram produzidos e utilizados no ensaio para a estimulação do sangue total de 27 cães de área endêmica e não endêmica para LVC por 24h. O plasma foi coletado e a produção das citocinas caninas IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  foram quantificadas. **RESULTADO:** Devido a problemas técnicos não foi possível avaliar os dados obtidos e, conseqüentemente, não foi possível caracterizar grupos de animais susceptíveis e resistentes.

**OBJETIVO:** No terceiro capítulo, a carga parasitária e aspectos histológicos em diferentes regiões do baço de cães com LVC foi analisada. **METODOLOGIA:** A carga parasitária e alterações histológicas no baço de 6 cães com LVC foram avaliados por amostragem de três secções inferior, média e superior do órgão. **RESULTADO:** Observou-se uma variação na distribuição na carga parasitária do baço do mesmo animal. Avaliações histológicas (desorganização polpa branca, granulomas, periesplenite, células plasmáticas, e infiltração polimorfonuclear) mostraram uma variação na frequência (granulomas) ou intensidade (periesplenite) no baço de 2 dos 6 cães. **CONCLUSÃO:** Conclui-se que a distribuição da carga parasitária e as alterações histológicas no baço de cães com LV mostram um certo grau de heterogeneidade.

**Palavras-chave:** Cão, Leishmaniose visceral, Baço, Resposta imune, Carga parasitária, Vacina

BAGUES, Naiara Carvalho Teixeira. Contribution to the development of a vaccine against canine visceral leishmaniasis. 98f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Visceral Leishmaniasis (VL) is an infectious parasitic disease which is increasing in Brazil. The species that causes the disease in Brazil is *Leishmaniainfantum*. The dog is the main reservoir of the parasite. A canine visceral leishmaniasis vaccine (CVL) may favor the control of the disease. This paper aims to contribute to the development of a vaccine against CVL.

**OBJECTIVE:** The first chapter study aimed the development of a model for the evaluation of candidate antigens for a vaccine against CVL. An experiment was conducted to obtain resistant dogs to CVL. Lymphocytes of these animals should be able to recognize potentially useful antigens for a vaccine development. **METHODOLOGY:** For this, a strain of *L. infantum* was isolated from naturally infected and sick dog (Camaçari, Bahia). Six dogs and healthy adults were intradermally inoculated with  $1 \times 10^8$  promastigotes in the stationary phase culture and were followed for two years. **RESULTS:** The animals showed: 1) induration area and shallow ulceration in parasite inoculation site with spontaneous healing in a period of less than three months, 2) absence of clinical symptoms and hematological and biochemical changes, 3) low and floating production of antibodies IgG reactive to *Leishmania* antigens, 4) lymphoproliferative response (in 4 of 6 dogs) compared to stimulation with leishmanial antigens, 5) low IFN- $\gamma$  in a test performed on whole blood incubated for 24 h with antigen *Leishmania* (4 of 5 dogs), 6) a low parasite load in spleen aspirates, detected by real-time PCR. **CONCLUSION:** These animals developed a subclinical form of the infection alongside with a weakspecific humoral and cellular immune response and weak cell.

**OBJECTIVE:** The second section was tested in a trial evaluating cytokine production by blood cells of dogs naturally infected with *Leishmaniainfantum*. The modified QuantiFERON allows evaluation both in vitro and quickly production of cytokines against *Leishmania* in animals in an endemic area. **METHODOLOGY:** Soluble antigen and recombinant antigens of *L. infantum* (rLci2-5R-NT-CT and rLci2-NT-CT) were produced and used in the assay for the stimulation of whole blood of 27 animals from endemic and non-endemic area for LVC for 24h. Plasma was collected and cytokine production of canine IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  cytokines were quantified. **RESULTS:** Due to technical some problems, it was not possible to characterize groups of animals susceptible and resistant in relation to modified QuantiFERON assay results.

**OBJECTIVE:** In the third chapter, the parasite load and histological aspects in different regions of the spleen of dogs with CVL were analyzed. **METHODOLOGY:** The parasite load and histological changes in the spleen of 6 dogs with CVL were evaluated by sampling three sections of the spleen (lower, middle and upper section of the organ). **RESULTS:** There was a variation in parasitic load distribution in the spleen of the same animal. Histological evaluations (disorganized white pulp, granulomas, perisplenite, plasma cells, and polymorphonuclear infiltration) showed a variation in the frequency (granulomas) or intensity (perisplenite) in spleen in 2 of 6 dogs. **CONCLUSION:** Therefore, the distribution of the parasitic load and histological changes in dogs spleen with VL show a certain degree of heterogeneity.

Keywords: Dog, Visceral leishmaniasis, Spleen, Immune response, Parasite load, Vaccine



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização clínica, imunológica e parasitária em cães de área endêmica para leishmaniose visceral submetidos a ensaio de quantiFERON modificado.....	64
Tabela 2	Caracterização clínica e imunológica de cães com leishmaniose visceral avaliados quanto a distribuição da carga parasitária esplênica.....	78
Tabela 3	Achados histológicos no baço de cães com leishmaniose visceral avaliados quanto a distribuição da carga parasitária esplênica.....	80

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Acompanhamento de cães inoculados com <i>Leishmania</i> por via dérmica quanto a resposta humoral e celular, produção de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10 e TNF- $\alpha$ e carga parasitária esplênica.....	26
Figura 2	Esfregaço de material aspirado de baço de cão de área endêmica submetido a coloração pelo método de Wright .....	35
Figura 3	Curva de proliferação de <i>Leishmania</i> isolada do cão de área endêmica....	36
Figura 4	Lesão cutânea no local da inoculação experimental da <i>Leishmania</i> em cães.....	37
Figura 5	Avaliação clínico-patológica de cães inoculados com <i>Leishmania</i> por via dérmica.....	39
Figura 6	Avaliação de anticorpos específicos em cães inoculados com <i>Leishmania</i> por via dérmica.....	41
Figura 7	Avaliação da proliferação celular de PBMC cães inoculados com <i>Leishmania</i> por via dérmica.....	43
Figura 8	Avaliação de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10 e TNF- $\alpha$ em cães inoculados com <i>Leishmania</i> por via dérmica.....	46
Figura 9	Determinação da carga parasitária no baco de cães inoculados com <i>Leishmania</i> por via dérmica.....	47
Figura 10	Desenho esquemático de antígenos recombinantes de <i>Leishmania</i> derivados de cinesina .....	58
Figura 11	Avaliação por SDS-PAGE e <i>Western blot</i> de antígenos recombinantes de <i>Leishmania</i> derivados de cinesina purificado.....	66
Figura 12	Avaliação de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ em cães de área endêmica e em cães de área não endêmica para Leishmaniose visceral canina.....	68
Figura 13	Desenho esquemático do baço de cão indicando as áreas das quais foram obtidas amostras para estudo histológico e determinação da carga parasitária .....	75
Figura 14	Carga parasitária em diferentes regiões do baço de cães com leishmaniose visceral .....	79
Figura 15	Achados histológicos do baço de cães com leishmaniose visceral avaliados quanto a distribuição da carga parasitária esplênica.....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>BCIP</b>	5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato
<b>BSA</b>	Soro albumina bovina
<b>CCZ</b>	Centro de Controle de Zoonoses
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementar
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética para o Uso de Animais
<b>CFSE</b>	Carboxifluorêscina succinimidil éster
<b>CMNSP</b>	Células mononucleares de sangue periférico
<b>Con A</b>	Concanavalina A
<b>cpm</b>	Cintilação de partículas betas por minuto
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>DMSO</b>	Dimetilsufóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DPP</b>	Ensaio imunocromatográfico baseado em plataforma de duplo percurso
<b>DTH</b>	Reação de hipersensibilidade tardia
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>ELISA</b>	Ensaio imunoenzimático
<b>EU</b>	Unidade de medida de endotoxina
<b>FML</b>	Fucose-Manose-Ligantes
<b>GM-CSF</b>	Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos
<b>His</b>	Histidina
<b>IFAT</b>	Teste de imunofluorescência indireta
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-thiogalactosídeo
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>LV</b>	Leishmaniose Visceral
<b>LVC</b>	Leishmaniose visceral canina
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>NBT</b>	Nitrozultetrazólio-dimetil formamida
<b>NK</b>	<i>Natural killer</i>
<b>PBMC</b>	Células mononucleares de sangue periférico
<b>PBS</b>	Tampão fosfato tamponado com salina
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PHA</b>	Fito-hemaglutinina
<b>RIFI</b>	Ensaio de imunofluorescência indireta
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SBF</b>	Soro Bovino Fetal
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato e sódio
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
<b>SLA</b>	Antígeno solúvel de <i>Leishmania</i>
<b>SRD</b>	Sem raça definida
<b>TAE</b>	Tris-acetato-EDTA
<b>Th</b>	Linfócitos T auxiliares
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>TNF-<math>\beta</math></b>	Fator de necrose tumoral beta

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
1.1	Aspectos gerais sobre a leishmaniose visceral .....	13
1.2	Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC).....	14
1.3	Aspectos gerais da imunidade contra <i>Leishmania infantum</i> .....	16
1.4	Estratégias utilizadas para o desenvolvimento de vacinas .....	17
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS DO TRABALHO</b> .....	20
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>3</b>	<b>DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO PARA AVALIAR ANTÍGENOS CANDIDATOS A VACINA CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA</b> .....	21
3.1	JUSTIFICATIVA .....	22
3.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	24
3.2.1	Isolamento, caracterização e obtenção do inóculo de <i>Leishmania</i> .....	24
3.2.2	Animais.....	25
3.2.3	Inoculação intradérmica com <i>L. infantum</i> .....	25
3.2.4	Acompanhamento clínico dos cães.....	26
3.2.5	Avaliação clínico-patológica .....	26
3.2.6	Coleta de sangue periférico .....	27
3.2.7	Obtenção de soro .....	28
3.2.8	Obtenção de células mononucleares de sangue periférico .....	28
3.2.9	Preparação de antígenos de <i>Leishmania</i> .....	29
3.2.10	Resposta imune humoral .....	29
3.2.11	Resposta imune celular.....	30
3.2.12	Mensuração de citocinas.....	31
3.2.13	Avaliação da carga parasitária por PCR em tempo real e cultura .....	34
3.2.14	Análise estatística .....	35
3.3	RESULTADOS .....	36
3.3.1	Isolamento, caracterização e preparação do inóculo de <i>Leishmania</i> para injeção intradérmica em cães .....	36
3.3.2	Avaliação clínica de cães inoculados com <i>Leishmania infantum</i> por via dérmica .....	37
3.3.3	Avaliação clínico-patológica de cães inoculados com <i>Leishmania infantum</i> por via dérmica .....	39
3.3.4	Produção de anticorpos específicos em cães inoculados com <i>Leishmania infantum</i> por via dérmica.....	41
3.3.5	Resposta linfoproliferativa em cães inoculados com <i>Leishmania infantum</i> por via dérmica .....	42

3.3.6	Produção de citocinas em cães inoculados com <i>Leishmania infantum</i> por via dérmica	44
3.3.7	Carga parasitária no baco de cães inoculados com <i>Leishmania infantum</i> por via dérmica	47
3.4	DISCUSSÃO	49
3.5	CONCLUSÃO	52
4	<b>AVALIAÇÃO DE CITOCINAS PRODUZIDAS POR CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO DE CÃES DE ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL</b>	53
4.1	JUSTIFICATIVA	54
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	56
4.2.1	Animais	56
4.2.2	Avaliação dos cães	56
4.2.3	Coleta de sangue periférico	57
4.2.4	Antígenos e mitógenos	57
4.2.4.1	Antígeno solúvel de <i>Leishmania infantum</i>	57
4.2.4.2	Antígeno recombinante de <i>Leishmania infantum</i>	57
4.2.5	Avaliação das proteínas recombinantes por SDS-PAGE e <i>Western Blot</i>	61
4.2.6	Mensuração de citocinas: IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$	62
4.2.7	Análise estatística	63
4.3	RESULTADOS	64
4.3.1	Caracterização clínica, imunológica e parasitária dos animais de área endêmica para leishmaniose visceral	64
4.3.2	Produção de citocinas por células de sangue periférico de cães de área endêmica para leishmaniose visceral após a estimulação com antígenos de <i>Leishmania</i>	66
4.4	DISCUSSÃO	70
4.5	CONCLUSÃO	71
5	<b>ESTUDO DA CARGA PARASITÁRIA E ASPECTOS HISTOLÓGICOS EM DIFERENTES REGIÕES DO BAÇO DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL</b>	72
5.1	JUSTIFICATIVA	73
5.2	MATERIAIS MÉTODOS	75
5.2.1	Animais	75
5.2.2	Coleta de amostras de baço	75
5.2.3	Processamento histológico	76
5.2.4	PCR em tempo real	76
5.2.5	Declarações éticas	77
5.2.6	Análise estatística	77
5.3	RESULTADOS	78
5.3.1	Caracterização clínica, imunológica e parasitológica dos cães estudados	78

5.3.2	Avaliação da carga parasitária em diferentes regiões do baço de cães com leishmaniose visceral.....	79
5.3.3	Análise histológica de diferentes regiões do baço de cães com leishmaniose visceral ...	81
5.4	DISCUSSÃO.....	83
5.5	CONCLUSÃO.....	85
6	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>86</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>88</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>97</b>

# 1 REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE A LEISHMANIOSE VISCERAL

A leishmaniose visceral (LV) é endêmica em mais de 80 países e sua prevalência excede 12 milhões de casos no mundo. A cada ano, aproximadamente 500 mil casos de LV ocorrem no mundo, 90% dos casos ocorrem na Índia, Sudão, Sudão do Sul, Nepal, Bangladesh, Etiópia e Brasil (ALVAR et al., 2012; SUNDAR, 2001). Epidemias recorrentes de LV ocorrem na África Oriental (Etiópia, Quênia, Sudão do Sul e Sudão) causando altos índices de morbi-mortalidade nas comunidades afetadas (WHO, 2010).

A LV é uma doença parasitária que se encontra em expansão no Brasil (BRASIL, 2014). É uma zoonose que pode acometer tanto o homem, quanto o cão. O cão (*Canis familiaris*) parece ser o principal reservatório do agente causal (CORREDOR, 1989; DEANE e DEANE, 1954). No Brasil, no período de 2003 a 2012, a média anual de casos de LV foi de 3.565 casos e a incidência de 1,9 caso/ 100.000 habitantes e quando não tratado, o indivíduo pode evoluir para o óbito em mais de 90% dos casos. (BRASIL, 2014)

A LV é causada, na maioria das vezes, por uma das espécies de protozoários do complexo *Leishmania donovani*, composto pela *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* (LAINSON; RYAN; SHAW, 1987). No Novo Mundo, a Leishmaniose visceral (LV) é causada por *Leishmania chagasi*, idêntica à *Leishmania infantum* (MAURÍCIO; STOTHARD; MILES, 2000). A *L. donovani* é a espécie causadora da doença no subcontinente indiano, em partes da Ásia e na África, enquanto que, a *L. infantum* causa uma zoonose na Bacia Mediterrânea, na região central e no sudoeste da Ásia e da América do Sul (DESJEUX, 2001; MAURICIO et al., 1999)

Protozoários do gênero *Leishmania* possuem um ciclo heteroxênico, sendo necessário um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado para completarem seu ciclo de vida. A *Leishmania* é transmitida pela picada de fêmeas de dípteros da família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae* (flebotomíneos), sendo *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie transmissora da *Leishmania infantum* no Brasil (LAINSON et al., 1977). O parasito pode ser adquirido pelo inseto durante a realização do repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, que na forma zoonótica da leishmaniose visceral pode ser o cão. No tubo digestivo do flebotomo, o protozoário se transforma em formas promastigotas, a passa por um processo de multiplicação e mudanças bioquímicas, resultando em formas infectivas chamadas

promastigotas metacíclicas (RITTIG; BOGDAN, 2000). Quando o inseto vetor infectado realiza um novo repasto sanguíneo, promastigotas metacíclicas podem ser inoculadas em um novo hospedeiro vertebrado, que pode ser o homem ou o cão. Após serem fagocitados por macrófagos, essas formas se transformam em amastigotas dentro de fagolisosomas, onde ocorre a multiplicação. A partir daí os parasitos podem disseminar-se para órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear, como por exemplo, baço, fígado, medula óssea e linfonodos (HANDMAN, 2001).

Tanto o homem quanto o cão, podem desenvolver desde um quadro de infecção assintomático até uma doença grave potencialmente letal após terem sido inoculados com *L. infantum* pelo inseto vetor (BRASIL, 2014). Quando ocorre o desenvolvimento da doença, as manifestações clínicas e alterações anatomopatológicas, clinico-patológicas e imunológicas apresentadas são semelhantes no homem e no cão (BRASIL, 2014). Após um período de incubação, alguns cães com doença progressiva podem desenvolver linfadenopatia, dermatite, onicogribose, perda de peso, caquexia, conjuntivite, elevada resposta de anticorpos e uma baixa resposta mediada por células do sistema imune entre outros (SEMIAO-SANTOS et al., 1995).

As medidas para o controle da leishmaniose visceral preconizadas pelo Ministério da Saúde são: 1) diagnóstico precoce e tratamento adequado de casos da doença em humanos; 2) eliminação de cães infectados; 3) utilização de inseticida no domicílio e peri-domicílio em áreas endêmicas para combate ao inseto vetor; 4) atividades em educação em saúde (BRASIL, 2014). Portanto, as medidas recomendadas incluem diagnóstico e tratamento de casos humanos, controle do inseto vetor e eliminação de cães soropositivos (DESJEUX, 2004). No entanto, a eliminação dos cães soropositivos pode ser dada tardiamente, isso ocorre, em parte, porque tais medidas aplicadas pelo Sistema de Saúde são de difícil execução e de alto custo para serem mantidas de forma sistemática e por longos prazos (COURTENAY et al., 2002), o que implicaria em um maior investimento por parte do governo e, além disso, nem todos os cães infectados apresentam-se sintomáticos, mascarando a doença. Ou seja, uma parcela apresenta manifestações clínicas compatíveis com a doença e outra parcela não revela manifestações clínicas (assintomáticos) (MORENO; ALVAR, 2002).

## 1.2 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC)

Cães desempenham papel fundamental na epidemiologia da leishmaniose visceral, sendo considerados os principais reservatórios para a doença humana. Os parasitas se alojam

em órgãos linfóides periféricos e o baço é o órgão que se destaca na filtração do sangue corpóreo (STEINIGER; RÜTTINGER; BARTH, 2003) e conseqüentemente no armazenamento de altas densidades do parasito (REIS et al., 2006). O diagnóstico parasitológico feito pelo encontro de formas amastigotas do parasito em material biológico obtido de medula óssea, linfonodo ou do baço é uma técnica muito confiável. E a detecção precoce de cães infectados em área endêmica é importante para minimizar a expansão da doença e faz parte das medidas preconizadas pelo Ministério da Saúde (MS) para o controle da LV (BRASIL, 2014).

Atualmente existem diferentes testes que podem ser usados para diagnósticos. Os parasitológicos visam a detecção do parasito em esfregaços e imprints, além do isolamento do parasita em cultura; os testes imunológicos utilizam métodos sorológicos (detecção de anticorpos anti-*Leishmania* ex.: ensaio de imunofluorescência indireta (RIFI) e ELISA) (BALEEIRO; PARANHOS-SILVA; C, 2006; DOS-SANTOS et al., 2008) e a amplificação do DNA do parasita por PCR (REIS et al., 2013; SOLCÀ et al., 2012).

Cada teste apresenta seus pontos positivos, mas também os negativos. Apesar de existir uma grande variedade de técnicas, nenhuma apresenta 100% de sensibilidade e especificidade (GONTIJO; MELO, 2004). Por vezes cães assintomáticos podem produzir resultados falso-negativos (ALMEIDA et al., 2005; BRASIL, 2014) ou até mesmo ocorrer reação cruzada com outros parasitas e outras espécies de *Leishmania* (FERREIRA et al., 2007; SCHULZ et al., 2003).

O Ministério da saúde atualmente indica para o diagnóstico imunológico para a pesquisa de anticorpos contra *Leishmania*, o ensaio de imunofluorescência indireta (RIFI), testes rápidos imunocromatográficos e o ensaio imunoenzimático (ELISA). Para o RIFI, consideram-se como positivas as amostras reagentes a partir da diluição de 1:80. Nos ensaios imunocromatográficos são considerados positivos quando a linha controle e a linha teste aparecem na fita ou plataforma. Já o ELISA não está disponível na rede pública de saúde, no entanto, algumas unidades de saúde da rede privada utilizam kits de ELISA registrados e comercializados no Brasil. (BRASIL, 2014)

Estudos que utilizaram as técnicas de biologia molecular (ex.: reação em cadeia da polimerase em tempo real) descrevem alta sensibilidade e especificidade (MIRÓ et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2001; SOLCÀ et al., 2012).

Diversos autores sugerem a associação entre os parâmetros clínicos, epidemiológicos, parasitológicos e sorológicos como necessários para o diagnóstico definitivo da leishmaniose visceral canina. Dos-Santos relata que utilização associada de parâmetros parasitológicos e



imunológicos podem melhorar o desempenho e predição da susceptibilidade a LVC (DOS-SANTOS et al., 2008)

### 1.3 ASPECTOS GERAIS DA IMUNIDADE CONTRA *LEISHMANIA INFANTUM*

Ainda não são completamente compreendidos os fatores que predispõem ao desenvolvimento da forma clínica polissintomática ou que promovem o controle, mesmo que temporário, da infecção por *L. infantum* no cão. No entanto, estudos tem demonstrado que a resposta imune no homem e no cão envolvida no reconhecimento e controle de infecções por patógenos intracelulares, incluindo a infecção causada por *L. infantum*, é dependente de linfócitos T específicos com diferenciação Th1 (células T CD4+ e T CD8+) e do estabelecimento de linfócitos T de memória (PINELLI, 1995; KAYE et al., 2004a; PINELLI et al., 1994a).

Linfócitos do tipo Th1 são capazes de produzir diversas citocinas (exemplo: IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-3, fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )) e são responsáveis pela imunidade celular, por reações inflamatórias, e auxílio de linfócitos B para a produção de anticorpos da subclasse IgG2a. Por outro lado, os linfócitos do tipo Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e são responsáveis pela imunidade humoral, reações alérgicas e estímulo de linfócitos B para a produção, predominantemente, de anticorpos da subclasse IgM, IgA e IgG1 (MOSMANN; COFFMAN, 1989)

Cães com doença sintomática podem apresentar febre, anemia, lesões de pele, onicogribose, emagrecimento, hepatoesplenomegalia, linfadenopatias, entre outros sinais da doença (MORENO; ALVAR, 2002). Estudos demonstram que a susceptibilidade está correlacionada com ausência da resposta linfoproliferativa e ausência da produção de citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-2 (PINELLI et al., 1994; RHALEM et al., 1999) e produção de IL-10 que é capaz de suprimir a atividade de células apresentadoras de antígenos e linfócitos T (BACELLAR et al., 2000). A parcela de cães que não apresentam manifestações clínicas, provavelmente, é composta por um subgrupo de animais resistentes, que controlarão a infecção. Embora não existam evidências diretas de todas as etapas do processo de indução de resposta imune Th1 contra a *L. infantum* no homem, no cão e até mesmo no modelo murino, o cenário geral parece ser o descrito a seguir. Células apresentadoras de antígeno, incluindo células dendríticas, capturam os microrganismos invasores, ou fragmentos desses microrganismos, na pele e migram para região T de linfonodo de drenagem (RIBEIRO-

GOMES; SACKS, 2012; THALHOFER et al., 2011). Células dendríticas que amadurecem em condições de estimulação intensa desenvolvem a capacidade de expressar moléculas coestimulatórias e produzir IL-12 (LANGENKAMP et al., 2000). No linfonodo, após processamento de antígenos do protozoário, células dendríticas que expressam peptídeos da *Leishmania* acoplados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (classe I e classe II), moléculas coestimulatórias como (por exemplo, CD80 e CD86) (PINELLI et al., 1999) e produzem IL-12 (KAYE et al., 2004) são capazes de estimular a proliferação e a diferenciação de linfócitos T naíve em linfócitos T efetores (T CD4+ e T CD8+) Th1. Com a diferenciação, as células T CD4+ Th1 produzem IFN- $\gamma$  e fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  nos tecidos afetados pela infecção e essas citocinas ativam mecanismos leishmanicidas (incluindo a produção de óxido nítrico, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e íon superóxido) em macrófagos infectados pelo protozoário (KAYE et al., 2004; MURRAY; CARTELLI, 1983). Além disso, linfócitos T CD8+ também podem produzir IFN- $\gamma$  ou exercer atividade citotóxica sobre células infectadas pela *Leishmania* (TSAGOZIS; KARAGOUNI; DOTSIKA, 2005).

Com a montagem da resposta imune celular específica ocorre o desenvolvimento de linfócitos T de memória (provavelmente linfócitos de T de memória central e de memória efetora), os quais promovem o controle da infecção em longo prazo. Por outro lado, quando acontece uma falha no estabelecimento de resposta imune Th1 em indivíduos inoculados por *L. infantum*, pode ocorrer diferenciação de linfócitos naíve em linfócitos Th2 e/ou de linfócitos T regulatórios (Treg), os quais não contribuem para o controle da infecção e/ou favorecem a instalação da doença. (RAI et al., 2012; ZWINGENBERGER et al., 1990)

#### 1.4 ESTRATÉGIAS UTILIZADAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINAS

São muitas as tentativas de controle da leishmaniose visceral canina, mas uma alternativa para o controle da leishmaniose visceral zoonótica seria a prevenção da infecção canina e/ou da transmissão do parasito do cão para o inseto vetor. Assim, a utilização de uma vacina efetiva para uso canino, culminaria, provavelmente, na redução da incidência de LV humana (DYE, 1996; MORENO; ALVAR, 2002).

Várias estratégias distintas já foram usadas para seleção de antígenos de candidatos a componente de vacina contra leishmaniose como, por exemplo: a) obtenção de uma fração de proteínas, dentro de uma faixa de peso molecular, a partir de lisado de *Leishmania* (MONJOUR et al, 1988), b) identificação de antígenos solúveis de *Leishmania*, fracionados por eletroforese em duas dimensões, e capazes de induzir resposta linfoproliferativa em

indivíduos curados de leishmaniose tegumentar (MELBY; NEVA; SACKS, 1989); c) seleção de uma fração de antígenos de *Leishmania* capazes de ligar-se a fucose e manose (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 1996); d) seleção de plasmídeos de biblioteca de expressão codificando antígenos capazes de induzir resposta imune protetora em camundongos (MELBY et al., 2000)

Vários antígenos candidatos a componente de uma vacina, incluindo Fucose Manose Ligante (FML), proteína quimérica Q, LACK, MML quimérica, cisteína proteases (CPA e CPB), KMPII, TRYP, GP63, A2 e fatores excretados os secretados de formas promastigotas *Leishmania infantum* (LiESP), foram avaliados em associação com adjuvante (entre eles, saponina Quil A, uma fração de saponina denominada QA-21 e MPL-SE) em camundongos e em cães, mostrando graus variados de proteção contra a infecção causada pelo desafio experimental (GRADONI, 2015)

A avaliação da resposta imune de indivíduos após a administração de antígenos produzidos por DNA plasmideal vem sendo realizada. Além disso, formulações que favoreçam a distribuição de plasmídeos, a otimização de plasmídeos (com otimização de códons) (SCHNEIDER; GREENE; ALLISON, 1997), a adição de sequência líder para promover a secreção de proteínas (YANG et al., 2001) e métodos para aumentar a entrada de plasmídeo em células teciduais e, conseqüentemente, promover a expressão de proteínas recombinantes codificadas pelo plasmídeo, têm sido desenvolvidas (AIHARA; MIYAZAKI, 1998).

Muitos experimentos são realizados no sentido de caracterizar a resposta imune induzida por antígenos candidatos à vacina contra LV canina, incluindo parasitas vivos ou mortos, antígenos purificados, antígenos recombinantes, bactérias vivas expressando antígenos recombinantes e plasmídeos codificando antígenos (MIRÓ et al., 2008).

No Brasil, há mais de três décadas pesquisadores vêm trabalhando com o objetivo de desenvolver uma vacina contra leishmaniose visceral canina. As formulações vacinais que foram estudadas de forma mais avançada foram elaboradas proteína A2/saponina (comercializada com o nome de Leish-Tec, de *Leishmania infantum*, (FERNANDES et al., 2008) e fatores secretados/excretados de *Leishmania infantum* (LiESAp-MDP, (LEMESRE et al., 2007). Contudo, os resultados obtidos com essas formulações vacinais ainda não foram confirmados de forma independente, usando-se uma metodologia adequada, por outros grupos pesquisa.

Até o presente momento duas vacinas contra leishmaniose visceral canina foram desenvolvidas e avaliadas em Fase III, a Leish-Tec (Hertape, Brasil) e a Canileish (Virbac,

França). A vacina Leish-Tec é formulada com a proteína recombinante de *L. donovani* A2 e saponina Quil A, enquanto que a vacina Cani-Leish é formulada com LiESP e a fração de saponina QA-21.

Em um ensaio de fase III da vacina Cani-Leish, realizado com cães beagle, os animais foram avaliados por 24 meses após alojamento em uma área altamente endêmica. Nesse ensaio, foi observada prevenção do surgimento de manifestações clínicas compatíveis com LV, sendo a eficácia de 68%. A avaliação de parasitismo por cultura de material aspirado de medula ou linfonodo, mostrou que 3 de 41 e 9 de 39 dos animais vacinados e do grupo controle, respectivamente, exibiam infecção ativa (OLIVA et al., 2014).

As vacinas contra leishmaniose visceral canina avaliadas em fase III mostram apenas proteção parcial contra o desenvolvimento da infecção, doença ou transmissão de *Leishmania* de cães infectados para o inseto vetor (BORJA-CABRERA et al., 2002; DA SILVA et al., 2001; FERNANDES et al., 2012; LEMESRE et al., 2007). Isso sugere que continua sendo necessária a seleção de novos antígenos com capacidade proteger cães contra leishmaniose visceral

## **2 OBJETIVOS DO TRABALHO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Desenvolver ferramentas úteis para o desenvolvimento uma vacina contra leishmaniose visceral canina

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desenvolver um modelo para avaliar antígenos candidatos a vacina contra leishmaniose visceral canina;
- Avaliar citocinas produzidas por células de sangue periférico em cães de área endêmica para leishmaniose visceral
- Estudar a carga parasitária e aspectos histológicos em diferentes regiões do baço de cães com leishmaniose visceral.

---

### **3 DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO PARA AVALIAR ANTÍGENOS CANDIDATOS A VACINA CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

### 3.1 JUSTIFICATIVA

Várias estratégias têm sido utilizadas para a seleção ou avaliação de antígenos candidatos a compor uma vacina contra leishmaniose visceral. Muitos pesquisadores selecionaram antígenos baseados em: a) facilidade de isolamento, por exemplo, fatores excretados ou secretados (CIBRELUS et al., 1999), b) separação de moléculas de formas promastigotas em gel de poliacrilamida (FROMMEL et al., 1988), c) separação moléculas de formas promastigotas em gel de poliacrilamida seguida de transferência para membrana de nitrocelulose e reatividade de células mononucleares de sangue periférico humano infectados com *L. donovani* (MELBY; NEVA; SACKS, 1989), e) reatividade de polipeptídeos recombinantes a anticorpos e esplenócitos de camundongos infectados com *L. infantum* (WILSON et al., 1995), f) expressão em formas amastigotas, na ausência de expressão em formas promastigotas, de *L. donovani* (CHAREST; MATLASHEWSKI, 1994), ou g) reatividade de polipeptídeos recombinantes a anticorpos de cães ou seres humanos infectados com *L. infantum* (OLIVEIRA et al., 2011). Vários pesquisadores avaliaram o potencial de antígenos para compor uma vacina contra LV canina pela imunização de camundongos ou cães e estudo da resposta imune induzida (GHOSH; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2002; LEMESRE et al., 2005). Nem sempre existe correlação entre a indução resposta imune protetora em camundongos e em cães (DUNAN et al., 1989; FROMMEL et al., 1988) e a avaliação inicial de antígenos em cães é muito onerosa. Portanto, provavelmente, uma estratégia melhor para a seleção de antígenos candidatos e avaliação inicial seria utilizar células de sangue periférico de cães resistentes a LV que apresentem resposta imune celular específica. Tais cães podem ser obtidos pela inoculação natural ou experimental com *Leishmania*. Em princípio, esses animais apresentam resistência ao desenvolvimento da doença pelo fato do sistema imune deles ter montado resposta imune celular contra alguns antígenos do parasito. Portanto, células mononucleares de sangue periférico desses animais devem ser capazes de revelar os antígenos protetores.

Previamente, Teixeira e colaboradores (TEIXEIRA et al., 2011) imunizaram com lisado de *L. infantum* em adjuvante incompleto de Freund e, posteriormente, inocularam com formas promastigotas da fase estacionária de cultura em cães. Esses animais não desenvolveram manifestações clínicas e apresentaram resposta imune celular específica durante dois anos de acompanhamento. Provavelmente, tais animais desenvolveram resistência contra LV e células mononucleares de sangue periférico deles poderiam ser úteis

para a seleção de antígenos candidatos. Infelizmente, a administração de adjuvante incompleto de Freund promoveu o aparecimento de abscesso no local da injeção, impedindo o uso desse modelo para a seleção de antígenos candidatos. Uma alternativa para a obtenção de cães resistentes a LV seria a inoculação de *Leishmania*, em cultura de promastigotas na fase estacionária, por via intradérmica (Eugenia Carrillo e Francisco Javier Moreno, Instituto de La Salud Carlos III, Madrid/ Espanha, comunicação pessoal, dados não publicados).

No presente trabalho, foi avaliada a inoculação de *Leishmania* por via dérmica visando a obtenção de um modelo de cães resistentes a LV útil para a seleção ou avaliação de antígenos candidatos a vacina contra LV canina



## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Isolamento, caracterização e obtenção do inóculo de *Leishmania*

No curso da implementação de medidas de controle da LV por parte de agentes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Camaçari, Bahia, um cão foi identificado com resultados positivos no ensaio imunocromatográfico baseado em plataforma de duplo percurso (DPP) com antígeno rK28, (BioManguinhos)]. O animal também apresentava manifestações clínicas compatíveis com LV, incluindo perda de peso, linfadenopatia, onicogrifose e ceratoconjuntivite. Esse animal também foi submetido à punção aspirativa de baço guiada por ultrassonografia, conforme método descrito previamente (BARROUIN-MELO et al., 2004) com permissão do proprietário, o que resultou no encontro do parasito. O animal foi submetido à eutanásia e pequenos fragmentos de regiões diferentes do baço foram coletados, macerados e ressuspensos em meio de cultura Schneider (Sigma Aldrich, St Louis, Missouri, EUA) com dimetilsulfóxido (DMSO) a 20% e armazenados em nitrogênio líquido.

O material aspirado do baço foi usado para fazer esfregaços em lâmina de vidro e submetido à coloração pelo método de Wright e examinado ao microscópio óptico.

Amostras da suspensão de tecido esplênico armazenada em nitrogênio líquido foram descongeladas e colocadas em meio de cultura bifásico [ágar-sangue e meio de cultura Schneider contendo 20% de Soro Bovino Fetal (SBF, Gibco BRL Life Technologies, Nova York, EUA). Depois da observação de formas promastigotas sob o microscópio invertido, foram feitas passagens sucessivas do parasita em frascos plástico em meio Schneider contendo 20% de SBF. Ao longo de duas passagens sucessivas foi determinada a curva de proliferação da *Leishmania*. Além disso, uma amostra da cultura foi enviada ao Laboratório de Referência Nacional para Tipagem de *Leishmania* [Coleção de *Leishmanias* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro] para caracterização da espécie de *Leishmania*, realizada pelo método de eletroforese de enzimas (registro RE-020/2013, CAM/BR2013/CAO01).

Para preparação do inóculo, 7,5 mL da cultura de *Leishmania* em meio Schneider contendo 20% de SBF que estava em fase estacionária foi centrifugada a 2.500 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente e o sedimento foi ressuspensão em PBS a 1 x 10<sup>9</sup>/ mL e armazenado em gelo até o momento do uso.

### 3.2.2 Animais

Foram usados 12 cães adultos, 4 machos e 8 fêmeas, sem raça definida, com idade entre 2 e 3 anos. Esses animais foram doados pelos seus proprietários quando tinham cerca de 60 a 90 dias de idade. Os animais foram mantidos no canil de experimentação do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM/ FIOCRUZ) recebendo ração industrializada e água *ad libitum*. Além disso, os cães foram tratados com vermífugos, vacinados contra raiva em cão e contra as principais doenças infecciosas que acometem a espécie, como por exemplo, leptospirose, cinomose, adenovirose, virose causada por parainfluenza, parvovirose, hepatite viral e coronavirose.

Dois grupos de 6 cães cada foram formados, um grupo controle e um grupo teste. Tanto o grupo controle quanto o grupo teste foram formados com 2 machos e 4 fêmeas cada.

Os cães foram submetidos à punção esplênica, usando-se método descrito previamente (BARROUIN-MELO et al., 2004). O material aspirado do baço dos animais foi submetido a extração de DNA e reação de PCR em tempo real para detecção de DNA de *Leishmania*, conforme método descrito previamente (FRANCINO et al., 2006). O resultado da PCR em tempo real foi negativo para todos os animais.

Todos os procedimentos realizados com os animais no presente estudo foram realizados de acordo com as diretrizes nacionais e internacionais e foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM – FIOCRUZ), sob protocolo de nº. 021/2011.

### 3.2.3 Inoculação intradérmica com *L. infantum*

Os cães do grupo controle foram utilizados apenas como doadores de sangue para uso como controle negativo nos ensaios realizados *in vitro*.

Os animais do grupo teste foram injetados com 100 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, NaCl a 137 mM, KCl a 2,68mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 9,58 mM e NaK<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 1,47 mM) por via dérmica no lado esquerdo do abdômen. Além disso, cada animal do grupo teste foi inoculado com 1x10<sup>8</sup> formas promastigotas de fase estacionária de cultura de *Leishmania*, em um volume de 100 µL por via dérmica no lado direito do abdômen. O isolamento, caracterização e obtenção do inóculo foram descritos no item 3.2.1. As injeções

foram realizadas usando-se seringas de 1 mL e agulha de 8 x 0,3 mm (BD Pharmingen, San Jose, EUA).

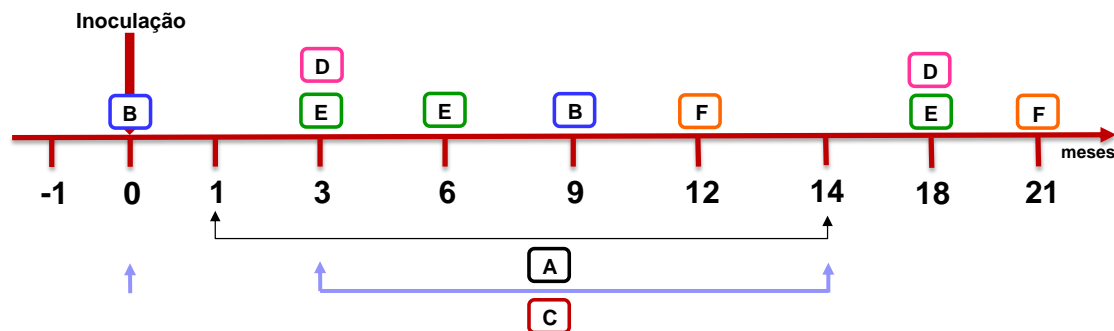
### 3.2.4 Acompanhamento clínico dos cães

Os animais foram avaliados clinicamente pela Dra. Julia Liger de Freitas, médica veterinária, 1, 3, 6, 9, 12 e 14 meses após a inoculação de *Leishmania*. No exame clínico foram avaliados estado geral, temperatura, pele e mucosas, unhas, linfonodos superficiais, fígado e baço. (Figura 1)

Além disso, a pele na região do abdômen foi examinada em busca de área de indução e/ou ulceração 1, 10, 30, 45, 80 e 90 dias após a injeção de PBS ou de inoculação de *Leishmania*.

### 3.2.5 Avaliação clínico-patológica

Para avaliação clínico-patológica, foram realizadas coletas 6 mL de sangue pela veia jugular de cada cão inoculado com *Leishmania*, usando-se seringa e agulha, 1 dia antes e 9 meses após a inoculação. As mostras de sangue foram transferidas para tubos de poliestireno com ou sem anticoagulante (ácido etilenodiamino tetra-acético-EDTA,) (Vacuette, Campinas, São Paulo, Brasil). As amostras de sangue foram usadas para realização de hemograma (eritrograma, leucograma e plaquetograma), dosagem de uréia, creatinina, proteínas séricas (totais, albumina e globulinas) e transaminases [transaminase alanina aminotransferase (ALT), e transaminase aspartato aminotransferase (AST)]. (Figura 1)



**A:** Avaliação clínica: Estado geral, peso, temperatura, aspectos de pele, linfonodos, fígado, baço etc.

**B:** Avaliação hematológica e bioquímica: Hemograma completo, dosagem de enzimas hepáticas, uréia, creatinina, etc.

**C:** Avaliação da resposta imune humoral: Mensuração de IgG no soro por ELISA

Avaliação da resposta imune celular

**D:** Linfoproliferação (ensaio com timidina ou ensaio com CFSE e citometria de fluxo utilizando PBMC em cultura)

**E:** Mensuração de citocinas (IFN- $\gamma$  SN PBMC 48 h por ELISA e IFN- $\gamma$ , IL2, IL10 e TNF sangue total 24 h por Luminex)

**F:** Avaliação do parasitismo no baço (PCR de punção esplênica e cultura)

**Figura 1. Acompanhamento de cães inoculados com *Leishmania* por via dérmica quanto a resposta humoral e celular, produção de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10 e TNF- $\alpha$  e carga parasitária esplênica.** Linha do tempo (em meses) representando as atividades realizadas para avaliação e acompanhamento da geração do modelo canino potencialmente resistente a leishmaniose visceral canina. *Leishmania infantum* foi isolada de um cão naturalmente infectado e inoculada em 6 cães do canil (dia zero). Foram feitas avaliações clínicas (0, 1, 3, 6, 9, 12 e 14) bioquímicas, hematológicas, avaliação da resposta humoral com dosagem de IgG (0, 3, 6, 9, 12, 14), avaliação de resposta imune celular com ensaio de proliferação celular frente a antígeno solúvel de *Leishmania* (3 e 18 meses), mensuração de IFN- $\gamma$  (3 e 6 meses) por ELISA e das citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10 e TNF- $\alpha$ ) no 18º mês com kit Milliplex (Millipore), avaliação da carga parasitária no baço realizada a partir da extração de DNA para a posterior análise de amplificação de DNA de *Leishmania* por PCR em tempo real e busca do parasito no material esplênico através de cultivo (12 e 21).

### 3.2.6 Coleta de sangue periférico

Para a avaliação de anticorpos séricos, foram realizadas coletas de amostras de 6 mL de sangue um dia antes e 3, 6, 9, 12 e 14 meses após a inoculação em cada animal do grupo teste.

Para a avaliação de linfoproliferação e/ou mensuração de citocinas foram realizadas coletas de amostras de 20 mL de sangue após a inoculação de *Leishmania*. As amostras de sangue foram coletadas 18 meses ou 3, 6 e 18 meses de cada animal do grupo controle e teste, respectivamente, após a inoculação de *Leishmania*. As amostras foram coletadas pela veia cefálica.

### 3.2.7 Obtenção de soro

As amostras de sangue coletadas dos cães do grupo teste foram transferidas para tubo de falcon com capacidade de 15 mL e mantidas à 4 °C por cerca de 8 horas. Em seguida os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1.500 x g, à temperatura ambiente. O soro de cada tubo foi coletado e alíquotas de soro foram colocadas em tubos Eppendorf de 1,5 mL. Os tubos foram armazenadas a -20 °C até o momento do uso.

Além disso, alíquotas de soro provenientes de dois cães de Pelotas, Rio Grande do Sul (área não endêmica para LV) (gentilmente cedidas pela Msc Manuela Silva Solcà), e de dois cães oriundos de Jequié, Bahia, apresentando LV, mantidas em nosso laboratório a -20 °C, foram usadas como controle negativo e positivo de ensaio, respectivamente.

Os cães provenientes de Pelotas mostravam-se sadios, sem anticorpos anti-*Leishmania* em avaliação feita pelo ensaio imunoenzimático (ELISA), e exibiam resultados negativos de cultura e PCR em tempo real de material aspirado de baço para detecção de *Leishmania*. Os animais oriundos de Jequié apresentavam manifestações clínicas compatíveis com LV, anticorpos anti-*Leishmania* avaliados por ELISA e resultados positivos para cultura e PCR em tempo real de material aspirado do baço para a detecção de *Leishmania*.

### 3.2.8 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico

A obtenção de CMNSP foi realizada, essencialmente, conforme método descrito por Pereira e colaboradores (PEREIRA et al., 2015). Resumidamente, as amostras de sangue foram diluídas de 1:2 em solução de Hanks (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA) tamponada com 10 mM de HEPES (Sigma Aldrich), pH 7,0, colocadas sobre Ficoll-paque (GE Healthcare, Pittsburgh, EUA) e centrifugadas a 450 x g por 30 minutos a temperatura ambiente. As células localizadas na interface entre o plasma e o Ficoll-paque foram coletadas e lavadas 2 vezes com salina pela centrifugação a 450 x g por 10 minutos a 4 °C. Finalmente, as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL Life Technologies), L-glutamina a 2 mM, (Sigma-Aldrich), e 2-mercaptoetanol 0,01 mM (Sigma-Aldrich) (meio RPMI completo) e ajustadas para a concentração de  $2 \times 10^6$  CMNSP /mL ou lavadas e ressuspensas em PBS /BSA 0,1% (Sigma-Aldrich).

### 3.2.9. Preparação de antígenos de *Leishmania*

Antígenos solúveis de *Leishmania* foram obtidos a partir da cepaMHOM/BR2000/Merivaldo previamente obtida no laboratório a partir de paciente com leishmaniose visceral do município de Jequié, Bahia (BALEEIRO; PARANHOS-SILVA; C, 2006). A cepa foi utilizada para infectar hamster e posteriormente fragmentos de baço de hamster foram macerados e armazenados em nitrogênio líquido até o momento do uso.

Uma alíquota foi descongelada e cultivada em meio de cultura Schneider (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) com pH 7,2 e suplementado com 20 % de soro bovino fetal inativado (meio Schneider suplementado) a 24 °C por 4 dias. As formas promastigotas resultantes foram transferidas a partir de 6 passagens em meio Schneider suplementado para eliminação de debris de tecido esplênico.

Para a obtenção das formas amastigotas, formas promastigotas em uma concentração de  $5 \times 10^6$  parasitos/mL, foram cultivadas a 24 °C, por 3-5 dias, até o início da fase estacionária e posteriormente foram transferidas para estufa 37°C. Após 13 dias de cultivo, formas amastigotas foram lavadas 3 vezes em salina, centrifugando-se a 2.500x g, por 10 minutos a 4 °C. Em seguida, os parasitos em suspensão foram submetidos a lise por 5 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 4 °C e seguido por sonicação (Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, EUA) para fragmentação com aplicação de 10 pulsos de 500 watts, com 20 segundos de duração, com intervalos de 1 minuto entre cada dois pulsos consecutivos, mantendo-se o material sob gelo. A eficiência do processo de lise dos parasitos foi testada visualmente ao microscópio óptico. O lisado foi dividido em duas partes. Uma parte para ser usada sem modificação adicional (denominada lisado total) e a outra parte para ser usado somente o sobrenadante obtido após centrifugação a 3000x g, por 5 minutos a 4 °C (denominado fração solúvel). Várias alíquotas da fração solúvel foram congeladas a -70 °C até o momento do uso.

### 3.2.10 Resposta imune humoral

A detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Leishmania* nos animais do grupo teste foi realizada por ELISA usando-se, essencialmente, o método descrito por Baleeiro e colaboradores (BALEEIRO; PARANHOS-SILVA; C, 2006). Resumidamente, em placas de microtitulação de 96 poços de fundo chato, os poços foram sensibilizados com antígenos

solúveis (SLA) de *Leishmania infantum* na concentração de 3,125 µg/mL (diluídos em tampão carbonato-bicarbonato a 0,06 M, pH 9,6) usando-se 100 µL/poço. Os poços das placas foram lavados com tampão de lavagem (PBS pH 7,2 contendo 0,05% tween 20 (Vetec, Duque de Caxias, Brasil), bloqueados com tampão de bloqueio (PBS pH 7,2, BSA 4 mg/mL, 0,05% tween 20) e, depois, lavados novamente com PBS pH 7,2 contendo 0,05% tween 20. As amostras de soro de cada cão do grupo teste, de Jequié e de Pelotas, foram colocadas duplicadas de poços. As amostras de soro de cão, foram diluídas de 1:800 em solução diluente (PBS pH 7,2, BSA 4 mg/mL, 0,05% tween 20), foram aplicados 100 µL/poço, por 1 hora. Os poços foram lavados e, depois disso, foram acrescentados anticorpos de coelho anti-IgG de cão conjugados a peroxidase (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, EUA) diluídos a 1:8.000 em solução diluente, usando-se 100 µL/poço. As placas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente e, depois disso, os poços foram lavados. O substrato da peroxidase [TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) a 1 mg/mL em tampão fosfato/citrato (fosfato de sódio a 0,046 M, citrato de sódio a 0,022 M, pH 5,0) com 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) e 2 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30 % (v/v)] foi acrescentado aos poços, 100 µL/poço. As placas foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, protegidas da luz. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico a 4 M (Quimex, São Paulo, Brasil). A densidade óptica foi avaliada a 450 nm em um espectrofotômetro (SpectraMax 340PC, Molecular Devices, Califórnia, EUA).

### 3.2.11 Resposta imune celular

A resposta linfoproliferativa frente à estimulação com antígenos de *Leishmania* ou mitógenos foi avaliada em células mononucleares de sangue periférico (CMNSP) pelo ensaio de incorporação de timidina triciada ou pelo ensaio de marcação com carboxifluoresceína succimidil éster (CFSE).

O ensaio de linfoproliferação pela incorporação de timidina triciada a CMNSP foi realizada em placas de microtitulação de 96 poços de fundo chato. Nas placas,  $2 \times 10^5$  CMNSP de cão ressuspensas em meio RPMI completo foram colocadas por poço usando-se um volume de 100 µL/poço. Em triplicatas de poços com CMNSP de cada cão, foram adicionados 100 µL de meio RMPI completo, meio RMPI completo com SLA para alcançar a concentração final de 10 µL/mL ou concanavalina A (Con A) para alcançar a concentração final de 5 µL/mL. As placas contendo CMNSP em meio de cultura ou Con A foram incubadas por 3 dias a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. As placas contendo CMNSP em

meio de cultura ou em meio de cultura com SLA foram incubadas por 5 dias sob as condições descritas acima. Dezoito horas antes do congelamento das células, foram adicionados a cada poço 30  $\mu\text{L}$  de meio RPMI completo contendo 1  $\mu\text{Ci}$  de timidina  $[\text{H}]3+$  (atividade específica 2  $\mu\text{Ci}/\text{mM}$ , Amersham Biosciences, Uppsalla, Suécia). Depois disso, as placas foram armazenadas a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  até o momento da coleta das células. As células foram coletadas em uma membrana de fibra de vidro (Packard, Meriden, EUA) usando-se um coletor de células. Finalmente, a radioatividade na membrana foi determinada em um aparelho Matrix 9600 Direct Beta Counter (Packard, Houston, Texas, EUA)

O ensaio de linfoproliferação com CMNSP marcadas com CFSE (Life Technologies) foi realizado após coloração das células seguindo-se as recomendações do fabricante. Resumidamente,  $1 \times 10^7$  CMNSP de cada cão foram ressuspensas em um volume de 2 mL de PBS com BSA a 0,1 % em um tubo Falcon de 50 ml (BD Falcon, Bedford, EUA) e incubadas com CFSE a 5  $\mu\text{M}$  por 10 min, a  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Cada tubo Falcon foi imerso em gelo picado por 5 min. As células de cada tubo foram lavadas 2 vezes com RPMI base gelado, centrifugando-se a  $450 \times g$  por 10 minutos a  $20\text{ }^\circ\text{C}$ . Depois disso, as células foram ressuspensas em meio RPMI completo e foram colocadas em placas de microtitulação 96 poços de fundo chato. As células foram colocadas a  $2 \times 10^5$ /poço em 100  $\mu\text{L}$ /poço. As duplicatas de poços de cada cão, foram acrescentados 100  $\mu\text{L}$  de meio RPMI completo ou RPMI completo com SLA para concentração final de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ou 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ou fito-hemaglutinina (PHA) (Sigma-Aldrich) para a concentração final de 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As placas foram incubadas por 5 dias a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  em atmosfera úmida com 5% de  $\text{CO}_2$ . As células de duplicatas de poços foram transferidas para um tubo de poliestireno de 5 mL com tampa (BD falcon). A cada tubo foram adicionados 2 mL de PBS 1x. Os tubos foram centrifugados a  $350 \times g$  por 10 minutos a  $20\text{ }^\circ\text{C}$ . Os sobrenadantes foram descartados e as células de cada tubo foram ressuspensas com 250  $\mu\text{L}$  de PBS com formaldeído a 1%. Os tubos foram armazenados a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  protegidos da luz por cerca de 15 h até a aquisição em citômetro. A análise das células de cada tubo foi realizada pela aquisição 10.000 eventos em um citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD Biosciences, New Jersey, EUA), utilizando-se o software FACS Diva. A análise dos dados adquiridos foi realizada usando-se o programa de computador FlowJo versão 7.6.

### 3.2.12 Mensuração de citocinas

A concentração de interferon gama ( $\text{IFN-}\gamma$ ) em sobrenadantes de CMNSP cultivadas por 48 horas e a concentração de  $\text{IFN-}\gamma$ , IL-10, IL-2 e  $\text{TNF-}\alpha$  em plasmas de sangue total



cultivados por 24 horas foram determinadas por ELISA ou por Milliplex (EDM Millipore, Darmstadt, Alemanha), respectivamente.

O ensaio para a avaliação de IFN- $\gamma$  em sobrenadantes de cultura de CMNSP de cães foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços de fundo chato,  $2 \times 10^5$  CMNSP de cada cão, ressuspensas em meio RPMI completo, foram colocadas em cada 12 poços, em um volume de 100  $\mu$ L/poço. Em cada quadruplicata de poços com CMNSP de cada cão foram adicionados 100  $\mu$ L de meio RPMI completo ou RPMI completo com SLA para a concentração final de 10  $\mu$ g/mL ou Con A a 5  $\mu$ g /mL (Sigma-Aldrich). As placas foram incubadas por 48 horas a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Depois disso, o sobrenadante de CMNSP cada cão cultivado em condições idênticas foi coletado em tubo Eppendorf de 1,5 ml. Os tubos foram centrifugados a 400 x g por 10 minutos a temperatura ambiente e os sobrenadantes resultantes foram transferidos para novos tubos Eppendorf e armazenados a -20 °C até o momento do uso.

A determinação da concentração de IFN- $\gamma$  por ELISA foi realizada usando-se anticorpos produzidos pela R&D Systems (Minneapolis, EUA) e seguindo-se as recomendações do fabricante. Resumidamente, placas de microtitulação de 96 poços de alta capacidade de ligação de proteínas (Corning Costar, Nova Iorque, EUA) foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-IFN- $\gamma$  de cão a 2  $\mu$ g/mL (MAB 781, R&D Systems), diluído em PBS, com 100  $\mu$ L/poço. As placas foram incubadas a temperatura ambiente durante cerca de 14 horas. Os poços foram lavados com tampão de lavagem (PBS pH 7,4, 0,05% de tween 20). Os poços foram bloqueados com tampão de bloqueio (PBS pH 7,4, 1% de BSA, 5% de sacarose e 0,05% de azida de sódio) por 1 hora a temperatura ambiente. Os poços foram lavados com solução de lavagem. As amostras de sobrenadante foram testadas em duplicata com 100  $\mu$ L/poço. Para a curva padrão, foram preparadas diluições seriadas duplas de IFN- $\gamma$  canino (R&D systems) começando com a concentração de 8.000 pg/mL e terminando 15,6 pg/mL. Em duplicatas de poços foram colocadas 100  $\mu$ L/poço de IFN- $\gamma$  em cada uma das diluições descritas acima. As placas foram incubadas por 24 horas a 4 °C. Os poços foram lavados com 400 $\mu$ L de tampão de lavagem. Em seguida, anticorpos de cabra anti-IFN- $\gamma$  canino conjugado a biotina (BAF781) a 200ng/mL foram acrescentados 100  $\mu$ L/poço a concentração de 200ng/mL, diluído em PBS com 2% de soro de cabra inativado, e as placas foram incubadas por 2 horas a temperatura. Os poços foram lavados com 400 $\mu$ L de tampão de lavagem. Posteriormente, estreptavidina conjugada a peroxidase (R&D systems) diluída de 1:200 em tampão diluente (PBS pH 7,4, 1% de BSA), foi acrescentada 100  $\mu$ L/poço. As placas foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente,

o substrato da peroxidase (TMB) em tampão fosfato-citrato (previamente descrito) foi adicionado aos poços a 100  $\mu\text{L}$ /poço. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50  $\mu\text{L}$ /poço de ácido sulfúrico a 1 M (Quimex, São Paulo, Brasil). A densidade óptica avaliada a 450 nm em um espectrofotômetro (SpectraMax 340PC, Molecular Devices). A concentração de IFN- $\gamma$  canino foi estimada pela comparação da média dos valores de DO das duplicatas de cada amostra com a curva de calibração, usando o programa GraphPad Prism v.5.0 software (San Diego, EUA) e expressas em pg/mL.

O ensaio para a avaliação de IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-2 e TNF- $\alpha$  em plasma de sangue total (ensaio do quantiFERON modificado) foi realizado em tubo Eppendorf de 2 mL. Amostras de 1 mL de sangue heparinizado de 5 cães do grupo teste e de 3 cães do grupo controle foram colocadas em 6 tubos cada. Os tubos com amostras de sangue receberam 10  $\mu\text{L}$  de PBS, SLA a 5, 10 ou 25 mg/mL. Além disso, amostras de 1 mL de sangue heparinizado diluído de 1:2 ou 1:4 em RPMI completo dos 8 animais mencionados acima, foram colocadas em tubos de 2 mL contendo 10  $\mu\text{L}$  de Con A a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Os tubos foram incubados a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 2.000 x g por 10 minutos a 4°C e o plasma foi coletado e armazenado em quadruplicatas a -20° C até o momento do uso.

Para a mensuração das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-2 e TNF- $\alpha$ , os plasmas foram descongelados e utilizados com o Kit Milliplex (Millipore, Darmstadt, Alemanha), seguindo-se as recomendações do fabricante. Resumidamente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 25  $\mu\text{L}$  da mistura de anticorpos imobilizados em esferas magnéticas. Posteriormente foram acrescentadas 25  $\mu\text{L}$  da curva padrão de citocinas caninas (IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-2 e TNF- $\alpha$ ) em diluição seriada (de 10.000 a 2,44 pg/ mL para IFN- $\gamma$  e de 50.000 a 12,2 pg/ mL para as demais citocinas) em duplicata. Além disso, também foram acrescentadas 25  $\mu\text{L}$  dos plasmas obtidos e descongelados previamente. As placas foram incubadas a 4°C, por aproximadamente 15 h.

Os poços foram lavados com 200  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem 1x (diluído em água deionizada), posteriormente foram acrescentados 25  $\mu\text{L}$  de anticorpo de detecção e a placa foi incubada sob agitação durante 1h em agitador de placas digital (IKA MS3, Staufen, Alemanha). Em seguida, 25  $\mu\text{L}$  de Estreptavidina – Ficoeritrina foram incubadas às placas por 30 minutos, posteriormente lavadas com 200  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem e acrescentadas 150  $\mu\text{L}$  de tampão de ensaio. A intensidade de fluorescência média e a quantidade de cada citocina em pg/mL foi lida em aparelho LUMINEX 200 (Milliplex Analyzer Millipore) com auxílio de um programa computacional software Xponent 3.1. Os ensaios foram realizados na

Plataforma Luminex situada no Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto Oswaldo Cruz/ RJ.

### 3.2.13 Avaliação da carga parasitária por PCR em tempo real e cultura

A determinação da carga parasitária por grama de tecido foi realizada por PCR em tempo real em amostras de aspirado de baço coletadas 12 e 21 meses após a inoculação de *Leishmania*. Os cães foram submetidos à punção esplênica, usando-se método descrito previamente (BARROUIN-MELO et al., 2004). O material aspirado do baço dos animais foi pesado e submetido a extração de DNA e reação de PCR em tempo real para detecção de DNA de *Leishmania*.

A partir de amostras de aspirado esplênico obtidas após a inoculação, o DNA das amostras foi extraído com DNAeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante, e a concentração foi determinada em um espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA). As amostras de tecido foram digeridas com proteinase K overnight (Mary et al., 2004).

O ensaio de PCR em tempo real foi realizado, essencialmente, de acordo com o método descrito por Francino e colaboradores (FRANCINO et al., 2006). Resumidamente, triplicatas de 25 µl de reações foram realizadas com 150 ng de DNA da amostra, *primers* LEISH-1(5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') e LEISH-2 (5'-ACCCCAGTTTCCCGCC-3') e uma sonda FAM-MGB (FAM-5'-AAAATGGGTGCAGAAAT-3'-MGB) de seqüência conservada de mini círculo de DNA de *Leishmania* ou iniciadores específicos e sonda para a detecção de gene 18S rDNA mamíferos (controle negativo, Applied Biosystems, Carlsbad, EUA), 0,2 mg / µL de albumina de soro bovino, e TaqMan mix master (Applied Biosystems). Para a preparação de uma curva de calibração, foram utilizadas quantidades de 0,1-10<sup>5</sup> de DNA de promastigotas de *Leishmania*. As reações foram realizadas e lidas num sistema de PCR em tempo real fast 7500 (Applied Biosystems, Foster City, EUA). A carga parasitária foi expressa por número de *Leishmanias* por 100 mg de DNA)

A partir de amostras de aspirado esplênico obtidas 12 e 21 meses após a inoculação de *Leishmania* nos cães, culturas foram mantidas a 23 °C e examinadas semanalmente sob

microscópio óptico por um mês. A presença de formas promastigotas vivas e ativas foram consideradas como resultado positivo.

### 3.2.14 Análise estatística

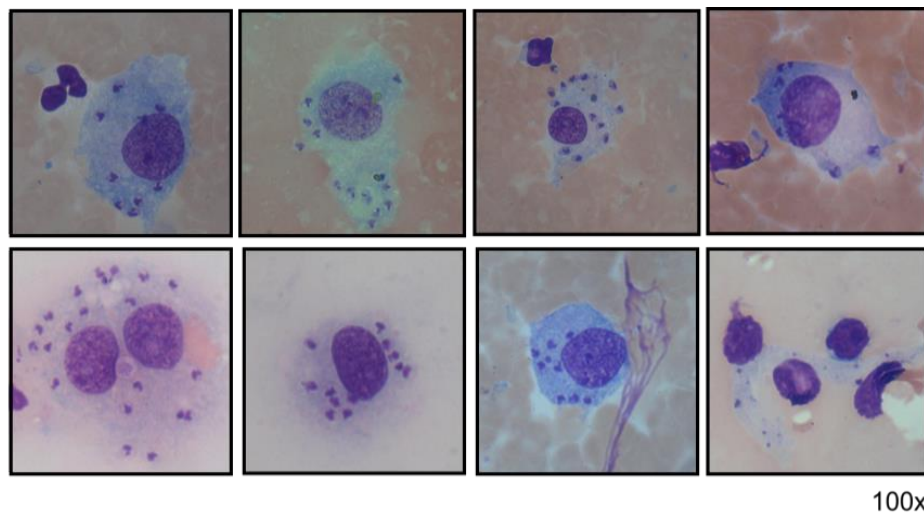
Os gráficos e a maioria das análises foram realizados a partir do software GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA). A proliferação celular foi avaliada de modo qualitativo, comparando a média de proliferação celular dos dois grupos (teste e controle) frente à estimulação com o antígeno solúvel de *Leishmania infantum*.

A produção de anticorpos da classe IgG e a produção das citocinas foram avaliadas através do Teste Não-Paramétrico de Friedman seguido de pós teste de Dunn para comparação adicional entre cada dois grupos. Os valores estabelecidos para a significância estatística foram definidos como: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . A produção de citocinas no grupo controle do ensaio de detecção de citocinas, não pode ser analisada estatisticamente pois só havia 3 animais no grupo.

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Isolamento, caracterização e preparação do inóculo de *Leishmania* para injeção intradérmica em cães

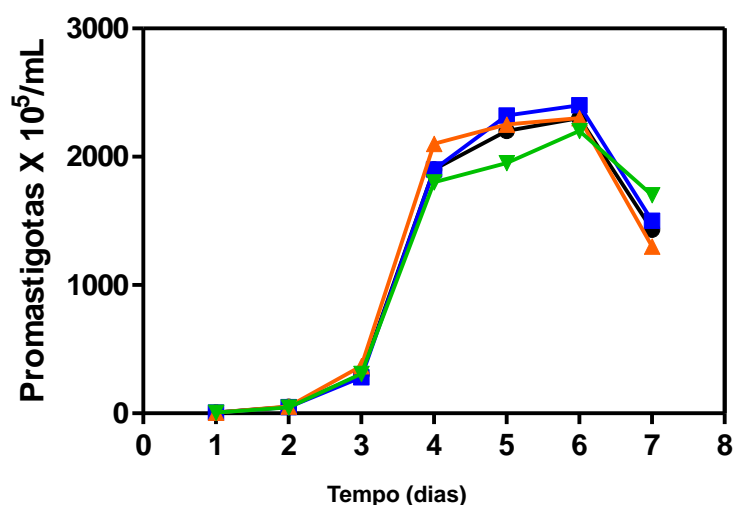
Uma cepa de *Leishmania* foi isolada de um cão de Camaçari, Bahia, com sinais clínicos compatíveis com LV (perda de peso, linfadenopatia, onicogrifose e ceratoconjuntivite), resultado de ensaio imunocromatográfico DPP positivo e apresentando formas amastigotas dentro de macrófagos em esfregaço de material esplênico e coloração pelo método de Wright (Figura 2). O isolamento da *Leishmania* foi realizado após a eutanásia do animal e cultura de macerado de tecido do baço em meio bifásico ágar sangue-Schneider com 20 % SBF.



**Figura 2** Esfregaço de material aspirado de baço de cão de área endêmica submetido a coloração pelo método de Wright. Esfregaço foi realizado a partir da punção esplênica de um cão de área endêmica para leishmaniose visceral canina. O esfregaço de punção esplênica foi realizado em lâminas de vidro que foram posteriormente coradas pelo método Wright e analisadas em microscópio óptico com objetiva de 100x. Foram observadas formas amastigotas de *Leishmania* em macrófagos.

Oito a nove dias após a inoculação de macerado de tecido esplênico em meio ágar sangue-Schneider, foram observadas formas promastigotas de *Leishmania* na cultura. Depois da primeira, as passagens subsequentes foram realizadas em meio Schneider com 20 % SBF. Uma amostra da cultura foi utilizada para identificação taxonômica como *Leishmania infantum* (cepa CAM/BR2013/CAO01) através do método de eletroforese de enzimas pelo serviço do Laboratório de Referência Nacional para Tipagem de *Leishmania* da Coleção de *Leishmanias* do Instituto Oswaldo Cruz – CLIOC.

Para determinar a curva de proliferação e identificar a fase estacionária de crescimento da cepa isolada, foi avaliada a concentração de *Leishmania* em amostras do primeiro ao sétimo dia de cultura da segunda passagem. Pela curva de proliferação, observou-se que no quinto e sexto dia que o parasito havia alcançado a fase estacionária de crescimento. (Figura 3)



**Figura 3. Curva de proliferação de *Leishmania* isolada do cão de área endêmica.** As culturas foram iniciadas com  $1 \times 10^5$ /mL em meio Schneider contendo 20% de SBF e foram acompanhadas por 7 dias até final da fase estacionária. As *Leishmanias* foram cultivadas em quadruplicatas. Os cultivos são representados nas curvas em verde, laranja, azul escuro e preto. De acordo com as curvas de crescimento, a cepa recém isolada CAM/BR2013/CAO01 alcançou a fase estacionária no 5º dia de cultivo.

Formas promastigotas de *Leishmania* da cepa CAM/BR2013/CAO01 na fase estacionária de crescimento, obtidas após cinco dias da terceira passagem de cultura, foram lavadas e ressuspensas em PBS e ajustada em concentração  $1 \times 10^9$ /mL, e 100  $\mu$ L foram usadas para a inoculação intradérmica em cães.

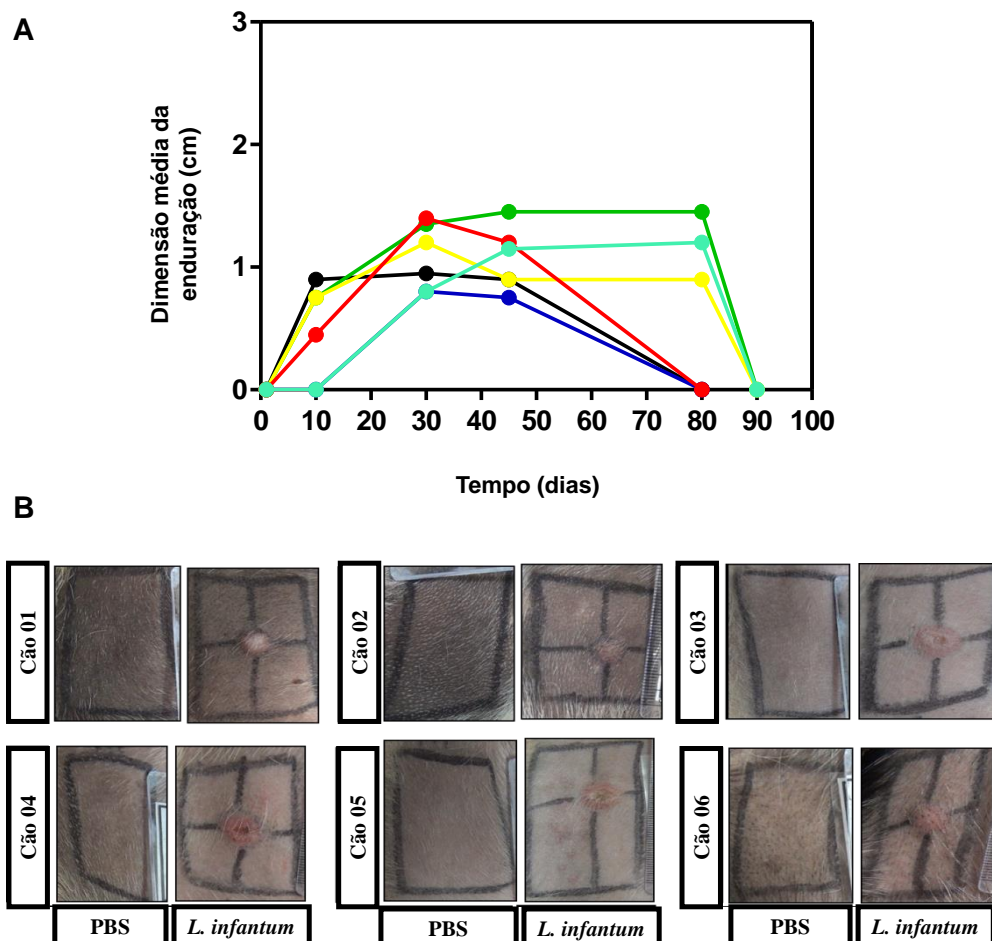
### 3.3.2 Avaliação clínica de cães inoculados com *Leishmania infantum* por via dérmica

Seis animais do grupo teste foram injetados com 100  $\mu$ L de PBS com  $1 \times 10^8$  formas promastigotas de fase estacionária de cultura de *Leishmania*, por via dérmica no lado direito do abdômen.

Avaliação clínica dos animais consistiu na avaliação no local a inoculação. A pele do abdômen do animal foi analisada em busca de área de induração e/ou ulceração 1, 10, 30, 45,

80 e 90 dias após a inoculação de *Leishmania*. As dimensões médias das lesões dos cães foram registradas em diferentes tempos. As médias de todos os 6 cães nos diferentes tempos foram: 0 (tempo 1), 0,47 (tempo 10), 1,08 (tempo 30), 1,06 (tempo 45), 0,59 (tempo 80) e 0 (tempo 90) conforme demonstrado na figura 4.

Na avaliação clínica sistêmica foram avaliados o estado geral, a temperatura, pele e mucosas, unhas, linfonodos superficiais, fígado e baço. Além da presença, a severidade dos sinais clínicos também foram analisados. Não houve qualquer alteração sistêmica ou manifestação clínica característica para leishmaniose visceral canina ao longo dos dois anos de acompanhamento, exceto pela endureção cutânea causada provavelmente por inflamação dérmica no local da inoculação.



**Figura 4: Lesão cutânea no local da inoculação experimental da *Leishmania* em cães.** Cães foram inoculados com  $1 \times 10^8$  *Leishmania* por via intradérmica no lado direito e com PBS do lado esquerdo do abdômen. (A) A média das medidas da lesão foi registrada nos tempos 0, 10, 30, 45, 80 e 90. Os pontos significam a média das medidas da área de endurecimento (cm) obtida por animal. As curvas representam a evolução das medidas das úlceras por cada

animal. (B) Imagens representativas do 30º dia de acompanhamento após a inoculação da *Leishmania*: presença da endureção nos seis animais e formação de ulcera rasa em três animais.

### 3.3.3 Avaliação clínico-patológica de cães inoculados com *Leishmania infantum* por via dérmica

Para avaliação clínico-patológica, amostras de sangue foram usadas para realização de hemograma (eritrograma, leucograma e plaquetograma), dosagem de uréia, creatinina, proteínas séricas (totais, albumina e globulinas) e transaminases [transaminase alanina aminotransferase (ALT), e transaminase aspartato aminotransferase (AST)].

O ensaio de eritrograma consistiu em diversos exames como: contagem de hemácia hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e RDW. Nove meses após a inoculação, as médias dos valores dos animais e o valor de referência para cada parâmetro foram: contagem de hemácia: 7,3 (valor de referência: 5,5 - 8,5 milhões/mm<sup>3</sup>), hemoglobina: 15,9 (valor de referência: 12,0 - 18,0 g/dL), hematócrito: 48,5 (valor de referência: 37,0 - 55,0 %), VCM: 66,7 (valor de referência: 60,0 - 77,0 fL), HCM: 21,9 (valor de referência: 19,0 - 23,0 pg), CHCM: (valor de referência: 32,0 - 36,0 g/dL), RDW: 16,4, (valor de referência: 14,0 - 17,0 %).

O ensaio de leucograma consistiu em leucócitos, neutrófilos segmentados, neutrófilos bastonetes, linfócito, monócito, eosinófilo. Nove meses após a inoculação, as médias dos valores dos animais foram: contagem de leucócitos: 7.200 (valor de referência: 6.000-17.000), neutrófilos segmentados: 4.396 (valor de referência: 3.500 - 11.500), neutrófilos bastonetes: 279,8 (valor de referência: 0 - 300), linfócito: 2.055 (valor de referência: 1.000 - 4.800), monócito: 72 (valor de referência: 150 - 1.350), eosinófilo: 375,7 (valor de referência: 100 - 1.250).

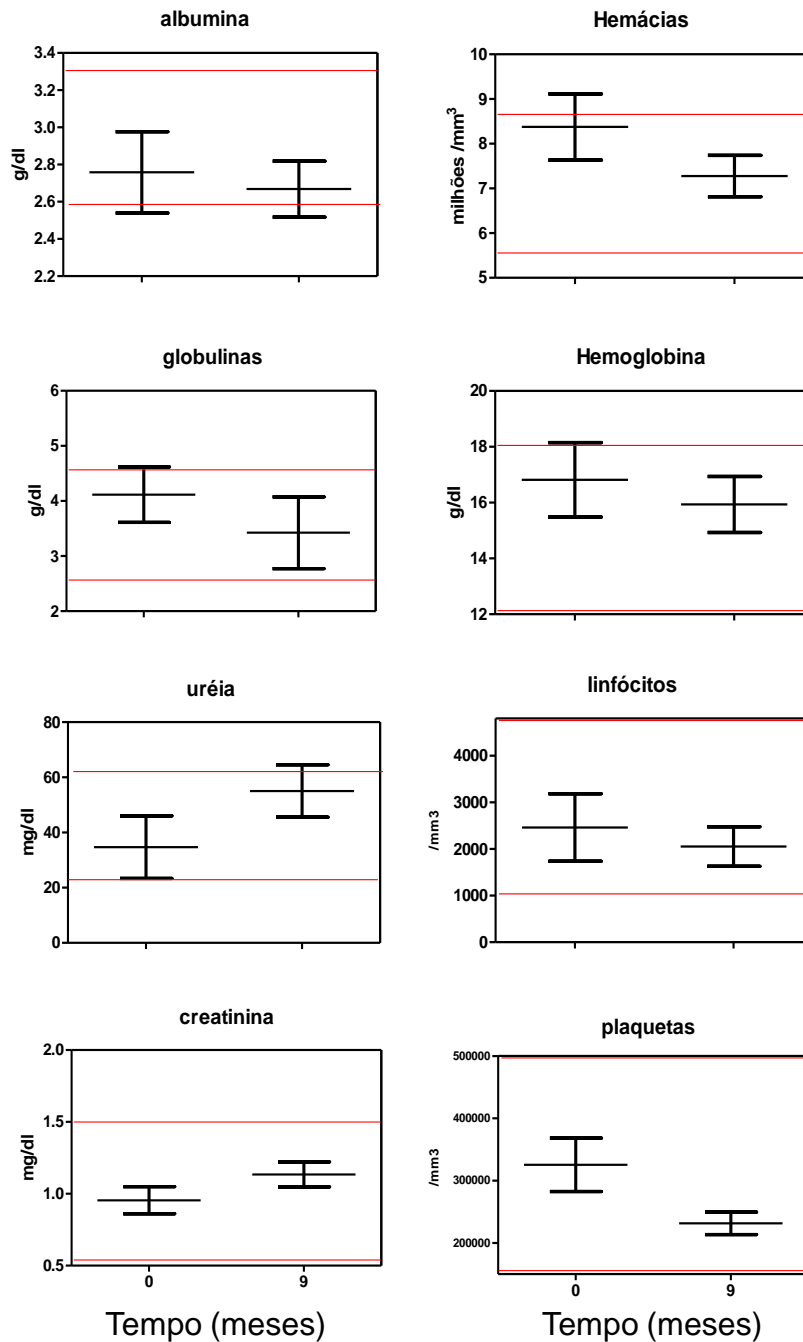
O ensaio de plaquetograma consistiu em contagem de plaquetas: 231.500 (valor de referência: 175.000 - 500.00) e PPT: 6,7 (valor de referência: 6,0 - 8,0)

No ensaio bioquímica sérica, nove meses após a inoculação foram realizadas dosagem de ALT: 85,8 (valor de referência: 21 - 102 UI/L), fosfatase alcalina: 28,6 (valor de referência: 20 - 156 UI/L), proteína total: 6,1 (valor de referência: 5,4 - 7,1 g/dl), albumina: 2,7 (valor de referência: 2,6 - 3,3 g/dl), globulina: 3,4 (valor de referência: 2,7 - 4,4 g/dl), uréia: 55,1 (valor de referência: 21,0 - 60,0 mg/dl) e creatinina 1,1 (valor de referência: 0,5 - 1,5 mg/dl)

Para a maioria dos parâmetros testados, não houve qualquer alteração em relação aos valores de referência, no entanto para contagem de hemácias, dosagem de uréia e creatinina,



dois cães apresentaram valores pouco acima dos valores de referência e para a dosagem de albumina, um cão apresentou valor pouco abaixo do valor de referência (Figura 5).



**Figura 5: Avaliação clínico-patológica de cães inoculados com *Leishmania* por via dérmica.** Cerca de 6mL de sangue foram coletados em momentos distintos e submetidos a análise laboratorial. Diversas análises foram realizadas como: Hemácias, Hemoglobina, VCM, HCM, CHCM, RDW, Leucócitos, Neutrófilos segmentados, Neutrófilos bastonetes, Metamielócitos, Linfócitos, Monócitos, Eosinófilos, Plaquetas, ALT (TGP), Fosfatase Alcalina, Proteínas Totais, Albumina, Globulinas, Uréia, Creatinina. Apenas algumas das análises estão sendo mostradas nos gráficos acima demonstrando que não houve alteração excessiva em relação aos valores de referência (representados nas barras horizontais). Barras vermelhas: valores mínimos e máximos de referência, barra preta: média e desvio padrão.

### 3.3.4 Produção de anticorpos específicos em cães inoculados com *Leishmania infantum* por via dérmica

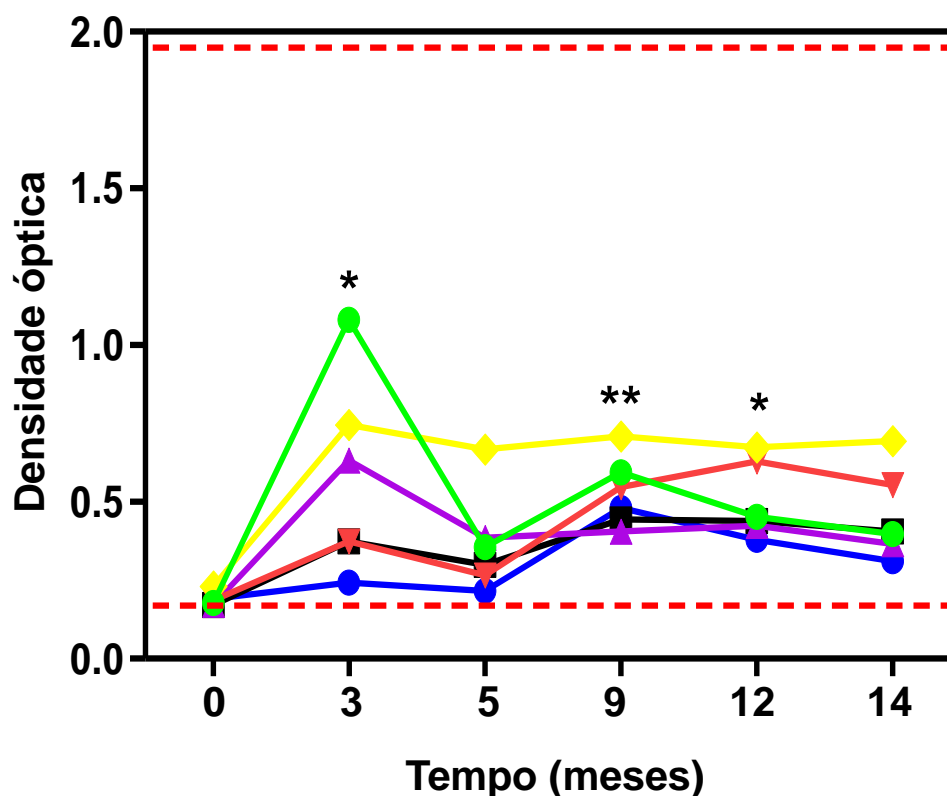
Para a produção de anticorpos específicos em cães inoculados com *Leishmania infantum* por via dérmica, soros dos animais foram coletados antes da inoculação e 3, 5, 9, 12 e 14 meses após a inoculação. A detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Leishmania* nos animais do grupo teste foi realizada por ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) usando-se, essencialmente, o método descrito por Baleeiro e colaboradores (BALEEIRO; PARANHOS-SILVA; C, 2006). Além dos soros de cães do grupo teste, foram utilizados também soros de cães de área endêmica (Jequié, Bahia) e soros de cães de área não endêmica para leishmaniose visceral (Pelotas, Rio Grande do Sul).

O grupo de seis cães inoculados com *Leishmania* exibiu baixos valores de densidade óptica (DO) em ELISA para mensuração de anticorpos da classe IgG anti-*Leishmania*: tempo ( $X \pm SD$ ): antes da inoculação ( $0,19 \pm 0,02$ ), 3 meses ( $0,57 \pm 0,28$ ), 5 meses ( $0,36 \pm 0,15$ ), 9 meses ( $0,53 \pm 0,10$ ), 12 meses ( $0,50 \pm 0,11$ ) e 14 meses ( $0,45 \pm 0,13$ ) (Figura 6)

Os níveis de anticorpos da classe IgG anti-*Leishmania* antes da inoculação apresentavam-se baixos e aumentaram no terceiro mês após infecção experimental por *Leishmania infantum* principalmente para o cão 06 que atingiu o nível máximo de DO após a inoculação (1,1). Nos demais meses de acompanhamento, os níveis de anticorpos foram baixos e oscilantes e mantidos até o 14º mês após a inoculação com valores mínimos de 0,2 e máximo de 0,7 conforme figura 6.

A produção de anticorpos em cada mês foi avaliada através do Teste Não-Paramétrico de Friedman seguido do Pós-teste de Dunn para comparação adicional entre cada mês em relação ao tempo zero. A Produção de anticorpos foi estatisticamente significante aos 3 meses (\*  $p < 0,05$ ), 9 meses (\*\*  $p < 0,01$ ) e 12 meses (\*  $p < 0,05$ ) em relação ao período pré inoculação.

A média de densidade óptica (DO) dos cães controles positivos ( $X \pm SD$ ): ( $2,0 \pm 0,06$ ) e dos cães controles negativos ( $0,25 \pm 0,02$ ) são representadas pelas barras vermelhas conforme figura 6.



**Figura 6 Avaliação de anticorpos específicos em cães inoculados com *Leishmania* por via dérmica.** Sangue periférico de cães experimentalmente infectados com *Leishmania infantum* foi coletado nos tempos 0, 3, 6, 9, 12 e 14 meses pós infecção e o soro foi diluído (1:800) e utilizado para a detecção dos níveis de anticorpos da classe IgG através de ensaio imuno-enzimático (ELISA) e leitura em espectrofotômetro a 450nm. Os pontos significam a produção de IgG em cada animal. As curvas de cada animal são representadas com cores diferentes indicando animais diferentes. As linhas pontilhadas inferior e superior indicam, respectivamente a densidade óptica dos controles negativos e positivos do ensaio. A produção de anticorpos em cada mês foi avaliada através do Teste Não-Paramétrico de Friedman seguido do Pós teste de Dunn para comparação adicional entre cada mês em relação ao tempo zero. Os valores estabelecidos para a significância estatística foram definidos como: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.3.5 Resposta linfoproliferativa em cães inoculados com *Leishmania infantum* por via dérmica

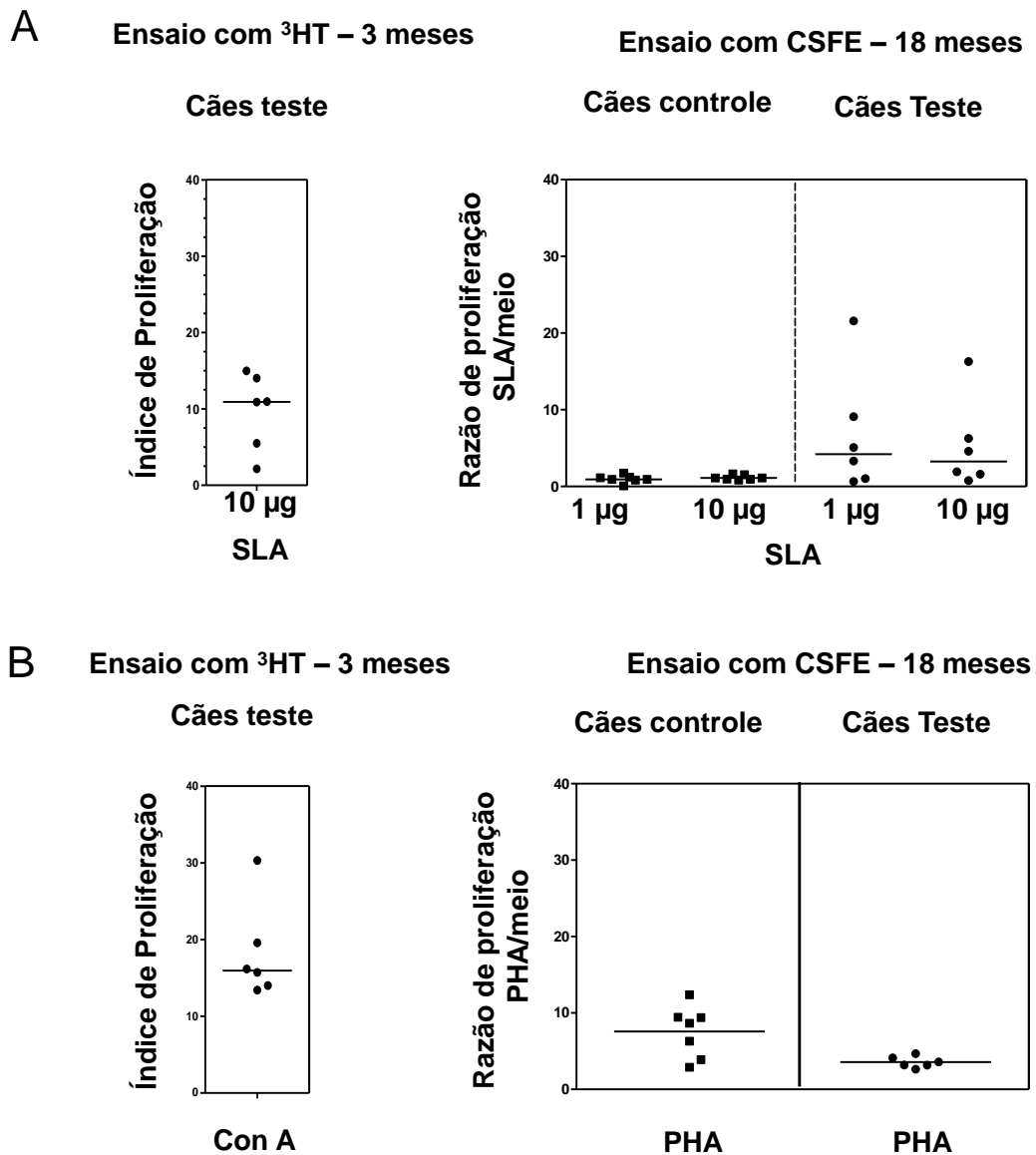
A resposta linfoproliferativa frente à estimulação com antígenos solúvel de *Leishmania* (1 $\mu$ g/mL ou 10 $\mu$ g/mL), ou mitógenos foi avaliada em células mononucleares de sangue periférico (CMNSP) pelo ensaio de incorporação de timidina triciada nos cães inoculados com *Leishmania* (3 meses após a inoculação com *Leishmania*) ou pelo ensaio de marcação com carboxifluoresceína succimidil éster (CFSE) nos cães do grupo controle e nos cães inoculados com *Leishmania* (18 meses após a inoculação).

O grupo de cães inoculados com *Leishmania* por via dérmica, aos três meses, apresentou uma baixa média de índice de proliferação (IP) de CMNSP, com considerável variação dos valores de animal para animal dentro do grupo, quando estimulados *in vitro* com SLA 10µg/mL ( $X \pm SD$ ) ( $9,8 \pm 5,0$ ) ou com Con A ( $18,2 \pm 6,3$ ). (Figura 7).

Dezoito meses após a inoculação, o ensaio de marcação com carboxifluoresceína succimidil éster (CFSE) foi realizado com CMNSP de cães do grupo controle quando estimulados *in vitro* com SLA 1µg/mL, 10µg/mL ou com PHA e os valores ( $X \pm SD$ ) foram, respectivamente, ( $0,98 \pm 0,50$ ), ( $1,17 \pm 0,31$ ) ou ( $7,56 \pm 3,38$ ) após a normalização em relação ao meio. CMNSP de cães do grupo teste quando estimulados *in vitro* com SLA 1µg/mL, 10µg/mL ou com Con A ( $X \pm SD$ ) apresentaram ( $6,79 \pm 7,88$ ), ( $5,24 \pm 5,80$ ) ou ( $3,56 \pm 0,74$ ) respectivamente (Figura 7).

Comparando-se a média e 3 desvios padrão em relação ao grupo controle, observou-se que as células de 4 dos 6 cães proliferaram após estimulação *in vitro* com 1µg/mL ou 10µg/mL de antígeno *Leishmania infantum*. Demonstrando que houve uma fraca resposta imune celular específica ao antígeno solúvel de *Leishmania infantum*.

CMNSP dos animais do grupo teste e do grupo controle respondem ao mitógeno fitohemaglutinina, embora o grupo de animais inoculados com *Leishmania* tenham uma resposta menor frente ao estímulo com o mitógeno (Figura 7).



**Figura 7** Avaliação da proliferação celular de PBMC cães inoculados com *Leishmania* por via dérmica. Sangue periférico foi coletado de animais experimentalmente infectados e animais não manipulados (grupo controle) e PBMC foram isolados e estimulados com (A) antígeno solúvel de *Leishmania infantum* (SLA a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e (B) com os mitógenos concanavalina A ou fito-hemaglutinina. As avaliações foram realizadas aos 3 meses e 18 meses após a inoculação. Barra: mediana da razão entre estímulo e meio de cultura e símbolos: valores individuais. Os dados apresentados foram normalizados em relação ao meio de cultura e foram analisados qualitativamente.

### 3.3.6 Produção de citocinas em cães inoculados com *Leishmania infantum* por via dérmica

A concentração de IFN- $\gamma$  foi avaliada 3 e 6 meses após a inoculação em sobrenadantes de CMNSP cultivadas por 48 horas por ELISA. As concentrações das citocinas: IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-2 e TNF- $\alpha$  foram mensuradas aos 18 meses após a inoculação em plasmas de sangue total cultivados por 24 horas por Milliplex (EDM Millipore, Darmstadt, Alemanha).

Aos 3 e 6 meses após a inoculação de cães por via dérmica com *Leishmania*, CMNSP foram estimuladas *in vitro* com meio, SLA 10 µg/mL e concanavalina A5 µg/mL. Após 48 horas de cultura, os sobrenadantes foram recolhidos e os níveis de IFN-γ foram determinados. Não houve produção de IFN-γ aos três meses pós infecção, quando os CMNSP foram estimulados com meio ( $X \pm SD$ ) ( $0,0 \pm 0,0$ ), SLA ( $6,2 \pm 15,1$ ) e com A( $418,1 \pm 149,8$ ) (Figura 8A) no entanto, 6 meses após a inoculação, quando os CMNSP foram estimulados com meio ( $X \pm SD$ ) ( $1,8 \pm 3,3$ ), SLA ( $120,1 \pm 168$ ) e com A( $562 \pm 364,2$ ), 3 cães produziram IFN-γ após a estimulação com SLA [47 pg/mL (cão # 1), 394 pg/mL (cão # 3), 265 pg/mL (cão #5)] no entanto, a produção não foi estatisticamente significativa em relação as células cultivadas somente com meio de cultura (Figura 8B)

Dezoito meses após a inoculação com *Leishmania*, por razões técnicas, a metodologia utilizada foi a do quantiFERON modificado onde plasmas de sangue total de 5 cães do grupo teste e 3 cães do grupo controle foram estimulados por 24 h com 10 µL de PBS, SLA a 5, 10 ou 25 µg/mL. Ou sangue heparinizado foi diluído na proporção de 1:2 ou 1:4 em RPMI completo foram estimulados com 10 µL de Con A a 5 µg/mL. Com o plasma coletado foi possível quantificar as citocinas IFN-γ, IL-2, IL-10 e TNF-α pelo kit Milliplex (Millipore).

A produção de IFN-γ pelo plasma de cães no grupo controle após estimulação com meio foi: ( $X \pm SD$ ) ( $4,0 \pm 3,4$ ), com SLA 5 µg /mL ( $0,8 \pm 1,4$ ), com SLA 10 µg /mL ( $2,5 \pm 4,3$ ), com SLA 25 µg /mL ( $3,0 \pm 5,1$ ), com con A 1:2 ( $174,3 \pm 102,6$ ) e com con A 1:4 ( $191,9 \pm 52,7$ ). A produção de IFN-γ nos cães inoculados com *Leishmania infantum* após estimulação foi: meio ( $10,2 \pm 9,6$ ), com SLA 5 µg /mL ( $73,2 \pm 5,7$ ), com SLA 10 µg /mL ( $91,7 \pm 23,1$ ,  $p < 0,05$ ), com SLA 25 µg /mL ( $109,4 \pm 28,7$ ,  $p < 0,01$ ). O animal que apresentou menor produção de IFN-γ foi o cão # 1 e o que apresentou maior produção foi o cão # 6. A produção de IFN-γ dos cães inoculados com *leishmania* após estimulação com con A 1:2 e 1:4 foram, respectivamente, ( $485,3 \pm 85,5$ ,  $p < 0,01$ ) e ( $199,1 \pm 100,5$ ).

Não houve produção de IFN-γ após estimulação do plasma dos 3 animais do grupo controle com nenhuma das concentrações de SLA. A mensuração de IFN-γ, reforça os dados encontrados nas primeiras avaliações. Todos os 5 cães do grupo teste analisados no ensaio foram capazes de produzir IFN-γ após a estimulação com as diferentes concentrações de SLA.

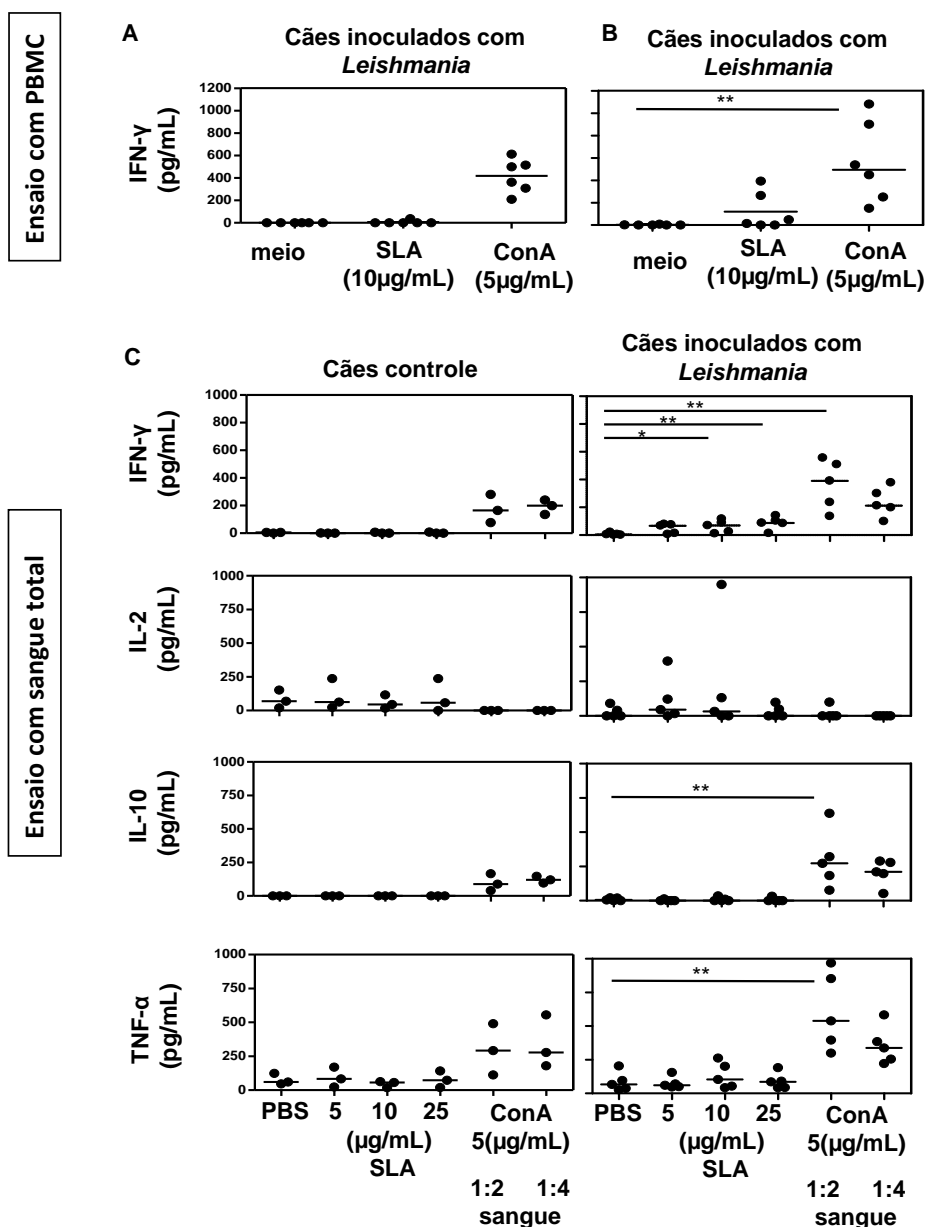
A mensuração da citocina IL-12 em plasma de cães controle foi: ( $80,7 \pm 67,1$ ), ( $108,0 \pm 113,7$ ), ( $59,6 \pm 51,2$ ), ( $98,5 \pm 123,6$ ), ( $0,0 \pm 0,0$ ) ou ( $0,0 \pm 0,0$ ) e em plasma de cães inoculados com *L. infantum* foi: ( $26,3 \pm 40,3$ ), ( $115,9 \pm 163,2$ ), ( $222,9 \pm 409,8$ ), ( $29,7 \pm 44,3$ ),

(20,1 ± 44,9) ou (0,0 ± 0,0), após a estimulação com PBS, SLA 5 µg /mL, SLA 10 µg /mL, SLA 25 µg /mL, con A 5 µg /mL 1:2 ou con A 5 µg /mL 1:4, respectivamente.

A produção de IL10 em plasma de cães do grupo controle foi observada somente após a estimulação com con A 5 µg /mL 1:2 (98,3 ± 63,5) ou con A 5 µg /mL 1:4 (121,2 ± 25,6). Em cães inoculados com *Leishmania*, os valores de média e desvio padrão foram: SLA 5 µg /mL, SLA 10 µg /mL, SLA 25 µg /mL, con A 5 µg /mL 1:2 ou con A 5 µg /mL 1:4, (9,5 ± 10,6), (2,6 ± 5,9), (9,1 ± 15,1), (6,8 ± 14,5), (298,6 ± 211,4, p<0,01) ou (206 ± 94), respectivamente.

A mensuração da citocina TNF-α em plasma de cães controle foi: (77,0 ± 41,4), (91,7 ± 73,6), (46,1 ± 23,9), (78,4 ± 60,9), (298,0 ± 189,0) ou (337,6 ± 194,6) e em plasma de cães inoculados com *L. infantum* foi: (86,6 ± 70,9), (77,1 ± 44,6), (133,2 ± 96), (90,7 ± 60,4), (611,6 ± 289,1, p<0,01) ou (356,6 ± 142,4), após a estimulação com PBS, SLA 5 µg /mL, SLA 10 µg /mL, SLA 25 µg /mL, con A 5 µg /mL 1:2 ou con A 5 µg /mL 1:4, respectivamente.

De modo geral, nenhuma das citocinas analisadas (IL-2, IL-10 e TNF-α), foram produzidas em grandes quantidades quando o plasma, de cães controle e cães inoculados com *Leishmania*, foi estimulado com 10 µL de PBS, SLA a 5, 10 ou 25 µg/mL. Somente foi observada produção estatisticamente significante após o sangue ter sido diluído 1:2 e o plasma de cães inoculados com *Leishmania* terem sido estimulados com Con A a 5 µg/mL e avaliadas quanto a produção de IL-10 (p<0,01) e TNF-α (p<0,01). (Figura 8)



**Figura 8. Avaliação de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10 e TNF- $\alpha$  em cães inoculados com *Leishmania* por via dérmica.** PBMC ou sangue total foram estimulados in vitro na presença de meio, SLA ou concanavalina A. A produção de citocinas foi avaliada no sobrenadante de cultivo de PBMC de cães do grupo teste por ensaio imunoenzimático ELISA para IFN- $\gamma$  (A: 3 meses pós infecção e B: 6 meses pós infecção). C: no plasma de cães controle e teste por ensaio com kit Milliplex (aos 18 meses pós infecção). Barras: medianas; símbolos: valores individuais; análise: Teste Friedman e seguido do Pós teste de Dunn para comparação adicional entre cada dois grupos. Os valores estabelecidos para a significância estatística foram definidos como: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.3.7 Carga parasitária no baço de cães inoculados com *Leishmania infantum* por via dérmica

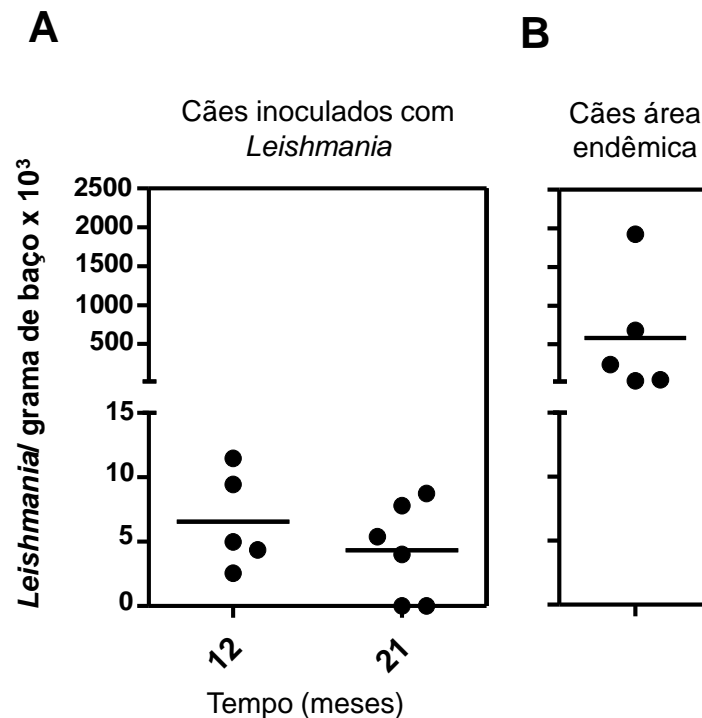
A carga parasitária foi determinada pelo número de *Leishmania* por grama de tecido obtido do baço, por PCR em tempo real. Punção esplênica foi realizada nos seis cães do grupo



teste aos 12 e 21 meses pós-infecção para coleta de amostra (Figura 9). Aos 12 meses após a inoculação, DNA de *Leishmania* foi detectado no baço de 5 dos 6 cães do grupo teste. A carga parasitária foi de 2.554 (cão # 1), 9.443 (cão # 2), 11.462 (cão # 3), 4.362 (cão # 4) e 4.981 (cão # 5) *Leishmania* por grama de baço. Aos 21 meses pós inoculação, DNA de *Leishmania* foi detectado no baço de 4 dos 6 cães do grupo teste. O número de *Leishmania* por grama de baço foi de 4.019 (cão # 1), 7.795 (cão # 2), 8.731 (cão # 3) e 5.400 (cão # 5). Aos 21 meses pós inoculação, tanto no cão # 4 quanto no cão # 6 não foi detectado DNA de *Leishmania*. Aos 21 meses após a inoculação, a carga parasitária em 3 cães foi ainda mais baixas que aos 12 meses após a inoculação.

O parasitismo no baço dos animais do grupo teste é muito baixo quando comparado com o parasitismo no baço de cães naturalmente infectados de área endêmica (dados dos cães de área endêmica do capítulo 3) que podem alcançar níveis: 1.923.213 parasitas por grama de tecido (figura 9).

Não foi observado parasita nas culturas realizadas com o material esplênico coletado nos diferentes tempos.



**Figura 9** Determinação da carga parasitária no baco de cães inoculados com *Leishmania* por via dérmica. Punção esplênica foi realizada em cães 12 e 21 meses após inoculados com *Leishmania*. O DNA do baço de cães foi extraído com Kit DNAeasy e a carga parasitária foi determinada por PCR em tempo real utilizando 150ng de amostras de DNA e o sistema TaqMan como descrito na secção Materiais e Métodos. Os pontos determinam o número de parasitas/ por grama de baço de cada animal x 10<sup>3</sup>.

### 3.4 DISCUSSÃO

Até o momento, não existe uma estratégia capaz de tratar ou controlar a leishmaniose visceral canina de modo efetivo. Com o objetivo de contribuir com o desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose visceral canina, e principalmente, com o estabelecimento de um modelo canino útil para futuramente ser utilizado na triagem de antígenos novos, ou até mesmo já existentes, este trabalho foi desenvolvido. Espera-se que os linfócitos de animais inoculados, naturalmente ou experimentalmente com *Leishmania infantum*, sejam capazes de reconhecer antígenos potencialmente úteis para o desenvolvimento de uma vacina e posteriormente possam compor uma vacina contra leishmaniose visceral canina.

Para o desenvolvimento do modelo, um experimento foi realizado para obtenção de cães resistentes a leishmaniose visceral canina. Para isso, uma cepa de *L. infantum* foi isolada de cão naturalmente infectado e doente (Camaçari, Bahia) e seis cães adultos e sadios foram inoculados com  $1 \times 10^8$  formas promastigotas em fase estacionária de cultura por via dérmica e acompanhados por dois anos. Os resultados deste trabalho sugerem que cães, experimentalmente infectados com  $1 \times 10^8$  promastigotas em fase estacionária por via intradérmica, desenvolvem uma infecção assintomática e subclínica. Isto também é observada em áreas endêmicas para LVC, onde cães naturalmente infectados permanecem assintomáticos ou apresentam doença transitória após a infecção (ALVES et al., 2009). Abranches e colaboradores, demonstrando que ao utilizar formas promastigotas de *Leishmania* recém isolada, o mesmo ocorre. Ou seja, os cães inoculados permanecem assintomáticos (ABRANCHES et al., 1991).

Os animais deste estudo apresentaram uma área de induração e ulceração rasa no local da inoculação do parasita com cura espontânea em um período inferior a três meses. Em trabalho não publicado, Moreno F Job observou que cães inoculados da mesma forma, não desenvolveram sintomas característicos de LVC, no entanto, da mesma forma que neste trabalho, houve reação no local da inoculação da *Leishmania* recém isolada de cão naturalmente infectado. O mesmo tempo de cura para a lesão foi observado em beagles inoculados com *L. mexicana* que desenvolveram úlceras uniformes semelhantes aos observados em humanos, apresentaram respostas imune mista Th1/ Th2 e parasitas foram detectados nas lesões que cicatrizaram com 15 semanas pós-infecção (CRUZ-CHAN et al., 2014). No trabalho atual não foi realizada busca de parasito no local da lesão.

Os animais inoculados com *Leishmania* não apresentaram manifestações clínicas ou alterações hematológicas e bioquímicas séricas, produziram baixos e flutuantes níveis de anticorpos da classe IgG reativos a antígenos de *Leishmania*. Campino e colaboradores inoculou formas promastigotas em 4 cães e estes permaneceram assintomáticos durante todo o período de observação, produziram anticorpos anti antígeno de *Leishmania* e não apresentaram alterações hematológicas nem alterações proteicas. (CAMPINO et al., 2000). Santana e colaboradores avaliaram a sorologia de diferentes grupos de cães: potencialmente resistentes, potencialmente susceptíveis, com susceptibilidade indefinida e não infectados. Os níveis de IgG do grupo de cães potencialmente resistentes a leishmaniose visceral foi  $0,55 \pm 0,39$ . E os níveis de IgG para o grupo potencialmente susceptível  $1,54 \pm 0,91$  (SANTANA et al., 2008) Dado que reforça o enquadramento dos nossos animais teste no perfil potencialmente resistente pois apresentaram IgG em torno de  $0,57 \pm 0,28$  aos três meses após a inoculação.

Além disso, dados na literatura sugerem que a inoculação intradérmica do parasita propicia a estimulação de uma resposta imune celular (KILLICK-KENDRICK et al., 1994; PARANHOS-SILVA et al., 2003; SANTOS-GOMES; CAMPINO; ABRANCHES, 2000), o que favorece o estabelecimento da resistência a doença. O mesmo foi observado em 4 de 6 cães inoculados por via intradérmica, houve resposta linfoproliferativa fraca frente a estimulação com antígenos de *Leishmania*. Três meses após a inoculação intradérmica de *Leishmania*, nem todos os animais respondiam *in vitro* a estimulação com antígeno solúvel de *Leishmania*, isso foi observado também em outros estudos em que a resposta linfoproliferativa *in vitro* era investigada após a infecção por *Leishmania* (BADARO et al., 1986; MORENO et al., 1999). No presente estudo, 4 de 5 cães produziram baixos níveis de IFN- $\gamma$  em um ensaio realizado com sangue total incubado por 24h com antígenos de *Leishmania*. A complexidade na resposta imune protetora muitas vezes parece estar associada não só com estabelecimento de uma resposta imune específica Th1 com linfoproliferação, mas também com a produção de diversas citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-2 e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), após a estimulação *in vitro* com antígenos de *Leishmania* (PINELLI et al., 1994b; RHALEM et al., 1999a).

Em relação a produção de citocinas, os cães apresentam produção de baixos níveis de IFN- $\gamma$  quando estimulado com antígeno solúvel de *Leishmania infantum* e não produziram IL-10. Produziram baixas concentrações de IL-2, TNF- $\alpha$  e apresentam baixa carga parasitária, mesmo em detecção por PCR em tempo real de DNA extraído de material esplênico. Lage e colaboradores observaram que a leishmaniose visceral canina é marcada por uma produção

equilibrada de citocinas Th1 e Th2, com um acúmulo predominante de IL-10, e com um consequente aumento na carga parasitária e a progressão da doença (LAGE et al., 2007). Trabalhos na literatura demonstraram a importância do aumento na produção de IFN- $\gamma$  e baixa produção de IL-10 para se obter uma resposta imune protetora contra *Leishmania* em diferentes testes de antígenos candidatos a vacinas (SANCHEZ et al., 2004). A produção de IL-10 pode contribuir para a gravidade infecção e que essa citocina tem um papel importante na atenuação da resposta imune e, assim, permite que alguns parasitas escape à destruição (KAYE; SCOTT, 2011).

A carga parasitária, em aspirado de baço dos animais inoculados, avaliada por PCR em tempo real apresentou-se baixa. Quando se refere a detecção de *Leishmania infantum*, alguns métodos parasitológicos de isolamento por cultura de tecidos podem ser utilizados como diagnósticos confirmatórios. (BARROUIN-MELO et al., 2004). Já o diagnóstico molecular (reação em cadeia da polimerase (PCR)), apresentam elevada sensibilidade e especificidade (MIRÓ et al., 2008) Reis e colaboradores observaram que cães assintomáticos apresentavam baixo parasitismo tecidual, diferente de cães sintomáticos que têm cargas elevadas de parasitas em vários tecidos, inclusive no baço (REIS et al., 2009). Em nosso estudo, não foi realizada PCR em tempo real com outros tecidos dos cães, nem foram realizados estudos sobre a transmissão para flebótomos por xenodiagnóstico, mas a cultura do aspirado esplênico foi negativa e a carga parasitaria foi baixatanto aos 12 quanto aos 21 meses após a inoculação.

Alguns trabalhos na literatura apontam para a existência de uma correlação entre a susceptibilidade com a resposta imune Th2 através da alta produção de anticorpos, ausência de proliferação de linfócitos, ausência de produção de IFN- $\gamma$  e produção de IL-10, após estimulação *in vitro* com antígenos de *Leishmania* (A. B. NEOGY, A. NANDY, B. GHOSH DASTIDAR, 1987; GHALIB; AHMED; STEVEN, 1993). Por outro lado, existe uma correlação entre o controle da infecção em indivíduos assintomáticos (resistentes) e a resposta linfoproliferativa, alta produção de IFN- $\gamma$  e baixa produção de IL-10, caracterizando uma resposta imune Th1 (JÚNIOR et al., 1997)

A partir dos dados obtidos no trabalho atual, acredita-se que o modelo de cães gerado em nosso laboratório, apesar da fraca resposta imunológica, é potencialmente resistente e que a metodologia utilizada foi promissora uma vez que os animais permaneceram assintomáticos, apresentam níveis baixos e flutuantes de anticorpos IgG anti-*Leishmania*, além de apresentarem resposta linfoproliferativa fraca após a estimulação com SLA. Além disso, 4 dos 6 animais produziram baixos níveis de IFN- $\gamma$  e não produziram IL-10. Os animais

desenvolveram uma forma subclínica da infecção ao lado de resposta imune humoral e celular fracas e modificações no protocolo de inoculação de *Leishmania* e a realização de um protocolo de reforço são necessárias para o aprimoramento do modelo e aumento da resposta imune.

### 3.5 CONCLUSÃO

Cães inoculados com formas promastigotas de fase estacionária de *Leishmania infantum*, recém isoladas, desenvolvem forma subclínica da infecção: ausência de manifestação clínica, ausência de alterações clínico laboratoriais (anemia, albumina/globulina, etc...), carga parasitária baixa por PCR em tempo real e não detectável por cultura, resposta humoral baixa e flutuante e resposta celular fraca (proliferação celular de 4 dos 6 cães e baixa produção de IFN- $\gamma$  e ausência de IL-10). Portanto, os animais mostram-se resistentes, mas com uma resposta imune fraca.

---

## **4 AVALIAÇÃO DE CITOCINAS PRODUZIDAS POR CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO DE CÃES DE ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL**

## 4.1 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose visceral (LV) zoonótica é uma doença causada pela *Leishmania infantum*, que se encontra em expansão no Brasil. A doença afeta principalmente o homem e o cão doméstico, sendo o último o principal reservatório do protozoário (WHO, 2010). O protozoário é transmitido de um indivíduo para outro por algumas espécies de insetos vetores do gênero, *Lutzomyia* ou *Phlebotomus*.

No Brasil, as medidas de controle da LV são baseadas no tratamento de casos humanos, combate ao inseto vetor, identificação e eliminação de cães infectados e medidas de educação em saúde (BRASIL, 2014).

Após a inoculação natural de *Leishmania*, uma parcela de cães mostra-se resistente ao desenvolvimento da doença (MANZILLO et al., 2013) e existe uma correlação entre o desenvolvimento de resistência e o estabelecimento de resposta imune celular específica (PINELLI et al., 1994, 1995 ; Moreno, FJN, comunicação pessoal). A maior parte dos cães com a forma assintomática da infecção por *Leishmania infantum* não transmite o protozoário para o inseto vetor (MICHALLSKY et al., 2007; TRAVI et al., 2002)

Uma ferramenta adequada para a predição da evolução clínica, incluindo infectividade para o inseto vetor, de cães infectados com *Leishmania infantum* poderia contribuir para o controle da LV zoonótica. Os ensaios tradicionais de linfoproliferação e mensuração de citocinas em sobrenadante de cultura, realizados com células mononucleares de sangue periférico, são muito trabalhosos para permitir a análise de grande número de cães de área endêmica para LV.

Provavelmente seja possível utilizar testes baseados na resposta imune celular na definição de um painel que permita a identificação, com melhor acurácia, da infecção por *Leishmania* e susceptibilidade ao desenvolvimento de doença em cães. Recentemente, alguns pesquisadores realizaram uma avaliação de seres humanos com fase aguda da doença, tratados com sucesso, de área endêmica ou de área não endêmica de LV, usando um ensaio previamente desenvolvido para diagnóstico de tuberculose (QuantiFERON) (GIDWANI et al., 2011; SINGH et al., 2012). Nesse teste, uma amostra de 1 mL de sangue heparinizado foi incubada na ausência ou na presença de antígenos de *Leishmania* por 24 h e, depois disso, a concentração de IFN- $\gamma$ , IL-10 e TNF-alfa foi mensurada no plasma. Singh e colaboradores, 2012, observaram que em indivíduos curados (resistentes) havia produção de IFN- $\gamma$  e na ausência de IL-10(SINGH et al., 2012).

Em nosso laboratório, com o objetivo de desenvolver uma vacina contra LV, bibliotecas cDNA e genômicas de *L. infantum* foram construídas de um fago lambda. A partir daí, clones de fago lambda recombinantes foram selecionados pela reatividade a uma mistura de soro de cães naturalmente infectados ou pacientes humanos com LV (MAGALHÃES, 2007; OLIVEIRA et al., 2011). Insetos ou segmentos de inserto de *L. infantum* dos clones de fago lambda foram subclonados em plasmídeo pRSET (Invitrogen) e os correspondentes polipeptídios (antígenos) foram produzidos em *E. coli*. Alguns destes antígenos foram avaliados em diferentes protocolos de imunização em camundongos e em cães (PINHEIRO, 2011), Thiago Bahiense, Fabienne Paiva dados não publicados). Um dos antígenos avaliados foi um polipeptídeo recombinante correspondente a um fragmento carboxila terminal de cinesina denominado rLci2b-NH6 (previamente denominado Lc9). A imunização de camundongos da linhagem BALB/c com rLci2b-NH6 em associação com saponina promoveu a indução de resposta Th1/Th2 enquanto que a injeção de rLci2b-NH6 isoladamente ou associado a outros adjuvantes resultou em resposta Th2 (FRAGA, 2007). A tendência em induzir resposta imune Th2 poderia ser explicada pela presença de domínios repetitivos no rLci2b-NH6 levando a apresentação antigênica via linfócitos B (DEY et al., 2008; GOTO et al., 2006; LINDELL et al., 2008), produção de IL-5 e indução de forte resposta imune humoral. Para avaliar se polipeptídeos contendo apenas domínios não repetitivos codificados pelos genes selecionados das bibliotecas seriam capazes de induzir resposta imune predominantemente Th1, novas construções de DNA foram elaboradas usando a informação do gene *LinJ14\_v3.1180(Lci2)*. Uma dessas construções codificava um polipeptídeo recombinante sem domínios repetitivos (rLci2-NT-CT) e outra codificava domínios não repetitivos e cinco domínios repetitivos (rLci2-NT-5R-CT). Esses polipeptídeos foram produzidos e purificados a partir de *E. coli* (ver Figura 10).

No presente trabalho, avaliou-se a produção de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ ) em sangue total de cães de área endêmica para leishmaniose visceral cultivado por 24 h com antígenos solúveis de *Leishmania*, antígenos recombinantes de *L. infantum* ou PBS (ensaio QuantiFERON modificado).



## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Animais

Foram utilizados 20 cães adultos, 6 machos e 14 fêmeas, sem raça definida. Esses animais são de área endêmica para leishmaniose visceral (Camaçari, Bahia) e foram selecionados para o estudo através da colaboração com o Programa de Vigilância em Endemias do Serviço de Saúde do Estado da Bahia juntamente com colaboração com a Dra. Deborah Bittencourt. Através da permissão dos seus proprietários, os animais foram acompanhados em uma coorte para acompanhamento e avaliação dos animais daquela região (tese em andamento Msc. Manuela da Silva Solcà) e o sangue de alguns desses animais foram utilizados neste estudo.

Foram utilizados 7 cães de área não endêmica, 3 machos e 4 fêmeas, apenas como doadores de sangue para servir como controle negativo dos ensaios. Esses animais são da cidade de Salvador, Bahia e entraram no estudo por colaboração com Dra. Daniela Laranjeira do Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia. Os animais já eram acompanhados rotineiramente no hospital e não apresentavam sintomatologia para leishmaniose visceral canina.

### 4.2.2 Avaliação dos cães

Os cães foram avaliados clinicamente quanto ao estado geral, peso (escore 0: animais com peso normal ou obeso, escore 1: animais magros e escore 2: caquéticos), temperatura, aspectos da pele e mucosas, unhas, linfonodos superficiais, fígado e baço.

Foram testados para a presença de anticorpos anti-*Leishmania* através de ensaio imuno-enzimático (ELISA), teste de detecção do parasito após submetidos a punção esplênica, usando-se método descrito previamente (BARROUIN-MELO et al., 2004). O material aspirado do baço dos animais foi submetido a cultura e a extração de DNA e reação de PCR em tempo real para detecção de DNA de *Leishmania*, conforme método descrito previamente (FRANCINO et al., 2006). Foi avaliado também a resposta imune celular contra antígeno bruto de *Leishmania* pelo teste de reação de hipersensibilidade tardia (DTH). Estes ensaios foram realizados por colaboradores.

### 4.2.3 Coleta de sangue periférico

Para a avaliação de detecção de citocinas: IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ , foram realizadas coletas de amostras de 8 mL de sangue de cada animal do grupo de cães de área endêmica e de área não endêmica. As amostras foram coletadas pela veia cefálica utilizando seringa de 10 mL e agulha 21G

### 4.2.4 Antígenos e mitógenos

#### 4.2.4.1 Antígeno solúvel de *Leishmania infantum*

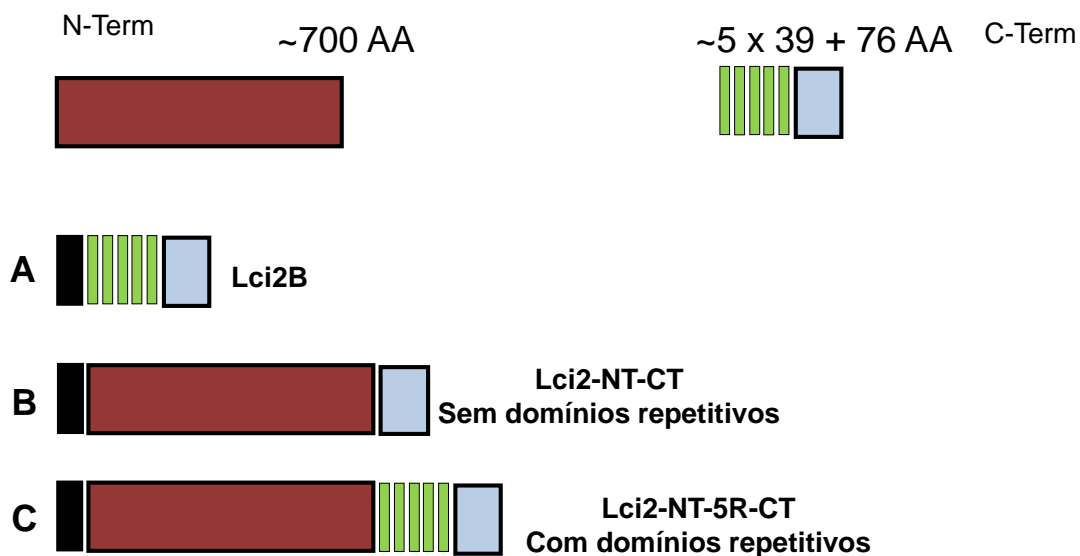
A obtenção do antígeno solúvel de *Leishmania infantum* foi previamente descrito no item 3.2.9 do capítulo 1. Resumidamente, parasitos da cepa (MHOM/BR2000/Merivaldo) cultivados em suspensão a  $5 \times 10^6$  parasitos/mL em meio Schneider suplementado com SBF20 %, foram submetidos a lise por 5 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 4 °C e seguido por sonicação para fragmentação com aplicação de 10 pulsos de 500 watts, com 20 segundos de duração, com intervalos de 1 minuto entre cada dois pulsos consecutivos, mantendo-se o material sob gelo. O lisado foi dividido em duas partes. Foi utilizada o sobrenadante obtido após centrifugação a 3000x g, por 5 minutos a 4 °C (denominado fração solúvel).

#### 4.2.4.2 Antígeno recombinante de *Leishmania infantum*

A seleção dos antígenos rLci2 já foi descrita previamente em trabalhos realizados em nosso Laboratório (PINHEIRO, 2011). Resumidamente, os antígenos recombinantes de *L. infantum* foram selecionados em nosso laboratório a partir uma biblioteca de cDNA da forma amastigota de *L. infantum*, cepa MHOM/BR2000/Merivaldo2 (BALEEIRO; PARANHOS-SILVA; C, 2006) confeccionada em fago lambda, usando-se uma mistura de soros de 4 cães naturalmente infectados por *L. infantum*, com infecção confirmada parasitologicamente, e que apresentavam resposta imune humoral e celular específica (COSTA et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2007). Um dos antígenos, denominado rLci2B foi escolhido para realização de estudos visando o desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose visceral. O inserto *Lci2B* foi subclonado em plasmídeo *pRSET* (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), gerando a construção *pRSETB-Lci2B*, capaz de promover super-expressão do polipeptídeo recombinante

rLci2B-NH6 que possui uma cDNA cauda de histidina na extremidade amina na linhagem de *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS (Invitrogen).

A molécula de rLci2B-NH6 apresenta alguns motivos repetitivos. A partir de vários testes e de dados na literatura indicando que domínios repetitivos promovem a resposta imune humoral (do tipo Th2), uma nova construção (*Lci2-NT-CT*) foi concebida de modo a produzir o polipeptídeo rLci2-NT-CT tentando favorecer a indução de uma resposta imune do tipo Th1. Esse polipeptídeo seria composto por uma cauda de histidina na região N-Ter, pelo segmento de 701 AA não repetitivo da N-Ter e o segmento de 76AA não repetitivo da C-Term (Figura 10), correspondentes a uma seqüência de aminoácidos descrita previamente (BURNS et al., 1993) e a C-Ter do produto do gene [LinJ14 V3.1180](#). Como controle, foi concebida uma construção (*Lci2-NT-5R-CT*) para produzir o polipeptídeo rLci2-NT-5R-CT-NH6. Esse polipeptídeo possui a mesma seqüência de aminoácidos do rLci2-NT-CT-NH6 além da inserção de 5 domínios com motivos repetitivos de 39AA entre os domínios não repetitivos de 701AA e 76AA (Figura 10). A construção da molécula controle *Lci2-NT-5R-CT* foi elaborada, através da colaboração com o Dr. Rafael Dhalia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, otimizando-se para a expressão em camundongos e cães. O DNA correspondente foi sintetizado pela Genart (Genart GmbH, Regensburg, Alemanha) e inserido em um plasmídeo de clonagem (pMK). As subclonagens foram realizadas usando-se reação em cadeia da polimerase (PCR) e, depois disso, seqüenciamento dos insertos para confirmar a presença das seqüências concebidas previamente, em colaboração com Dr. Osvaldo Pompilio de Melo Neto, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Dessa maneira, foram geradas as construções *pRSET-Lci2-NT-CT* e *pRSET-Lci2-NT-5R-CT*



**Figura 10** Desenho esquemático de antígenos recombinantes de *Leishmania* derivados de cinesina utilizados em ensaio de produção de citocinas. A) rLci2B-NH6, B) rLci2-NT-CT-NH6 e C) rLci2-NT-5R-CT-NH6. rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6 são as moléculas utilizadas no quantiFERON modificado. Os diversos domínios são mostrados: cauda de 6 histidinas (NH6, retângulo preto), segmento não repetitivo amino-terminal de 701 AA (NT, retângulo vermelho), segmentos com motivos repetitivos de 39 AA (5R, retângulo verde) e segmento não repetitivo carboxila-terminal de 76 AA (CT, retângulo azul).

A expressão das proteínas rLci2-NT-5R-CT e rLci2-NT-CT em *Escherichia coli* cepa BL21(DE3) Codon Plus RP foi realizada seguindo-se as recomendações do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA). Resumidamente, uma colônia de *E. coli* contendo as construções descritas acima foi usada para um pré-inóculo em caldo Luria-Bertani (LB) [bacto-triptona a 1 % (m/v, HiMedia, Mumbai, Índia), extrato de levedura a 0,5 % (m/v, Isofar, Duque de Caxias – RJ), cloreto de sódio a 1 % (m/v, Isofar), pH 7.0], glicose 50% 1mg/mL (Sigma) e antibióticos apropriados [50 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich), 50 µg/mL de cloranfenicol (Sigma-Aldrich) mantido a 37°C *overnight* em agitador orbital. Posteriormente, o mesmo foi introduzido em um volume maior de cultura, cujo era semelhante.

A suspensão de bactérias foi mantida sob agitação de 250 rpm, a 37°C, até que densidade óptica a 600 nm chegasse a uma absorvância de 0,4 a 0,6. Posteriormente adicionou-se o indutor de crescimento Isopropil-β-D-thiogalactosídeo (IPTG, Invitrogen) em uma concentração final de 0,2mM para a indução da expressão de proteínas recombinantes. Antes da adição de IPTG (Invitrogen) ao meio de cultivo, uma alíquota de 1 mL da cultura de bactéria foi coletada, assim como 3 horas após a indução para avaliação da expressão em gel de poli-acrilamida com duodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE, LAEMMLI, 1970). Depois de

3h de incubação, toda a suspensão bacteriana foi centrifugada a 6.000 g, 4° C, por 15 minutos, os sedimentos resultantes foram pesados e armazenados a -20°C, até o momento do uso.

A purificação das proteínas recombinantes foi realizada por cromatografia de afinidade, utilizando-se coluna His Trap HP (GE Healthcare, Pittsburgh, EUA) e seguindo-se as recomendações do fabricante. Resumidamente, cada sedimento bacteriano foi ressuspensão na razão de 5 mL de tampão contendo Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 20 mM, NaCl a 500 mM e imidazol a 20 mM, pH 7,4 (tampão de ligação) para cada 1 g de sedimento com auxílio de um agitador vórtex (Labnet, Woodbridge, Nova Jersey, EUA). Em seguida, para digerir a parede bacteriana, foi adicionada lisozima (Sigma-Aldrich) para atingir uma concentração final de 1 mg/mL. Cada suspensão foi incubada a temperatura ambiente por 20 minutos sob agitação constante. Depois disso, visando a solubilização, das membranas lipídicas, para cada 1 g de sedimento inicial, foram acrescentados 4 mg de desoxicolato de sódio (Sigma-Aldrich) e cada suspensão foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Com o objetivo de fragmentar o DNA genômico bacteriano, cada suspensão foi submetida à sonicação sob o gelo. A sonicação foi realizada pela aplicação de seis pulsos, com potência de 200 Watts, cada um com duração de 20 segundos e intervalo de 60 segundos entre cada dois pulsos consecutivos (Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, EUA). Cada lisado bacteriano foi centrifugado a 17.000 x g, a 4°C, por 15 minutos. Os sedimentos contendo rLci2-NT-CT-NH6 ou rLci2-NT-5R-CT-NH6 depois de solubilizados em tampão 20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500mM NaCl e 20mM imidazol, pH 7,4 e 8 M de uréia (tampão de ligação com uréia) foram passados por filtros de 0,22 µm e aplicados em colunas cromatográficas de sepharose-níquel de 1 mL (HisTrap HP, GE Healthcare Bio-Sciences, EUA). As colunas haviam sido previamente equilibradas com tampão de ligação. Visando a eliminação da maior parte dos lipopolissacarídeos (LPS) contaminantes, após a aplicação de solução de proteínas, cada coluna foi lavada com 50 mL de tampão contendo NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 20 mM, NaCl a 500 mM, imidazol a 31,25 mM, uréia a 8 M e Triton X-114 a 0,1% (Fluka, Biochemika, France) pH 7,4; a 4°C (REICHELTL, 2006). As colunas foram eluídas com tampão contendo Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 20 mM, NaCl a 500 mM, imidazol a 500 mM e uréia a 8 M. Durante o processo de eluição, frações de 1 mL foram obtidas e armazenadas a 4 °C e alíquotas dessas frações foram analisadas por SDS-PAGE. As frações que continham cada proteína alvo com um bom grau de pureza foram, separadamente, misturadas e submetidas à diálise contra tampão fosfato tamponado com salina a 4°C.

Após a diálise, para a esterilização, alíquotas das proteínas purificadas foram transferidas para tubos eppendorf e irradiadas com 60.000 rads sob o gelo, usando-se

irradiador IBL 437C (CIS Bio International). A concentração de cada proteína recombinante foi determinada pelo método de Lowry modificado. Tal modificação consistiu em solubilizar as amostras de proteína utilizando hidróxido de sódio a 2N e aquecer a 100° C, por 10 minutos, conforme método descrito por Waterborg, 2002. A avaliação da presença de endotoxinas nas amostras protéicas purificadas foi realizada utilizando o kit Limulus Amebocyte Lysate, QCL-1000 (Lonza), seguindo-se as recomendações do fabricante.

#### 4.2.5 Avaliação das proteínas recombinantes por SDS-PAGE e *Western Blot*

Para análise das amostras de proteína recombinante produzidas em *E. coli BL21(DE3) Codon Plus RP* e/ou purificadas por cromatografia de afinidade por eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) e *Western blot* foram o sistema de gradiente descontínuo com gel de separação a 10 %, conforme método previamente descrito (LAEMMLI, 1970). Foram aplicadas e analisadas em gel de poliacrilamida rLci2-NT-5R-CT-NH6 purificada (PM ~116 kDa) e amostra de rLci2-NT-CT-NH6 purificada (PM ~ 98 kDa). Foram aplicadas em gel para análise por *Western blot*: a) lisado *E. coli BL21(DE3)* códon plus RP transformada com plasmídeo pRSETA sem inserto; b) *BL21(DE3)* códon plus RP transformada com pRSETA-Lci2-NT-CT; c) rLci2-NT-CT purificada; d) *BL21(DE3)* códon plus RP transformada com pRSETA-Lci2-NT-5R-CT; e) rLci2-NT-5R-CT purificada.

Para a transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para membrana nitrocelulose para a realização do *Western blot* foi usado o método de transferência semi-seco em um aparelho transblotter da BIO-RAD (BIO-RAD, Hercules, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante. A transferência foi realizada usando-se o tampão Tris a 24 mM, glicina a 192 mM, metanol a 20 % (v/v), pH 8.3. Depois disso, a membrana foi lavada com água destilada e, para a visualização das proteínas e registro de pontos geográficos, foi feita a coloração com vermelho de Ponceau [Ponceau S a 0,1 % (m/v) e ácido acético a 5 % (m/v)]. Em seguida, o corante foi removido pela lavagem da membrana com água destilada. Os sítios de ligação de proteína na membrana foram bloqueados pela incubação a temperatura ambiente por 16 horas, a 4 °C, com solução contendo leite desnatado Itambé ou Molico a 5 % (m/v) em salina tamponada com Tris (TBS, NaCl a 137 mM, Tris 24,8 mM, pH 7,5) e Tween 20 a 0,05 % (v/v, TBS-T). A membrana foi então lavada 3 vezes com TBS-T e posicionada em um aparelho blotter, Immunetics, Modelo MN25 (Immunetics, Boston, USA). Cada uma das raias da membrana de nitrocelulose impregnadas com uma das amostras proteicas foi incubada com 350 µL de: a) leite desnatado a 5% em TBS-T (TBS-T-L), b) soro de

camundongo normal diluído de 1:500 em TBS-T-L ou c) anticorpo monoclonal de camundongo anti-histidina (Invitrogen) diluído 1:1.000 em TBS-T-L. A membrana foi incubada por 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação suave. Após lavagem da membrana de 3 a 6 vezes com TBS-T, cada uma das raias foi incubada por 1 hora, a temperatura ambiente e sob agitação suave, com 350  $\mu$ L de anticorpo anti-imunoglobulinas de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) diluído 1:500 em TBS-T-L. A membrana foi lavada 5 vezes com TBS-T e 2 vezes com TBS. Um volume de 10 mL de substrato para fosfatase alcalina [33  $\mu$ L de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP, Sigma) a 50 mg/mL e 330  $\mu$ L de Nitro Blue Tetrazolium (NBT, Sigma) a 10 mg/mL em 10 mL do tampão Tris a 100 mM, NaCl a 100 mM e MgCl<sub>2</sub> a 5 mM, pH 9,5) foi usado para a revelação de bandas de proteína detectadas pelos anticorpos por cerca de 5 minutos. A reação enzimática foi interrompida pela adição de água destilada.

#### 4.2.6 Mensuração de citocinas: IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$

A concentração de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  em plasmas de sangue total dos cães de área endêmica e de área não endêmica foram determinadas por Milliplex (EDM Millipore, Darmstadt, Alemanha). O ensaio do quantiFERON modificado foi realizado em tubo Eppendorf de 2 mL. Amostras de 1 mL de sangue heparinizado de 20 cães de área endêmica e de 7 cães de área não endêmica foram colocadas em tubos. Os tubos com amostras de sangue receberam 10  $\mu$ L de PBS, SLA 25  $\mu$ g/mL, rLci2-NT-CT 10  $\mu$ g /mL, rLci2-NT-5R-CT a 10  $\mu$ g /mL. Além disso, amostras de 1 mL de sangue heparinizado diluído de 1:2 em RPMI completo, foram colocadas em tubos de 2 mL contendo 10  $\mu$ L de Con A a 5  $\mu$ g/mL. Os tubos foram incubados a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, foram centrifugados a 2.000 x g por 10 minutos a 4°C e o plasma foi coletado e armazenado em quadruplicatas a -20 °C até o momento do uso.

A mensuração das concentrações de citocinas foi previamente descrita no item 3.2.12 do capítulo 1. Resumidamente, o plasma foi utilizado para a análise usando-se kit Milliplex<sup>®</sup> map (Millipore) segundo as recomendações do fabricante.

A intensidade de fluorescência média e a quantidade de cada citocina em pg/mL foi lida em aparelho LUMINEX 200 (Milliplex Analyzer Millipore) com auxílio de um programa computacional software Xponent 3.1. Os ensaios foram realizados na Plataforma Luminex situada no Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto Oswaldo Cruz/ RJ.

#### 4.2.7 Análise estatística

Com o objetivo de analisar a produção das citocinas pelos cães de área endêmica e cães de área não endêmica após a estimulação com os antígenos, foi utilizado o software GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA). O teste de normalidade indicado para amostras  $\geq 20$  foi realizado: D'Agostino & Pearson. Como a distribuição não era normal, a produção de citocinas foi avaliada através do teste não paramétrico de Friedman, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. Os valores estabelecidos para a significância estatística foram definidos como: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .



## 4.3 RESULTADOS

### 4.3.1 Caracterização clínica, imunológica e parasitária dos animais de área endêmica para leishmaniose visceral

Para a utilização dos animais de área endêmica para leishmaniose visceral canina no ensaio de avaliação das citocinas produzidas após a estimulação de plasma de sangue total com antígenos de *Leishmania*, foram feitas a caracterização clínica, imunológica e parasitária dos animais de área endêmica para LV. Os animais foram selecionados a partir do auxílio do Centro de Controle de Zoonoses de Camaçari, Bahia e da colaboração com a Dra. Deborah Bittencourt e Msc Manuela da Silva Solcà. A população de área endêmica selecionada para este estudo faz parte da zona Rural (RUR) de Camaçari.

A avaliação clínica foi definida de acordo com a presença e severidade de diversos fatores: O estado nutricional dos animais foi classificado de zero a dois, sendo que o escore 0: animais com peso normal ou obeso, escore 1: animais magros e escore 2: caquéticos. Conforme demonstrado na tabela 1, dezoito animais apresentaram escore 0, um animal: escore 1 e dois animais: escore 2. Demonstrando que a maioria dos animais de área endêmica incluídos no estudo apresentava peso normal. Além disso, foram observados diversos aspectos clínicos como: estado nutricional, mucosas, onicogribose, volume baço, linfonodos, dermatite periocular, crosta em orelhas, úlcera em orelhas, despigmentação no focinho, hiperqueratose no focinho, alopecia geral e dermatite furfurácea geral. A cada achado foi estipulado escore 1 e depois esses valores foram somados para determinação do escore clínico final de cada cão. Após a avaliação dos sinais clínicos, observou-se que 3 animais não apresentaram qualquer sinal clínico compatível com LVC (RUR 310, 311 e 314), 4 animais apresentaram escore 2 (RUR 307, 313, 317, 318), 5 animais apresentaram escore 3 (RUR 300, 301, 302, 309, 319), e 1 cão com escore 4 (RUR 303), 4 cães com escore 5 (RUR 304, 306, 308 e 315) e 1 cão com escore 6 (RUR 316). O animal que apresenta maior escore clínico é o RUR 305 com escore 7 (tabela 1).

Para a avaliação imunológica, os animais foram testados para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* através de ensaio imuno-enzimático (ELISA). Nenhum cão produziu anticorpo anti-*Leishmania* detectado pelo teste de ELISA. A carga parasitária dos animais foi testada após os animais terem sido submetidos a punção esplênica e o aspirado esplênico dos animais ter sido utilizado para cultura, extração de DNA e reação de PCR em tempo real para detecção de DNA de *Leishmania*. Ao analisar as culturas do material proveniente de punção esplênica não foi detectado parasita em nenhuma das culturas, no entanto, em DNA extraído

de material esplênico de dois animais (RUR311 e RUR314) foi possível detectar parasito com títulos baixos.

Foi avaliada também a resposta imune celular contra antígeno bruto de *Leishmania* pelo teste de reação de hipersensibilidade tardia (DTH) e como resultado foi observado que 50 % dos animais do grupo de área endêmica (n=10) foram positivos no ensaio utilizando o antígeno bruto de *Leishmania infantum*. A reação de endureção dérmica foi medida 48h após o ensaio e o resultado obtido variou de 3,5 mm (RUR 304) a 17 mm (RUR 318) (tabela 1). Estes ensaios foram realizados por colaboradores para seus estudos.

**Tabela 1. Caracterização clínica, imunológica e parasitária em cães de área endêmica para Leishmaniose visceral submetidos a ensaio de quantiFERON modificado.**

Cão (RUR)	Sexo <sup>1</sup>	Estado nutricional <sup>2</sup>	Escore Clínico <sup>3</sup>	Cultura	PCR	ELISA	DTH
300	F	0	3	-	-	-	0
301	F	0	3	-	-	-	0
302	F	0	3	-	-	-	0
303	F	2	4	-	-	-	0
304	F	0	5	-	-	N	3,5
305	M	0	7	-	-	-	9
306	F	1	5	-	-	-	N
307	M	0	2	-	-	-	4,5
308	F	0	5	-	-	-	7
309	M	0	3	-	-	-	0
310	F	0	0	-	-	-	7
311	F	0	0	-	+	-	0
312	M	0	1	-	-	-	0
313	M	0	2	-	-	-	0
314	F	0	0	-	+	-	0
315	F	0	5	-	-	-	6
316	M	2	6	-	-	-	4,5
317	F	0	2	-	-	N	9,5
318	F	0	2	-	-	N	17
319	F	0	3	-	-	N	7,5

(RUR): Cães da zona rural de Camaçari, Bahia, <sup>1</sup>: Sexo: Fêmea (F) e Macho (M); <sup>2</sup>: Escore do estado nutricional: normal a obeso (0), magro (1), caquético (2); <sup>3</sup>: escore clínico: Soma de escore dos sinais clínicos avaliados: estado nutricional, mucosas, onicogribose, volume baço, linfonodos, dermatite periocular, crosta em orelhas, úlcera em orelhas, despigmentação no focinho, hiperqueratose no focinho, alopecia geral e dermatite furfurácea geral. N: não foi realizada a avaliação.

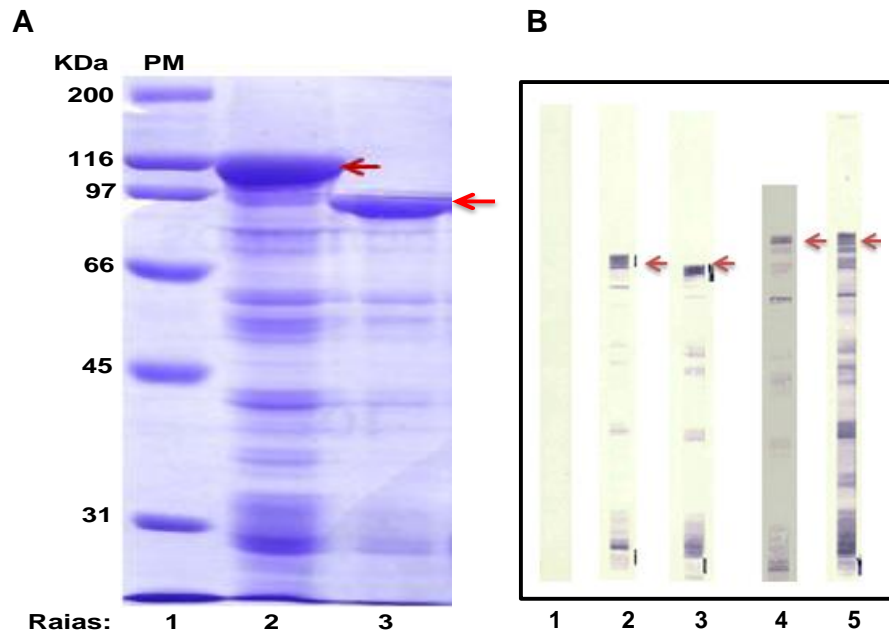
#### 4.3.2 Produção de citocinas por células de sangue periférico de cães de área endêmica para leishmaniose visceral após a estimulação com antígenos de *Leishmania*

Para avaliar a produção de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  por células de sangue periférico de cães de área endêmica e de área não endêmica para leishmaniose visceral, sangue total foram estimulados com antígenos de *Leishmania* (SLA 25  $\mu$ g /mL, rLci2-NT-CT 10  $\mu$ g /mL, rLci2-NT-5R-CT) e mitógeno (Con A a 5  $\mu$ g/mL) e os plasmas foram utilizados para a determinação por Milliplex (EDM Millipore).

Para isso, antígenos foram produzidos no laboratório. A preparação do antígeno solúvel de *Leishmania infantum* já havia sido padronizada no laboratório. As condições de cultura e lise não foram alteradas. Cepa (MHOM/ BR2000/ Merivaldo) cultivados em suspensão a  $5 \times 10^6$  parasitos/mL em meio Schneider suplementado com SBF a 20 % foram lisados. A eficiência do processo de lise dos parasitos foi testada visualmente ao microscópio óptico. O lisado foi centrifugado e o sobrenadante foi utilizado como antígeno solúvel de *L. infantum*.

As proteínas recombinantes já haviam sido expressas anteriormente por Pinheiro (2011), portanto seguiu-se o mesmo protocolo diferindo apenas quanto à adição de glicose 1%. Os peptídeos foram expressos em *E. coli* BL21(DE3) códon plus RP e a indução foi feita utilizando-se 0,2 $\mu$ M de IPTG. As proteínas rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6 foram purificadas em uma coluna cromatográfica (coluna HisTrap HP, GE Healthcare) e analisadas em gel SDS-PAGE 10% (figura 11). Durante o processo de purificação, após a ligação das proteínas recombinantes, as resinas das colunas foram lavadas com um tampão, contendo o detergente Triton X-114, para remoção de LPS. Depois da eluição das proteínas das colunas por imidazol e diálise da mistura de frações enriquecidas em cada proteína recombinante, as concentrações de proteína e dosagem de LPS foram analisadas.

As concentrações proteicas foram analisadas pelo método de Lowry modificado e as concentrações de LPS foram analisadas pelo Kit de reagentes *Limulus*. As concentrações observadas nos antígenos utilizados para o quantiFERON modificado foram: antígeno solúvel de *Leishmania infantum*: 4,2mg/mL, <500 EU/mL (~0,12 ng/mL), para rLci2-NT-5R-CT: 500ug/mL, 5 EU/mL (~0,009 ng/mL) e para rLci2-NT-CT: 207 ug/mL, <0,05 EU/mL (~0,0003 ng/mL). Além disso, foram observadas que as proteínas apresentaram a maior parte em banda intacta e algumas bandas menores que foram confirmadas como proteínas degradadas por *Western blot*. (Figura 11).



**Figura 11 Avaliação por SDS-PAGE e *Western blot* de antígenos recombinantes de *Leishmania* derivados de cinesina purificado.** A: SDS-PAGE em gel de poliacríamida 10%. Marcadores de peso molecular (raia 1), amostra de rLci2-NT-5R-CT-NH6 (PM ~116 kDa) (raia 2) e amostra de rLci2-NT-CT-NH6 (PM ~ 98 kDa) (raia 3) produzidos em *E. coli* e purificados por cromatografia de afinidade usando-se colunas de sepharose-níquel e dialisados contra PBS. As setas indicam as bandas proteicas não degradadas. B: *Western blot*. As raias correspondem a: 1) BL21(DE3) códon plus RP transformada com plasmídeo pRSETA sem inserto; 2) BL21(DE3) códon plus RP transformada com pRSETA-Lci2-NT-CT após 3 h de indução com IPTG; 3) rLci2-NT-CT purificada; 4) BL21(DE3) códon plus RP transformada com pRSETA-Lci2-NT-5R-CT após 3 h de indução com IPTG; 5) rLci2-NT-5R-CT purificada. As setas indicam as proteínas intactas. Existem várias bandas com mobilidade relativa menor que rLci2-NT-5R-CT-NH6 e rLci2-NT-CT-NH6 intactas nas raias 2, 3, 4 e 5 reveladas com anti-His-fa, respectivamente.

O ensaio do quantiFERON modificado foi realizado em tubo Eppendorf de 2 mL onde amostras de 1 mL de sangue heparinizado dos cães foram colocadas em tubos contendo os antígenos e foram incubados a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 2.000 x g por 10 minutos a 4°C e o plasma foi utilizado com o Kit Milliplex (Millipore).

Ao mensurar a produção de IFN- $\gamma$  em cães de área não endêmica para LVC após o plasma ter sido estimulado com PBS, SLA 25  $\mu$ g /mL, rLci2-NT-CT 10  $\mu$ g /mL, rLci2-NT-5R-CT 10  $\mu$ g /mL e concanavalina A 5  $\mu$ g /mL, os valores de média  $\pm$  desvio padrão (valor máximo e valor mínimo) foram: 46,0  $\pm$  88,3 (230,7 e 0), 16,7  $\pm$  26,3 (70,9 e 0), 71,0  $\pm$  109,3

(296,1 e 0),  $35,3 \pm 48,8$  (125,3 e 0) e  $52,0 \pm 62,4$  (170,9 e 0), respectivamente. Em cães de área endêmica para LVC após o plasma ter sido estimulado com PBS, SLA 25 $\mu$ g /mL, rLci2-NT-CT 10  $\mu$ g /mL, rLci2-NT-5R-CT 10  $\mu$ g /mL e concanavalina A 5 $\mu$ g /mL, os valores foram:  $19,3 \pm 16,2$ (73,2e 0),  $24,2 \pm 32,5$  (145,9 e 0),  $46,3 \pm 74,1$  (322,6 e 0),  $35,2 \pm 39,9$  (181,2 e 0) e  $64,0 \pm 121,1$  (478,4 e 0), respectivamente.

A produção de IL-2 em cães de área não endêmica para LVC após o plasma ter sido estimulado com PBS, SLA 25 $\mu$ g /mL, rLci2-NT-CT 10  $\mu$ g /mL, rLci2-NT-5R-CT 10  $\mu$ g /mL e concanavalina A 5 $\mu$ g /mL, foi:  $29,0 \pm 29,8$  (75,9 e 0),  $43,4 \pm 34,5$ (84,7e 0),  $46,4 \pm 41,4$ (102 e0),  $39,1 \pm 30,1$ (78,1e0),  $32,9 \pm 37,5$ (102 e 0), respectivamente. Em cães de área endêmica para LVC após o plasma ter sido estimulado com PBS, SLA 25 $\mu$ g /mL, rLci2-NT-CT 10  $\mu$ g /mL, rLci2-NT-5R-CT 10  $\mu$ g /mL e concanavalina A 5 $\mu$ g /mL, os valores foram:  $49,9 \pm 132,8$ (436,1 e 0),  $87,4 \pm 258,0$  (1087,9 e 0),  $18,7 \pm 71,2$ (319,2e 0),  $25,8 \pm 69,4$ (278,6 e 0) e  $19,1 \pm 57,0$ (252,6 e 0), respectivamente.

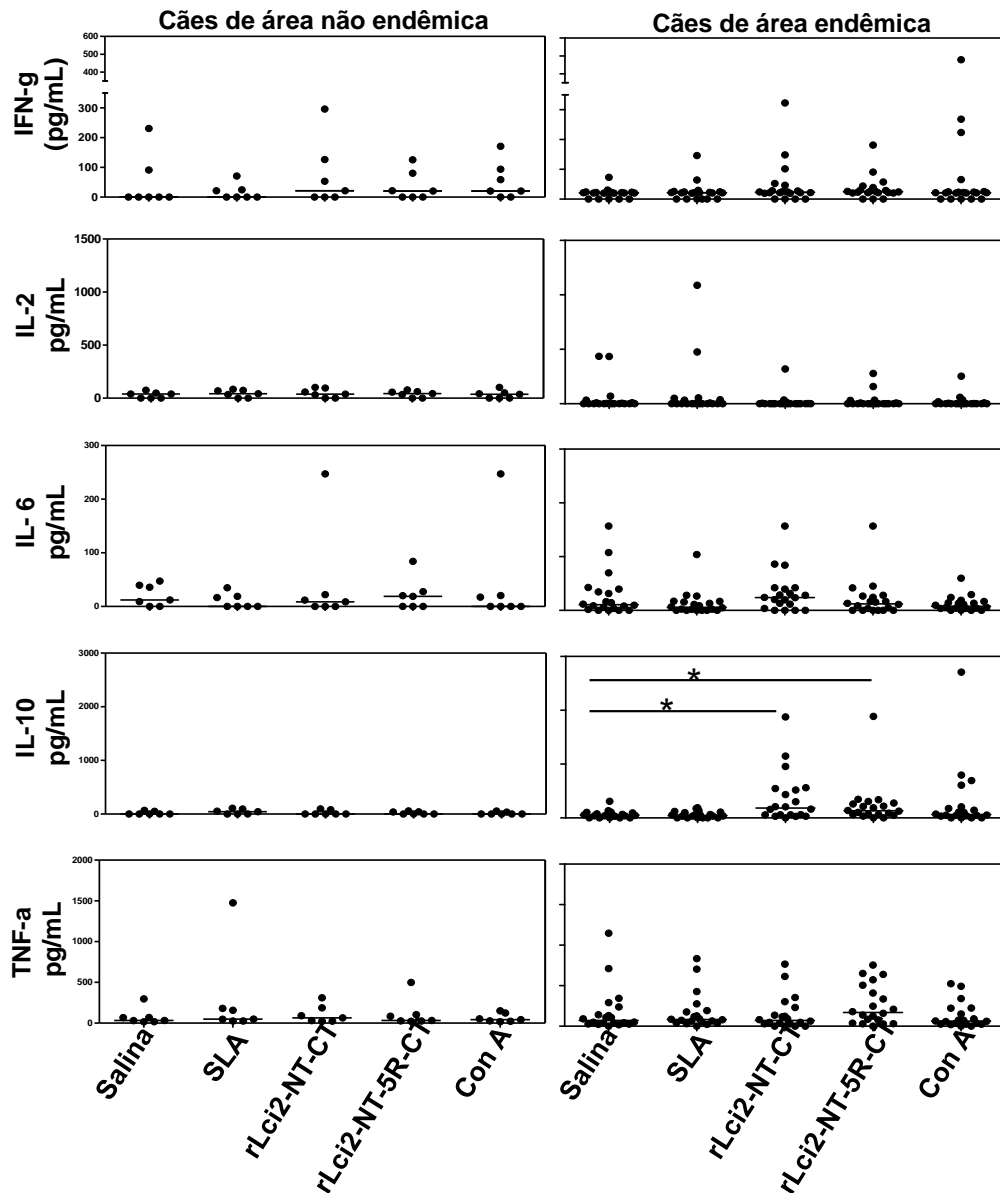
A dosagem da citocina IL-6 em plasma de cães de área não endêmica foi:  $20,6 \pm 19,9$  (47,4 e 0),  $10,1 \pm 13,8$  (34,8 e 0),  $41,4 \pm 91,1$  (247e 0),  $21,6 \pm 29,9$ (84,2 e 0) e  $40,7 \pm 91,4$  (247 e 0) e em cães de área endêmica foi:  $28,1 \pm 40,8$  (156,8 e 0),  $12,9 \pm 23,2$  (103,7 e 0),  $32,8 \pm 38,1$  (156,8 e 0),  $20,7 \pm 34,9$  (156,8 e 0) e  $11,8 \pm 14,1$  (29,4 e 0), após o plasma ter sido estimulado com PBS, SLA 25 $\mu$ g /mL, rLci2-NT-CT 10  $\mu$ g /mL, rLci2-NT-5R-CT 10  $\mu$ g /mL e concanavalina A 5 $\mu$ g /mL, respectivamente.

A mensuração da citocina IL-10 em plasma de cães de área não endêmica foi:  $17,2 \pm 29,9$  (69,3 e 0),  $42,9 \pm 45,6$  (108,4e 0),  $25,3 \pm 43,5$  (96,5 e 0),  $19,8 \pm 25,6$  (59,4 e 0),  $13,3 \pm 23,4$  (56,2 e 0) e em cães de área endêmica foi:  $62,9 \pm 70,1$  (308,7 e 0),  $60,1 \pm 59,7$  (176,8 e 0),  $370,4 \pm 477,3$  (1877,2 e 0),  $239,0 \pm 403,3$  (1886,6 e 0) e  $294,7 \pm 616,6$  (2709,1 e 0), após o plasma ter sido estimulado com PBS, SLA 25 $\mu$ g /mL, rLci2-NT-CT 10  $\mu$ g /mL, rLci2-NT-5R-CT 10  $\mu$ g /mL e concanavalina A 5 $\mu$ g /mL, respectivamente.

A dosagem de TNF- $\alpha$  em plasma de cães de área não endêmica foi:  $75,9 \pm 99,8$  (296,9 e 16,7),  $280,2 \pm 531$  (1475,8 e 25,8),  $104,2 \pm 108$  (310,3 e 24,1),  $113,6 \pm 173,1$  (499,3 e 23) e  $62,3 \pm 53$  (150,6 e 17,3), e em cães de área endêmica foi:  $181,2 \pm 281,5$ (1147,3 e 0),  $175 \pm 227,2$  (704,8 e 0),  $153,4 \pm 209,8$ (765,7 e 0),  $260,7 \pm 243$  (754,3 e 0) e  $127,2 \pm 156,8$  (523,4 e 0), após o plasma ter sido estimulado com PBS, SLA 25 $\mu$ g /mL, rLci2-NT-CT 10  $\mu$ g /mL, rLci2-NT-5R-CT 10  $\mu$ g /mL e concanavalina A 5 $\mu$ g /mL, respectivamente.

De modo geral, tanto o grupo de cães de área endêmica, quanto o grupo de cães de área não endêmica, a análise do sangue periférico frente à estimulação com: salina, rLci2NT-CT-NH6 a 10  $\mu$ g /mL, rLci2-NT-5R-CT-NH6 a 10  $\mu$ g /mL, SLA a 25  $\mu$ g /mL e con A a 5  $\mu$ g

/mL não revelou produção de qualquer uma das citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) em níveis relevantes e significantes em relação ao estímulo PBS, exceto para a produção de IL-10 após o sangue periférico dos cães de área endêmica terem sido estimulado na presença dos antígenos recombinantes rLci2NT-CT-NH6 ( $p < 0,05$ ) e rLci2-NT-5R-CT-NH6 ( $p < 0,05$ ). Além disso, o mitógeno controle positivo (con A) não foi capaz de estimular produção de altos níveis das citocinas testadas (Figura 12).



**Figura 12** Avaliação de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  em cães de área endêmica e em cães de área não endêmica para leishmaniose visceral canina. Sangue de cães de área endêmica e não endêmica para leishmaniose visceral canina foi coletado e estimulado na presença dos estímulos: salina, antígeno solúvel de *Leishmania infantum* a 25  $\mu$ g/mL, rLci2NT-CT-NH6 a 10  $\mu$ g/mL, rLci2-NT-5R-CT-NH6 a 10  $\mu$ g/mL, e concanavalina A a 5  $\mu$ g/mL por 24h. O plasma foi coletado e utilizado para a detecção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  através do Kit Milliplex (Millipore). Os pontos representam os valores individuais e as barras representam a mediana. A produção de

citocinas foi avaliada estatisticamente através do teste não paramétrico de Friedman, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. Os valores estabelecidos para a significância estatística foram definidos como: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 4.4 DISCUSSÃO

Alguns trabalhos foram recentemente realizados para avaliar a produção de citocinas por seres humanos tratados para leishmaniose visceral usando um ensaio previamente desenvolvido para diagnóstico de tuberculose (QuantiFERON) (GIDWANI et al., 2011; SINGH et al., 2012). Com o objetivo de avaliar a produção de citocinas por células de sangue periférico de cães de área endêmica para leishmaniose visceral, este ensaio (quantiFERON modificado) foi realizado. Para isso, antígeno solúvel de *Leishmania infantum* 25  $\mu\text{g/mL}$ , rLci2-NT-CT e rLci2-NT-5R-CT a 10  $\mu\text{g/mL}$  e concanavalina a 5  $\mu\text{g/mL}$  (sangue diluído de 1:2 antes do estímulo) foram produzidos e testados no ensaio.

Não houve produção de citocinas em níveis estatisticamente significante quando o sangue de cães de área não endêmica ou área endêmica foram estimulados com os antígenos e mitógeno em relação a estimulação com salina. Durante a realização do ensaio, por problemas técnicos, as placas não puderam ser lidas no mesmo dia. Apesar da curva de calibração do ensaio ter funcionado evitando qualquer interpretação duvidosa a respeito da capacidade do aparelho ou do *kit* utilizado, os dados não puderam ser bem interpretados. Além disso, o mitógeno concanavalina A (controle positivo do ensaio) não estimulou grandemente a produção das citocinas. Acredita-se que os resultados obtidos são reflexos da leitura tardia das placas e fora do intervalo indicado pelo prospecto do kit Milliplex por isso torna-se necessário reavaliar o mitógeno numa etapa de padronização antes de reiniciar os experimentos.

Considerando a amostra de 20 cães de área endêmica para leishmaniose visceral canina, somente 2 cães (10%) apresentaram PCR em tempo real positiva e 18 cães (90%) apresentaram resultados de cultura e de PCR em tempo real negativos a partir de material proveniente de punção esplênica, demonstrando que os cães que apresentaram dados negativos podem ser considerados como cães não expostos a *Leishmania*. Manzillo e colaboradores observaram que após a inoculação natural de *Leishmania*, uma parcela de cães foi capaz de controlar a infecção e apresentavam sorologia negativa para *Leishmania* (MANZILLO et al., 2013). Acredita-se que o mesmo possa ter acontecido com uma parcela de cães do grupo de área endêmica, mas não se pode afirmar já que não foram avaliados em diferentes momentos.

Alguns pesquisadores realizaram uma avaliação em pacientes provenientes de área endêmica ou de área não endêmica de LV, usando um ensaio previamente desenvolvido para diagnóstico de tuberculose (QuantiFERON) mas utilizaram a fitohemaglutinina como mitógeno (GIDWANI et al., 2011; SINGH et al., 2012). Tanto a fitohemaglutinina quanto a con A deverão ser testadas em diferentes concentrações para o padronização e escolha do mitógeno antes de realizar o próximo ensaio.

Turgay e colaboradores detectou produção de IFN- $\gamma$  frente a estimulação com antígenos de *Leishmania infantum* (H2B) para a maioria dos pacientes curados para leishmaniose visceral tratados, mas não dos controles (TURGAY et al., 2010). Singh e colaboradores analisaram a concentração de IFN- $\gamma$ , IL-10 e TNF- $\alpha$  no plasma de pacientes e observaram que indivíduos curados (resistentes) haviam produzido IFN- $\gamma$  e não produziram IL-10 (SINGH et al., 2012). Com os resultados obtidos nesse trabalho, não foi possível diferenciar a produção de citocinas no plasma de cães de área não endêmica ou de cães de área endêmica para LVC.

Estudos futuros testando novos mitógenos em diferentes concentrações, assim como grupos maiores e mais heterogêneos de cães serão necessários para estabelecer o verdadeiro potencial do ensaio para o rastreamento do perfil de citocinas produzidas pelos animais expostos a leishmaniose.

## 4.5 CONCLUSÃO

Devido a problemas técnicos não foi possível avaliar os dados obtidos e, conseqüentemente, não foi possível caracterizar grupos de animais susceptíveis e resistentes.



---

## **5. ESTUDO DA CARGA PARASITÁRIA E ASPECTOS HISTOLÓGICOS EM DIFERENTES REGIÕES DO BAÇO DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL.**

## 5.1 JUSTIFICATIVA

A *Leishmania* é transmitida de pessoa para pessoa através da picada de insetos vetores dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* na pele (READY, 2013). Após inoculação dérmica pelo vetor, protozoários do complexo *Leishmania donovani* são transportadas, no interior das células fagocíticas, para os gânglios linfáticos de drenagem (THALHOFER et al., 2011). De lá, eles chegam à corrente sanguínea e se espalham principalmente para órgãos do sistema fagocítico- mononuclear (IBRAHIM et al., 2013), especialmente baço, medula óssea, fígado e linfonodos. Nestes órgãos, as células do sistema imune inato e adaptativo irão determinar o grau de sobrevivência e multiplicação do parasita, o desenvolvimento de danos no tecido hospedeiro, e destino da infecção (STANLEY; ENGWERDA, 2007a).

O baço, que é o maior órgão linfóide secundário, está posicionada entre o segmento da aorta abdominal e a veia porta hepática e não tem vasculatura linfática aferente. Nesta posição estratégica, o baço filtra o sangue do corpo e desempenha funções importantes, que incluem: a) a remoção de partículas indesejáveis a partir da circulação (por exemplo, células velhas de sangue vermelho e agentes infecciosos, tais como vírus, bactérias, fungos e protozoários); b) desenvolvimento de respostas imunes contra antígenos distribuídos sistemicamente, tanto inata (por fagocitose e anticorpos) e adaptativa (humoral e celular); c) Implementação de imunoregulação; e d) (dependendo da espécie de mamífero) armazenar hemácias (por exemplo: em cães, gatos e cavalos) e desenvolvimento de atividade hematopoiética (por exemplo: em camundongos e ratos) (BRONTE; PITTET, 2013; MEBIUS; KRAAL, 2005; ONKAR; GOVARDHAN, 2013; SUTTIE, 2006). Em indivíduos infectados com os protozoários do complexo de *L. donovani*, o baço tende a ser parasitado durante todo o período da infecção (AHMED et al., 2003; IBRAHIM et al., 2013; PARANHOS-SILVA et al., 2003; STANLEY; ENGWERDA, 2007b), e muitas vezes desenvolve alterações funcionais e arquitetônicas (LIMA et al., 2014; SANTANA et al., 2008b; SILVA et al., 2012; VERESS et al., 1977), levando a um estado de imunossupressão que compromete a capacidade do hospedeiro de controlar a infecção por protozoários e infecções causadas por outros microrganismos (ANDRADE et al., 1990).

Estudos sobre a patogênese da LV mostram alguma discrepância nos dados obtidos a partir do modelo murino e em cães naturalmente inoculado por *Leishmania* (ATO et al., 2002, 2006; LIMA et al., 2014; SANTANA et al., 2008a; SILVA et al., 2012; STRAUSS-AYALI et al., 2004). Algumas das diferenças observadas nos resultados podem estar relacionados com a metodologia utilizada, incluindo a fase na qual a infecção foi estudada. No entanto, embora

importante, o estudo da infecção experimental no modelo murino sempre fornece uma visão limitada, que pode representar pouco da complexidade da infecção natural que ocorre em cães e seres humanos. Isto pode acontecer por várias razões, incluindo diferentes inóculos, o tempo de infecção, a carga parasitária e distribuição, idade do hospedeiro, aspectos genéticos e nutricionais do hospedeiro, aspectos genéticos do parasita, as infecções associadas, etc.

Em animais naturalmente infectados (por exemplo, seres humanos e cães), a distribuição da carga de *Leishmania*, bem como as alterações histológicas e funcionais de cada órgão afetado pode ser heterogêneo (SANTANA et al., 2008a). No entanto, com o melhor de nosso conhecimento, não há relatos de avaliação da distribuição destes resultados nos órgãos afetados. Informações detalhadas sobre a distribuição da carga de *Leishmania* e mudanças histológicas em vários órgãos, principalmente no baço, em cães com diferentes formas clínicas (assintomática, oligossintomática e polissintomática) da LV podem ajudar a compreender melhor a limitação e importância de determinar a carga parasitária em apenas uma amostra de alguns órgãos em estudos que envolvem: a) o diagnóstico da infecção e da doença, b) patogênese, c) desenvolvimento de métodos terapêuticos e profiláticos. Um conhecimento mais profundo da carga parasitária permitirá a concepção de estudos mais racionais de patogenia e avaliação do resultado de protocolos de imunização ou de tratamento, por exemplo, em termos do número necessário de animais por grupo experimental e do número de amostras a serem coletadas.

No presente trabalho, carga parasitária e alterações morfológicas foram avaliadas em nove amostras de aspirado e 6 fragmentos recolhidos, respectivamente, para representar as secções do terço superior, médio e inferior do baço de 6 cães com LV.

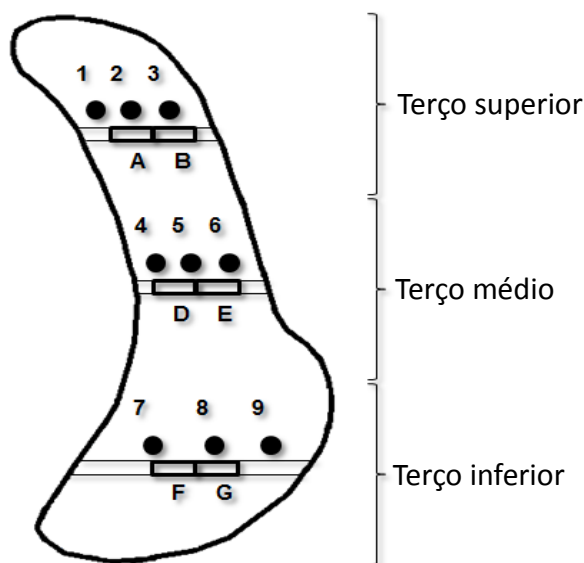
## 5. 2 MATERIAIS MÉTODOS

### 5.2.1 Animais

Amostras de sangue de 800 cães foram coletadas durante a realização de um projeto com o objetivo de estudar a história natural e desenvolver métodos de diagnóstico para leishmaniose visceral canina em Camaçari, Brasil (SOLCÀ et al., 2012). Com o consentimento de seus proprietários, estes cães foram examinados clinicamente e submetidos à punção esplênica, pelo método descrito anteriormente por Barrouin-Melo e colaboradores (BARROUIN-MELO et al., 2006), seguido de cultura do aspirado em NNN meio bifásico suplementado com 20% fetal bovino soro (SBF). Entre os 800 cães, 6 animais sem raça definida, que mostraram: a) anticorpos anti-*Leishmania*, detectados por imunofluorescência indireta (RIFI, realizado com kit de detecção de Biomanguinhos leishmaniose, Rio de Janeiro, Brasil, no Laboratório Central do Estado da Bahia, Brasil), b) crescimento de promastigotas de *Leishmania* em cultura de aspirado esplênico, e c) sinais clínicos compatíveis com leishmaniose visceral foram selecionados para o estudo. Quatro meses depois, os cães selecionados foram alojados no CCZ. Os animais foram re-examinados clinicamente e, em seguida, submetidos à eutanásia, de acordo com determinações do Ministério da Saúde, sob anestesia profunda (1 mg / kg de xilazina, 15 mg / kg de quetamina e 25 mg / kg de tiopental) por injeção intravenosa de cloreto de potássio saturado solução.

### 5.2.2 Coleta de amostras de baço

Após a eutanásia, o baço de cada animal foi removido da cavidade abdominal e submetido a punção com agulha em 9 pontos diferentes (3 em cada terço do órgão: superior, média e inferior do terceiro; Figura 13). Para isso, a uma seringa de 20 mL conectada a uma agulha 42 x 1,2 mm foi usada para cada amostra. Cada aspirado de baço foi transferido para um tubo Eppendorf previamente pesado e foi imediatamente congelado em gelo seco e depois armazenadas a -70 ° C até à sua utilização. Mais tarde, o peso de cada amostra foi determinado. Além disso, foram realizadas secções transversais em cada um terço do baço (Figura 13) e dois fragmentos de cerca de 4 mm de espessura de cada terço do órgão foram recolhidos e fixados em tampão de fosfato de formalina a 10%.



**Figura 13** Desenho esquemático do baço de cão indicando as áreas das quais foram obtidas amostras para estudo histológico e determinação da carga parasitária. Desenho esquemático do baço canino indicando os pontos (numerados de 1 a 9), onde foram realizadas punções separadas para a determinação da carga parasitária e fragmentos de baço foram retirados (rotuladas de A a G) para análise histológica. Os colchetes mostram cada terço do órgão.

### 5.2.3 Processamento histológico

Os cortes histológicos com espessura de 3  $\mu\text{m}$  dos fragmentos de baço foram coradas com hematoxilina e eosina, e depois examinada em um microscópio óptico. A análise das secções de tecido foi realizada por um patologista, um dos autores, que tem vasta experiência em avaliação histológica de cães com LV, sem o conhecimento das manifestações clínicas e carga parasitária do baço do animal em análise. Os critérios utilizados para analisar os cortes de tecidos foram essencialmente descritos anteriormente por Santana e colaboradores (SANTANA et al., 2008). Cada achado histológico foi semi-quantificado de acordo com a intensidade: leve (1), moderado (2) ou intenso (3).

### 5.2.4 PCR em tempo real

O DNA das amostras de aspirado de baço foi extraído com DNAeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante, e a concentração foi determinada em um espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific,

Wilmington, EUA). As amostras de tecido foram digeridas com proteinase K durante a noite (Mary et al., 2004). O ensaio de PCR em tempo real foi realizado, essencialmente, de acordo com o método descrito por Francino e colaboradores (Francino et al., 2006). Resumidamente, triplicatas de 25 µl de reações foram realizadas com 150ng de DNA da amostra, *primers* LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') e LEISH-2 (5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3') e uma sonda FAM-MGB (FAM-5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'-MGB) de seqüência conservada de mini círculo de DNA de *Leishmania* ou iniciadores específicos e sonda para a detecção de gene 18S rDNA mamíferos (controlo negativo, Applied Biosystems, Carlsbad, EUA), 0,2 mg / µL de albumina de soro bovino, e TaqMan mix master (Applied Biosystems). Para a preparação de uma curva de calibração, foram utilizadas quantidades de 0,1-10<sup>5</sup> de DNA de prosmatigotas de *Leishmania*. As reações foram realizadas e lidas num sistema de PCR em tempo real fast 7500 (Applied Biosystems, Foster City, EUA). A carga parasitária foi expressa por número de *Leishmania* por grama de tecido do baço, usando a fórmula que se segue:

$$\text{Número de parasito por grama de baço} = \frac{\text{Número de parasito por 150 ng de amostra de DNA} \times \frac{\text{Peso da amostra aspirada de DNA purificado em ng}}{\text{Peso da amostra aspirada em mg}} \times 1.000}{150}$$

### 5.2.5 Declarações éticas

O presente trabalho foi realizado de acordo com a Lei Federal Brasileira em Experimentação Animal (Lei 11.794) ([http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm)). O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais no Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (número de licença: 017/2010).

### 5.2.6 Análise estatística

A carga parasitária de cada aspirado esplênico de baço foi expresso a partir da média aritmética dos valores em triplicata das reações de PCR em tempo real.

## 5.3 RESULTADOS

### 5.3.1 Caracterização clínica, imunológica e parasitológica dos cães estudados.

O grupo de seis cães foi composto por machos e fêmeas com idade estimada de 3 a 7 anos de idade. Todos os seis cães apresentaram resultados positivos para RIFI ( $> 1:50$ ) e detecção de promastigotas de *Leishmania* em culturas semi-sólidas de aspirado de baço (Tabela 1). Além disso, os animais foram submetidos a dois exames clínicos, realizado duas vezes com um intervalo de 4 semanas, com sinais compatíveis com LV (Tabela 1). Nestes animais, as manifestações clínicas mais frequentes foram: lesões de pele, incluindo dermatite com hiperqueratose, alopecia, onicogribose e linfadenopatia poplítea (Tabela 1). Nenhum dos animais apresentou perda de peso. Quatro dos 6 animais apresentaram 2 e 3 ou mais sinais compatíveis com LV na primeira e na segunda avaliação, respectivamente, sugerindo uma progressão para uma forma mais grave da doença ao longo do tempo (Tabela 1).

**Tabela 2** Caracterização clínica e imunológica de cães com leishmaniose visceral avaliados quanto a distribuição da carga parasitária esplênica

Cão #	<sup>1</sup> Sexo	<sup>2</sup> Idade (anos)	<sup>3</sup> Peso (kg)	<sup>4</sup> RIFI (>1:50)	<sup>5</sup> Cultura	<sup>6</sup> Avaliação clínica	
						Primeira	Segunda
320	M	5-7	9.4	+	+	Hiperqueratose no nariz e linfadenopatia poplítea	Hiperqueratose no nariz e linfadenopatia submandibular
325	M	5-7	11	+	+	Hiperqueratose no nariz e linfadenopatia submandibular	Hiperqueratose no nariz e linfadenopatia poplítea e submandibular, alopecia, dermatite periocular, conjuntivite e onicogribose
332	F	3-4	19	+	+	Hiperqueratose no nariz, dermatite periocular e onicogribose	Hiperqueratose no nariz, dermatite periocular, onicogribose, alopecia, linfadenopatia poplítea e submandibular.
335	F	3-4	11.2	+	+	Hiperqueratose no nariz, linfadenopatia poplítea e submandibular.	Hiperqueratose no nariz, linfadenopatia poplítea e submandibular, alopecia e onicogribose.
343	F	5-7	25	+	+	Linfadenopatia poplítea	Alopecia e onicogribose
353	F	3-4	23	+	+	Hiperqueratose no nariz, alopecia e linfadenopatia popliteal	Dermatite, conjuntivite e linfadenopatia submandibular

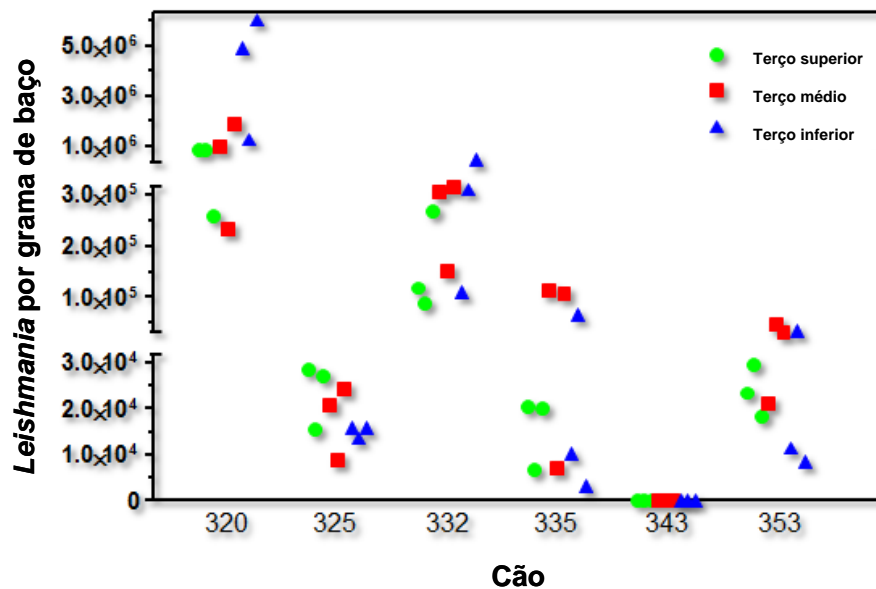
<sup>1</sup>Sexo: masculino (M) e feminino (F). <sup>2</sup>Idade estimada pelo exame físico. <sup>3</sup>Peso corporal medido no dia da eutanásia. <sup>4</sup>Teste imunofluorescência indireta (RIFI) e <sup>5</sup>cultura de aspirado de baço para o diagnóstico parasitológico da leishmaniose realizados na época do primeiro exame clínico. <sup>6</sup>As duas avaliações clínicas foram realizadas com quatro meses de intervalo.

### 5.3.2 Avaliação da carga parasitária em diferentes regiões do baço de cães com leishmaniose visceral

A carga parasitária foi determinada pelo número de *Leishmania* por grama de tecido



obtido em nove pontos diferentes do baço, sendo três amostras de cada terço do órgão, por PCR em tempo real. Cinco dos seis animais apresentaram DNA do parasito em todas as 9 amostras avaliadas e em um dos animais não foi detectada qualquer DNA do protozoário (Figura 14). Nos cães em que foram encontrados DNA do parasita, houve uma grande variação na média de carga parasitária, sendo o valor da mediana 978.694 (cão # 320), 15.863 (cão # 325), 268.768 (cão # 332), 20.169 (cão # 335) e 23.505 (cão # 353) *Leishmania* por grama de baço. A carga parasitária também variou em diferentes amostras de baço de cada animal, a relação entre o maior e o menor valor para cada animal foi a seguinte: 25,8 (cão # 320), 3,2 (cão # 325), 5,4 (cão # 332), 34,7 (cão # 335) e 5,6 (cão # 353). No animal (cão # 343) que não foi detectado DNA de *Leishmania* em nenhuma das amostras testadas apresentaram uma boa amplificação de rDNA 18s em cada uma das suas amostras de baço (dados não apresentados), sugerindo que as amostras de DNA estavam em boas condições e desprovida de fatores inibitórios de PCR.



**Figura 14 Carga parasitária em diferentes regiões do baço de cães com leishmaniose visceral.** Carga parasitária mensurada a partir de 9 pontos diferentes do tecido do baço (3 secções de cada terço) em 6 cães com manifestações clínicas compatíveis com leishmaniose visceral, teste de imunofluorescência indireta positiva e cultura positiva para *Leishmania*. A carga parasitária foi determinada por PCR em tempo real utilizando 150ng de amostras de DNA e o sistema TaqMan como descrito na secção Materiais e Métodos. A eficiência da PCR e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foram 91% e 0,998, respectivamente. A diferença entre o maior e o menor valor de CT ( $\Delta$ CT) obtidas para cada animal (que se correlaciona com a carga mais elevada e mais baixa de parasitismo no baço, respectivamente) e o valor de amplitude mais elevada de CT das 9 triplicatas (RA) de cada animal, dada em número de ciclos de PCR, foram os seguintes ( $\Delta$ CT e RA): cão # 320 (4,001 e 0,182), cão # 325 (1,975 e 0,309), cão # 332 (2,943 e 0,173), cão # 335 ( 3,811 e 0,513), cão # 343.

### 5.3.3 Análise histológica de diferentes regiões do baço de cães com leishmaniose visceral

Os principais achados histológicos são mostrados na Tabela 3. Os achados histológicos mais comuns foram: a) infiltração de células do plasma (em 6 de 6 cães), b) infiltração de neutrófilos polimorfonucleares (em 6 de 6), c) granulomas (em 4 de 6), d) perisplenitis crônica (em 3 dos 6), e), polpa branca desorganizado (em 3 dos 6), e f) grandes folículos linfóides (em 2 dos 6) (Tabela 3 e Figura 15). Relativamente pouca variação de resultados histológicos, incluindo a sua frequência ou intensidade, foi observada nas secções do baço de um mesmo animal (Tabela 3). As únicas variações observadas foram na frequência de granuloma e na intensidade de perisplenite em um dos animais (Tabela 3)

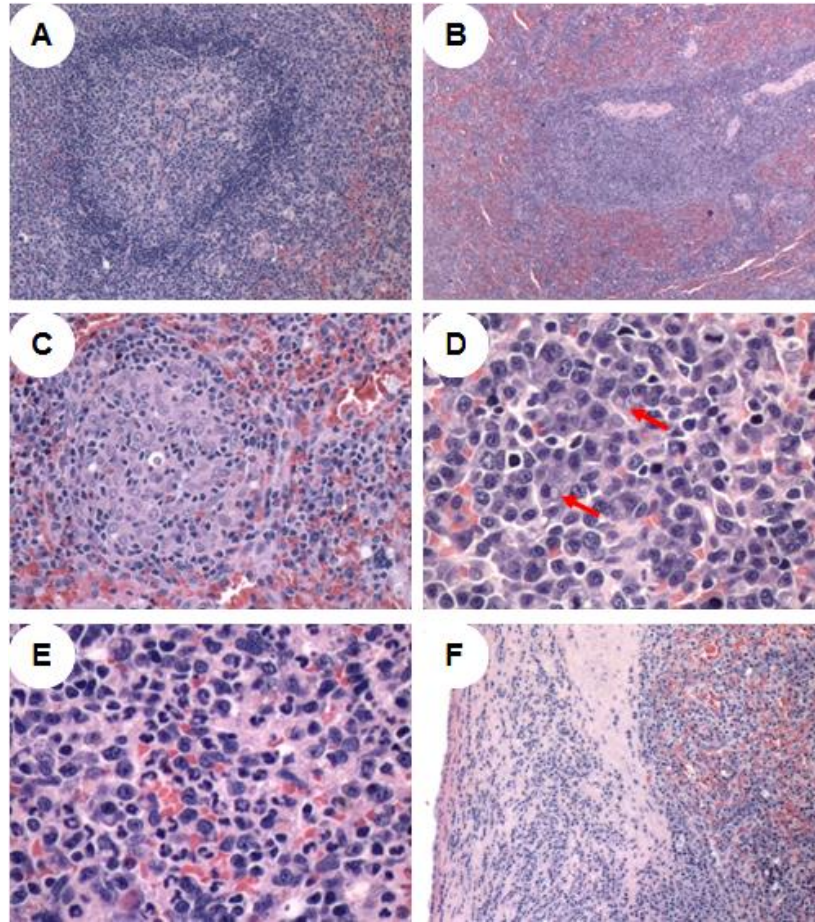
**Tabela 3 Achados histológicos no baço de cães com leishmaniose visceral avaliados quanto a distribuição da carga parasitária esplênica**

Cão #	Achados por <sup>1</sup> secções esplênicas																	
	<sup>2</sup> Polpa branca (tipo)			<sup>3</sup> Folículo (Tamanho)			<sup>4</sup> Granuloma			<sup>4</sup> Infiltração célula plasmática			<sup>4</sup> Infiltração neutrofílica			<sup>5</sup> Perisplenite		
	S	M	I	S	M	I	S	M	I	S	M	I	S	M	I	S	M	I
320	2	2	2	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0
325	1	1	1	2	2	2	0	0	0	1	1	1	2	3	2	0	0	0
332	1	2	1	3	3	3	3	1	1	0	1	1	1	2	1	1	1	1
335	3	3	2	3	3	2	1	1	1	1	2	2	1	1	1	3	3	2
343	1	1	1	2	2	2	0	0	0	2	2	2	2	2	1	0	0	0
353	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3

<sup>1</sup>Secções esplênicas: (S) Terço superior, (M) Terço médio, e (I) Terço inferior. <sup>2</sup>Tipopolpa Branca (PB): (1): Muito Organizado; (2): pouco desorganizado; (3): moderada a amplamente desorganizado.

<sup>3</sup>Tamanho dos folículos linfóides como a seguir: 0 = ausente; 1 = pequeno; 2 = médio; 3 = grande.

<sup>4</sup>Granuloma, infiltração célula de plasma ou de neutrófilos: presença mas pequena (1), moderado (2) ou em grande número (3) por corte de tecido. <sup>5</sup>Descrição de espessamento e infiltração inflamatória na cápsula, classificada como a seguir: 0 = ausente; 1 = pouco; 2 = moderado; 3 = intenso.



**Figura 15** Achados histológicos do baço de cães com leishmaniose visceral avaliados quanto a distribuição da carga parasitária esplênica. Os principais achados histológicos: A) folículo linfóide organizado (folículo tipo 1, 40x), B) de folículos linfóides altamente desorganizado (folículo tipo 3, 40x), C) granuloma bem organizado, 200x, D) infiltração de células do plasma (setas indicam células plasmáticas característica aparelho de Golgi) 200x, E) infiltração de neutrófilos polimorfonucleares, 400x, F) perisplenite crônica, 200x.

## 5.4 DISCUSSÃO

Através da análise dos cortes histológicos, desenvolve-se a percepção de que a distribuição desses parasitas está longe de ser homogênea nos órgãos de indivíduos naturalmente infectados (SANTANA et al., 2008). No entanto, nenhum estudo sistemático sobre a distribuição intra-órgão do protozoário em vários órgãos (baço, medula óssea, gânglios linfáticos e do fígado) em seres humanos e cães infectados naturalmente foi realizada até agora.

De um modo semelhante, o exame anatomopatológico do baço, incluindo em indivíduos com LV, foi realizada tendo em conta um ou mais fragmentos de tecidos coletados de uma forma que não representa necessariamente todo o órgão.

O baço oferece várias vantagens para a avaliação do parasitismo no cão com LV, uma vez que é um dos principais órgãos parasitados na infecção e amostras são relativamente fáceis de obter, para análise (BARROUIN-MELO et al., 2006). Amostras podem ser obtidas por aspiração com agulha fina do baço de cães sedados apenas superficialmente, quase sem incidentes indesejáveis (BARROUIN-MELO et al., 2006). Hemorragia na cavidade abdominal, que é uma das preocupações das punções de baço de seres humanos (CHULAY e BRYCESON, 1983; SUNDAR; RAI, 2002), não tende a ocorrer em cães, provavelmente devido ao fato de a cápsula do baço de cães ser mais espessa e conter fibras musculares lisas (ONKAR; GOVARDHAN, 2013), capazes de contrair e obstruir o buraco produzido pela inserção da agulha durante o procedimento.

Vários métodos têm sido utilizados para detectar a presença do parasita ou determinar a carga parasitária num indivíduo com LV, incluindo a coleta dos aspirados de baço, medula óssea, e nódulos linfáticos, seguido por exame de esfregaços corados sob o microscópio e cultura envolvendo ou não diluição limitante. No entanto, recentemente, PCR em tempo real tem sido o método mais amplamente utilizado por pesquisadores para alcançar os objetivos acima citados.

No sentido de contribuir para aumentar a robustez dos dados obtidos em estudos em leishmaniose causadas por protozoários do complexo de *L. donovani*, foi aqui descrita a distribuição de carga parasitária e as alterações histológicas no baço de 6 cães com leishmaniose visceral (LV). Todos os 6 cães avaliados no presente trabalho eram de uma área endêmica e no primeiro exame clínico mostrou sinais compatíveis com a forma sintomática de LV (F. MANCIANTI, M. GRAMICCIA, 1988; KOUTINAS et al., 1999; P. CIARAMELLA, G. OLIVA, R. DE LUNA, L. GRADONI, R. AMBROSIO, L. CORTESE, 1997). Além disso,

esses animais também tiveram resultados positivos para anticorpos anti-*Leishmania* (IFAT) e cultura de aspirado de baço positiva para *Leishmania*. Quatro meses depois, quando os animais foram examinados por uma segunda vez, os sinais clínicos tiveram uma tendência para aumentar em intensidade e aparecimento de novos sinais clínicos, sugerindo progressão da doença. Após a eutanásia, DNA de *Leishmania* foi detectado por PCR em tempo real em todas as nove amostras de 5 animais e não foi detectada em qualquer amostra de um animal. Nos cães em que foi detectado o DNA de *Leishmania*, não havia variação considerável na carga parasitária, o número médio ( $M = 978,694$ ) de parasitas por grama de tecido no animal mais parasitado foi 61,7 vezes maior do que o animal menos parasitado ( $M = 15.863$ ). Além disso, uma grande variação relativa foi observada nos valores de carga parasitária de diferentes amostras de cada cão, a proporção entre o maior e o menor valor variou de 3,2 (cão # 325) a 34,7 vezes (cão # 335).

O presente estudo, que foi realizado com um pequeno número de animais, não permite a determinação da probabilidade de detecção de DNA de *Leishmania* ou a precisão da estimativa de carga parasitária em uma única amostra de baço de um cão naturalmente infectado. Por isso, um número muito maior de cães, incluindo animais com diferentes apresentações clínicas (assintomática, oligossintomática e formas polissintomáticas da doença), teria de ser estudada, e uma modelação matemática necessária teria de ser aplicada. As informações obtidas a partir de uma tal abordagem pode ter um impacto sobre os estudos de diagnóstico, patogênese, e desenvolvimento de terapias profiláticas e curativas.

No estudo atual, em 5 cães em que o DNA de *Leishmania* foi detectado por PCR em tempo real, 4 apresentaram pelo menos uma alteração histológica (desorganização polpa branca, granulomas ou perisplenite) freqüentemente encontrada em animais potencialmente sensíveis e todos eles exibiram infiltração de células plasmáticas em ao menos uma parte do baço (SANTANA et al., 2008). Curiosamente, cada um destes cinco animais apresentaram algum grau de infiltração de neutrófilos polimorfonucleares por razões desconhecidas. Pode-se especular que este achado poderia estar relacionado a infecções bacterianas secundárias predispostos por LV (ANDRADE et al, 1990; P. CIARAMELLA, G. OLIVA, R. DE LUNA, L. GRADONI, R. AMBROSIO, L. CORTESE, 1997). Curiosamente, algumas variações em relação a mudanças histológicas foi encontrado em secções de baço de alguns animais, por exemplo, do número de granulomas (em cão # 332) e intensidade de perisplenite (cão # 353), que variou de pequena a grande número e de leve a intensa, respectivamente. A fim de melhor apreciar a contribuição da variação de alterações histológicas no global da doença, seria

interessante avaliar um número maior de animais e realizar análises morfométricas de vários componentes em diferentes regiões do baço.

Uma situação curiosa foi apresentada pelos cão # 343. Aquele animal tinha linfadenopatia na primeira avaliação clínica, IFAT positiva e cultura positiva do aspirado de baço para *Leishmania*. Na segunda avaliação clínica também teve alopecia e onicogrifose. No entanto, o DNA de *Leishmania* não foi detectada em qualquer uma das nove amostras avaliadas do baço, apesar do rDNA 18S ter sido detectado por PCR em tempo real nas mesmas amostras, eliminando a possibilidade de degradação de DNA e a presença de algum fator de inibição da PCR. Histologicamente, o cão # 343 mostrou apenas infiltração de células plasmáticas e de neutrófilos no baço, sem revelar granuloma. Uma possível explicação seria infecções simultâneas por *ancilostomíase* e *Leishmania* (Muller e Kirk's) com controle posterior deste último ao ponto de promover a falha de detecção do DNA do parasita. Outra possibilidade seria a de que a infecção no cão 343 foram causados por outras espécies de *Leishmania*, tal como *Leishmania amazonensis*, o que seria pouco detectável por PCR em tempo real, utilizada neste estudo (SOLCÀ et al., 2014).

## 5.5 CONCLUSÃO

A distribuição da carga parasitária e as alterações histológicas no baço de cães com leishmaniose visceral mostram um certo grau de heterogeneidade.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Com o objetivo de desenvolver ferramentas úteis para o desenvolvimento uma vacina contra leishmaniose visceral canina, diferentes capítulos foram desenvolvidos:

No primeiro capítulo, objetivou-se desenvolver um modelo canino para avaliar antígenos candidatos a vacina contra leishmaniose visceral canina. Acreditou-se que a inoculação com formas promastigotas de fase estacionária de *Leishmania infantum*, por via dérmica em cães, fosse capaz de induzir um estado de resistência. Os cães inoculados desenvolveram forma subclínica da infecção com uma área de induração e ulceração rasa no local da inoculação do parasita com cura espontânea, os animais não apresentaram manifestações clínicas para LVC e nem alterações hematológicas e bioquímicas séricas. A produção de anticorpos da classe IgG reativos a antígenos de *Leishmania* foi baixa e flutuante, apresentou resposta linfoproliferativa frente a estimulação com antígenos de *Leishmania*, teve baixa produção de IFN- $\gamma$ , a carga parasitária foi baixa em aspirado de baço quando detectada pelo método de PCR em tempo real. Ou seja, os animais desenvolveram uma forma subclínica da infecção ao lado de resposta imune humoral e celular fracas. Desta forma, é importante a realização de estudos mais aprofundados visando a obtenção do modelo animal com uma resposta imune celular mais intensa. Para isso, como perspectiva do estudo, pretende-se realizar modificações no protocolo com sensibilização e reforço realizados pelo inoculação de *Leishmania*, de modo que seja útil em ensaios de triagem de antígenos e que possam compor uma vacina contra leishmaniose visceral canina.

No segundo capítulo, avaliou-se a produção de citocinas por células de sangue periférico de cães de área endêmica para leishmaniose visceral. Imaginou-se que a reatividade de sangue periférico de cães exposto a *Leishmania infantum* fosse capaz de permitir a identificação de cães resistentes ou susceptíveis. Devido ao fato de ter havido alguns problemas técnicos na realização do experimento, com os dados obtidos não foi possível caracterizar o padrão de citocinas produzidas pelos animais, nem tão pouco identificá-los como animais susceptíveis e resistentes. Os resultados obtidos na análise atual com 20 cães de área endêmica, somente dois cães apresentaram PCR em tempo real positivo. Sendo importante analisar um maior número de cães de área endêmica e de modo que se obtenha grupo de cães mais heterogêneo. Além disso, experimentos adicionais serão necessários para caracterizar e determinar as concentrações e os efeitos de mitógenos.

No terceiro capítulo, estudou-se a carga parasitária e aspectos histológicos em diferentes regiões do baço de cães com leishmaniose visceral. Buscou-se entender se a carga parasitária no baço de cães com leishmaniose visceral apresentava distribuição heterogênea. Como resultado, observou-se que a distribuição da carga parasitária e as alterações histológicas no baço de cães com leishmaniose visceral mostram um certo grau de heterogeneidade. Esse dado é importante para que se entenda a distribuição da carga parasitária no órgão do animal, de modo que durante as atividades de diagnóstico, seja detectada uma carga parasitária representativa de todo o órgão do animal. Estudos assim também podem auxiliar no entendimento sobre controle da carga parasitária e na regulação da imunopatologia associada à infecção. Como perspectiva, pretende-se avaliar a distribuição da carga parasitária no baço e fígado de cães oligossintomáticos e polissintomáticos de área endêmica para leishmaniose visceral.

Conjuntamente, os resultados indicam que estudos que visam contribuir para o desenvolvimento uma vacina contra LVC são de grande importância e devem ter continuidade. Desta forma, é importante a realização de estudos mais aprofundados visando a utilização de outras estratégias.



## REFERÊNCIAS

- A. B. NEOGY, A. NANDY, B. GHOSH DASTIDAR, A. B. C. Antibody Kinetics in Kalazar in response to treatment. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 81, p. 727–729, 1987.
- ABRANCHES, P. et al. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. **Parasite immunology**, v. 13, n. 5, p. 537–550, 1991.
- AHMED, S. et al. Intradermal Infection Model for Pathogenesis and Vaccine Studies of Murine Visceral Leishmaniasis. **Society**, v. 71, n. 1, p. 401–410, 2003.
- AIHARA, H.; MIYAZAKI, J. Gene transfer into muscle by eletroporation in vivo. **Nature Biotechnonology**, v. 16, p. 867–70, 1998.
- ALMEIDA, M. A. O. et al. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 106, p. 151–158, 2005.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ALVES, F. et al. Expression of IFN-  $\gamma$  , TNF-  $\alpha$  , IL-10 and TGF-  $\beta$  in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology** v. 128, p. 349–358, 2009.
- ATO, M. et al. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. **Nature Immunology**, v. 3, n. 12, p. 1185–1191, 2002.
- ATO, M. et al. Loss of dendritic cell migration and impaired resistance to *Leishmania donovani* infection in mice deficient in CCL19 and CCL21. **Journal of Immunology** , v. 176, n. 9, p. 5486–5493, 2006.
- BACELLAR, O. et al. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 12, n. 8, p. 1228–1231, ago. 2000.
- BADARO, R. et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 6, p. 1003–1011, 1986.
- BALEEIRO, C. O.; PARANHOS-SILVA, M.; C, J. Montenegro ' s skin reactions and antibodies against different *Leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniosis endemic area. **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 21–28, 2006.
- BARROUIN-MELO, S. M. et al. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 195–197, 2004.

- 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. **Veterinary Journal**, v. 171, n. 2, p. 331–339, 2006.
- BORJA-CABRERA, G. P. et al. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). **Vaccine**, v. 20, n. 27-28, p. 3277–3284, 2002.
- BRASIL. **Guia de vigilância em saúde**. [s.l: s.n.].
- BRONTE, V.; PITTET, M. J. The Spleen in Local and Systemic Regulation of Immunity. **Immunity**, v. 39, n. 5, p. 806–818, 2013.
- BURNS, J. M. et al. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. v. 90, n. January, p. 775–779, 1993.
- CAMPINO, L. et al. Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, 2000.
- CHAREST, H.; MATLASHEWSKI, G. Developmental Gene Expression in *Leishmania donovani*: Differential Cloning and Analysis of an Amastigote-Stage- Specific Gene. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n. 5, p. 2975–2984, 1994.
- CIBRELUS, P. et al. Secreted antigens of the amastigote and promastigote forms. **Parasite**, v. 6, p. 121–129, 1999.
- CORREDOR, A. Epidemiology of visceral leishmaniosis in Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 8, n. 371, p. 480–486, 1989.
- COSTA, D. J. et al. Experimental Infection of Dogs with *Leishmania* and Saliva as a Model to Study Canine Visceral Leishmaniasis. **Plos One**, v. 8, n. 4, 2013.
- COURTENAY, O. et al. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniosis in areas of high transmission. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 9, p. 1314–1320, 2002.
- CRUZ-CHAN, J. et al. A canine model of experimental infection with *Leishmania (L.) mexicana*. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 361, 2014.
- 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 Amarante, RN). **Vaccine**, v. 19, p. 1082–1092, 2001.
- DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 239–243, 2001.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

- DOS-SANTOS, W. L. C. et al. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 3-4, p. 251–259, 2008.
- ELENA, P. et al. Leishmania infantum- specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **European Journal Immunology**, v. 25, p. 1594–1600, 1995.
- F. MANCIANTI, M. GRAMICCIA, L. G. AND S. P. Studies on canine leishmaniasis control.1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, p. 566–567, 1988.
- FERNANDES, A. P. et al. Protective immunity against challenge with Leishmania (Leishmania) chagasi in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888–5895, 2008.
- FERNANDES, A. P. et al. Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rational, update and perspectives. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 476–85, 2012.
- FERREIRA, E. D. C. et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology**, v. 146, n. 3-4, p. 235–241, 2007.
- FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, 2006.
- FROMMEL, D. et al. Vaccine-Induced Immunity against Cutaneous Leishmaniasis in BALB / c Mice. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 4, p. 843–848, 1988.
- GHALIB, H. W.; AHMED, M.; STEVEN, G. Interleukin 10 Production Correlates with Pathology in Human Leishmania donovani Infections. **Journal of Clinical Investigation** v. 92, n. July, p. 324–329, 1993.
- GHOSH, A.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1 / Th2 and a humoral response which protects mice against Leishmania donovani infections. **Vaccine**, v. 20, p. 59–66, 2002.
- GIDWANI, K. et al. Interferon-Gamma release assay (modified quantiFERON) as a potential marker of infection for Leishmania donovani, a proof of concept study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 4, p. 2–6, 2011.
- GOTO, Y. et al. Serodiagnostic Evaluation of Leishmania infantum Tandem Repeat Proteins Cloning , Characterization , and Serodiagnostic Evaluation of Leishmania infantum Tandem Repeat Proteins. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 7, p. 3939–3945, 2006.
- GRADONI, L. Canine Leishmania vaccines: Still a long way to go. **Veterinary Parasitology**, 2015.

HANDMAN, E. Leishmaniasis : Current Status of Vaccine Development Leishmaniasis : Current Status of Vaccine Development. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 229–243, 2001.

IBRAHIM, M. K. et al. The malnutrition-related increase in early visceralization of *Leishmania donovani* is associated with a reduced number of lymph node phagocytes and altered conduit system flow. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 8, p. e2329, 2013.

JÚNIOR, A. D. O. et al. Asymptomatic *Leishmania chagasi* Infection in Relatives and Neighbors of Patients with Visceral Leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 1, p. 15–20, 1997.

KAYE, P. M. et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunological Reviews**, v. 201, p. 239–253, 2004.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

KILLICK-KENDRICK, R. et al. A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies. **Parasite**, v. 1, p. 311 - 318, 1994.

KOUTINAS, A F. et al. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, n. 5, p. 376–383, 1999.

LAGE, R. S. et al. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, p. 135–145, 2007.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. p.1-20

LEMESRE, J. et al. Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. **Vaccine**, v. 23, p. 2825–2840, 2005.

LEMESRE, J. L. et al. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: Double-blind randomised efficacy field trial. **Vaccine**, 2007.

LIMA, I. S. et al. Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

LINDELL, D. M. et al. B Cell Antigen Presentation Promotes Th2 Responses and Immunopathology during Chronic Allergic Lung Disease. v. 3, n. 9, 2008.

MAGALHÃES, F. B. **Identificação e avaliação de novos antígenos recombinantes para o diagnóstico das leishmanioses viscerais humana e canina**, 2007

MANZILLO, V. F. et al. Prospective Study on the Incidence and Progression of Clinical Signs in Naïve Dogs Naturally Infected by *Leishmania infantum*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, p. 1–8, 2013.

MAURICIO, I. L. et al. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v. 119, Pt 3, p. 237–246, 1999.

MAURÍCIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v. 16, n. 5, p. 188–189, 2000.

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nature Review Immunology**, v. 5, p. 606–616, 2005.

MELBY, P. C. et al. Identification of vaccine candidates for experimental visceral leishmaniasis by immunization with sequential fractions of a cDNA expression library. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 10, p. 5595–5602, 2000.

MELBY, P. C.; NEVA, F. A; SACKS, D. L. Profile of human T cell response to leishmanial antigens. Analysis by immunoblotting. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 83, n. 6, p. 1868–1875, 1989.

MICHALLSKY, E. et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 67–76, 2007.

MIRÓ, G. et al. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 8, p. 371–377, 2008.

MORENO, J. et al. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 71, n. 3-4, p. 181–195, 1999.

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

MOSMANN, T. R. ; COFFMAN, R. L. . TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review Immunology**, v. 7, p. 145–173, 1989.

MURRAY, H. W.; CARTELLI, D. M. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 72, n. 1, p. 32–44, 1983.

OLIVA, G. et al. A Randomised, Double-Blind, Controlled Efficacy Trial of the LiESP/QA-21 Vaccine in Naive Dogs Exposed to Two *Leishmania infantum* transmission Seasons. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, 2014.

- OLIVEIRA, G. G. S. et al. Characterization of Novel *Leishmania infantum* Recombinant Proteins Encoded by Genes from Five Families with Distinct Capacities for Serodiagnosis of Canine and Human Visceral Leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 6, p. 1025–1034, 2011.
- ONKAR, D. P.; GOVARDHAN, S. A. Comparative histology of human and dog spleen. **Journal of Morphological Sciences**, v. 30, n. 1, p. 16–20, 2013.
- P. CIARAMELLA, G. OLIVA, R. DE LUNA, L. GRADONI, R. AMBROSIO, L. CORTESE, A. S. A. P. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Record**, v. 141, p. 539–543, 1997.
- PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. et al. The FML (fucose mannose ligand) of *leishmania donovani*. A new tool in diagnosis, prognosis, transfusional control and vaccination against human Kala-azar. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 2, p. 153–163, 1996.
- 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. **Veterinary Parasitology**, v. 114, n. 2, p. 97–111, 2003.
- PEREIRA, A. et al. Veterinary Immunology and Immunopathology Transcription of innate immunity genes and cytokine secretion by canine macrophages resistant or susceptible to intracellular survival of *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 163, n. 1-2, p. 67–76, 2015.
- PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 1, p. 229–235, 1994a.
- PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and immunity**, v. 62, n. 1, p. 229–35, 1994b.
- PINELLI, E. et al. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 69, p. 121–126, 1999.
- PINHEIRO, C. **Avaliação da resposta imune em camundongos utilizando diferentes protocolos de imunização com antígenos recombinantes de leishmania chagasi**. [s.l: s.n.].
- RAI, A. K. et al. Impaired expression of CD26 compromises T-cell recruitment in human visceral leishmaniasis. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 10, p. 2782–2791, 2012.
- READY, P. D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Annual Review Entomology**, v. 58, p. 227–250, 2013.

REIS, A. B. et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 146, n. 2, p. 303–311, 2006.

REIS, A. B. et al. Veterinary Immunology and Immunopathology Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, p. 87–95, 2009.

REIS, L. E. S. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Veterinary Parasitology**, 2013.

RHALEM, A et al. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary parasitology**, v. 81, n. 3, p. 173–84, 1999a.

RHALEM, A. et al. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, 1999b.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 1–8, 2012.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. *Leishmania*-host-cell interaction: Complexities and alternative views. **Parasitology Today**, v. 16, n. 7, p. 292–297, 2000.

SANCHEZ, M. A. et al. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis : analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *leishmania chagasi*. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 6, p. 618–624, 2004.

SANTANA, C. C. et al. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. **Parasite Immunology**, v. 30, n. 10, p. 515–524, 2008.

SANTOS-GOMES, G. M.; CAMPINO, L.; ABRANCHES, P. Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2000.

SCHNEIDER, W. L.; GREENE, A. N. N. E.; ALLISON, R. F. The Carboxy-Terminal Two-Thirds of the Cowpea Chlorotic Mottle Bromovirus Capsid Protein Is Incapable of Virion Formation yet Supports Systemic Movement. **Journal of Virology**, v. 71, n. 6, p. 4862–4865, 1997.

SCHULZ, A et al. Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic *Leishmania* organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1529–1535, 2003.

SILVA, J. S. et al. Low CXCL13 expression, splenic lymphoid tissue atrophy and germinal center disruption in severe canine visceral leishmaniasis. **PloS one**, v. 7, n. 1, p. e29103, jan. 2012.

- SINGH, O. P. et al. Cytokine Responses to Novel Antigens in an Indian Population Living in an Area Endemic for Visceral Leishmaniasis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 10, 2012.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine Leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 560–563, 2001.
- SOLCÀ, M. D. S. et al. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 2-4, p. 133–140, 2012.
- SOLCÀ, M. D. S. et al. Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.
- STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 2, p. 138–147, 2007.
- STEINIGER, B.; RÜTTINGER, L.; BARTH, P. J. The Three-dimensional Structure of Human Splenic White Pulp Compartments. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 51, n. 5, p. 655–663, 2003.
- STRAUSS-AYALI, D. et al. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. **The Journal of infectious Diseases**, v. 189, p. 1729–33, 2004.
- SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 6, n. 11, p. 849–854, 2001.
- SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 5, p. 951–958, 2002.
- SUTTIE, A. W. Histopathology of the spleen. **Toxicologic Pathology**, v. 34, p. 466–503, 2006
- TEIXEIRA, M. C. A et al. A strategy for identifying serodiagnostically relevant antigens of *Leishmania* or other pathogens in genetic libraries. **Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization**, v. 35, n. 1, p. 51–54, 2007.
- TEIXEIRA, M. C. A. et al. An experimental protocol for the establishment of dogs with long-term cellular immune reactions to *Leishmania* antigens. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 2, p. 182–189, 2011.
- THALHOFER, C. J. et al. Leukocytes Infiltrate the Skin and Draining Lymph Nodes in Response to the Protozoan *Leishmania infantum* chagasi. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 1, p. 108–117, 2011.
- TRAVI, B. L. et al. Canine visceral leishmaniasis: Dog infectivity to sand flies from non-endemic areas. **Research in Veterinary Science**, p. 1-5, 2002.



TSAGOZIS, P.; KARAGOUNI, E.; DOTSIKA, E. Function of CD8+ T lymphocytes in a self-curing mouse model of visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 54, n. 2, p. 139–146, 2005.

TURGAY, N. et al. Quantiferon-Leishmania as an Epidemiological Tool for Evaluating the Exposure to Leishmania Infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 4, p. 822–824, 2010.

VERESS, B. et al. Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. **Immunology**, v. 33, n. 5, p. 605–610, 1977.

WHO. Control of the leishmaniases. **World Health Organization Technical Report Series**, n. 949, p. 22–26, 2010.

WILSON, M. E. et al. A recombinant Leishmania chagasi antigen that stimulates cellular immune responses in infected mice. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 5, p. 2062–9, 1995.

YANG, J. et al. Induction of Potent Th1-Type Immune Responses from a Novel DNA Vaccine for West Nile Virus New York Isolate ( WNV-NY1999 ). **Journal of Infectious Diseases**, v. 184, p. 809–816, 2001.

## **ANEXOS**

Neste capítulo é citado o trabalho que foi submetido à revista de indexação internacional durante o período do doutorado. O primeiro artigo desta tese foi submetido e está em análise. Ele originou-se a partir de dados contidos na tese e tem como título: Parasite burden and histological aspects in different regions of the spleen of dogs with visceral leishmaniasis.

1 Parasite burden and histological aspects in different regions of the spleen of dogs with  
2 visceral leishmaniasis

3

4 Naiara Carvalho Teixeira Bagues<sup>1</sup>, Cristiane Garboggini Melo de Pinheiro<sup>1</sup>, Leila  
5 Andrade Bastos<sup>1</sup>, Deborah Bittencourt Mothé Fraga<sup>1,2,3</sup>, Patrícia Sampaio Tavares  
6 Veras<sup>1,3</sup>, Lain Carlos Pontes de Carvalho<sup>1</sup>, Washington LC dos-Santos<sup>1</sup>, Geraldo Gileno  
7 de Sá Oliveira<sup>1,3,\*</sup>.

8

9 <sup>1</sup>Centro Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia (CPqGM-  
10 FIOCRUZ/BA), Brazil.

11 <sup>2</sup>Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.

12 <sup>3</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais (INCT-DT).

13

14 E-mail addresses

15

16 Naiara Carvalho Teixeira Bagues: naiara@aluno.bahia.fiocruz.br, Cristiane Garboggini

17 Melo de Pinheiro: cpinheiro@posdoc.bahia.fiocruz.br, Leila Andrade Bastos:

18 leila.bastos@aluno.bahia.fiocruz.br, Deborah Bittencourt Mothé Fraga:

19 deborah.fraga@bahia.fiocruz.br, Patrícia Sampaio Tavares Veras:

20 pveras@bahia.fiocruz.br, Lain Carlos Pontes-de-Carvalho: lain@bahia.fiocruz.br ,

21 Washington Luis Conrado dos-Santos: wluis@bahia.fiocruz.br, Geraldo Gileno de Sá

22 Oliveira: ggileno@bahia.fiocruz.br

23

24 Corresponding author:

25 \*Oliveira, G.G.S. Laboratório de Patologia e Bio-Intervenção, Centro de Pesquisas

26 Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão, No. 121, Candeal,

27 Salvador, Bahia, BRAZIL. CEP. 40295-001. Tel: 55-71-3176-2262; Fax: 55-71 3176-2273,

28 [ggileno@bahia.fiocruz.br](mailto:ggileno@bahia.fiocruz.br)

29

30 **Abstract**

31 **Background:** The protozoa of the *Leishmania donovani* complex can cause from  
32 subclinical infection to severe disease in humans and dogs. From the dermal  
33 inoculation site, protozoa disseminate to organs rich in mononuclear phagocytic cells,  
34 affecting mainly the spleen, liver, bone marrow and lymph nodes. Although the  
35 parasitic load distribution and histological alterations may not be homogeneous in the  
36 organs affected in naturally infected individuals, the studies on visceral leishmaniasis  
37 usually disregard tissue sampling. In the current work, the parasite load and  
38 histological changes in the spleen of 6 dogs with visceral leishmaniasis were evaluated  
39 by sampling each third section of the organ.

40 **Results:** The parasite load showed a considerable degree of distribution variation in  
41 the spleen of the same animal. Histological changes (white pulp disorganization,  
42 granulomas, perisplenitis, plasma cell, and polymorphonuclear infiltration) displayed  
43 variation in frequency (granulomas) or intensity (perisplenitis) in the spleen of 2 out of  
44 the 6 dogs.

45 **Conclusions:** The data shown in the current work suggest that distribution of parasite  
46 burden and histological changes in spleen of dogs with visceral leishmaniasis may  
47 present some heterogeneity.

48 **Key words:** Dog, visceral leishmaniasis, spleen, parasite burden, distribution

49

## 50 **Background**

51 Visceral leishmaniasis (VL) is a disease caused mostly by protozoa of the *Leishmania*  
52 *donovani* complex and is potentially fatal in the absence of specific treatment [1].

53 Epidemiologically, VL can be classified in two subtypes: anthroponotic and zoonotic.

54 [1]. The zoonotic subtype of VL, which is found mainly in Brazil, in the countries of the

55 Mediterranean Basin, Portugal and in the Middle East [1], affects predominantly

56 human beings and the domestic dog, being the latter the main reservoir of *Leishmania*

57 *infantum* (syn. *L. chagasi*) [2, 3], its causal agent. In endemic areas, the infection rate

58 may exceed 60 % of the canine population [4-7]. Unfortunately, a vaccine against

59 canine visceral leishmaniasis demonstrated to be effective is still unavailable. In

60 addition, dogs treated with the currently available drugs tend to develop only transient

61 clinical cure, without parasitological cure, and, after treatment, relapses are frequent

62 even in the absence of re-infection [8, 9]. For the reasons mentioned above, canine LV

63 poses a major public health and veterinary medicine concern.

64 The *Leishmania* is transmitted from individual to individual by the skin bite of insect

65 vectors of the genera *Phlebotomus* and *Lutzomyia* [10]. After dermal inoculation by the

66 vector, protozoa of the *Leishmania donovani* complex are transported inside

67 phagocytic cells to draining lymph nodes [11]. From there, they reach the bloodstream  
68 and spread primarily to organs of the mononuclear phagocytic system [12], especially  
69 the spleen, bone marrow, liver and lymph nodes. In these organs, the innate and  
70 adaptive immune system cells will determine the extent of parasite survival and  
71 multiplication, development of host tissue damage, and fate of the infection [13].

72 The spleen, which is the largest secondary lymphoid organ, is positioned between the  
73 abdominal segment of the aorta and the hepatic portal vein and has no afferent  
74 lymphatic vasculature. In this strategic position, the spleen filters blood from the body  
75 and performs important functions that include: a) removing undesirable particles from  
76 the circulation (e.g. old red blood cells and infectious agents such as viruses, bacteria,  
77 fungi, and protozoa); b) carrying out immune responses to systemically distributed  
78 antigens, both innate (by phagocytosis, natural antibodies, and making iron  
79 unavailable) and adaptive (humoral and cellular); c) implementing immunoregulation;  
80 and d) (depending upon the mammalian species) storing RBCs (e.g.: in dogs, cats, and  
81 horses) and developing hematopoietic activity (e.g.: in mice and rats) [14-17]. In  
82 individuals infected with protozoa of the *L. donovani* complex, the spleen tends to be  
83 parasitized during the whole period of the infection [12, 13, 18, 19], and very often  
84 develops functional and architectural changes [20-23], leading to a state of  
85 immunosuppression that compromises the host capacity to control the protozoan  
86 infection and infections caused by other microorganisms [24].

87 Studies on pathogenesis of VL show some discrepancy of data obtained from the  
88 murine model and dogs naturally inoculated by *Leishmania* [21-23, 25-27]. Some of the  
89 discrepancies observed in the findings may be related to the methodology used,

90 including the phase in which the infection was studied. However, although important,  
91 the study of experimental murine infection will always provide a limited view that may  
92 represent little of the complexity of the natural infection that occurs in dogs and  
93 human beings. This may happens for several reasons, including different inocula, time  
94 of infection, parasite burden and distribution, host age, genetic and nutritional aspects  
95 of the host, genetic aspects of the parasite, associated infections, etc.

96 In naturally infected animals (e.g. humans and dogs), the distribution of the  
97 *Leishmania* load as well as the histological and functional changes in each affected  
98 organ may be heterogeneous [21]. Yet, to the best of our knowledge, there are no  
99 reports evaluating the distribution of these findings in the affected organs.

100 Detailed information on distribution of *Leishmania* burden and histological changes in  
101 several organs, especially in the spleen, in dogs with different clinical forms  
102 (asymptomatic, oligosymptomatic, and polysymptomatic) of the VL may help to  
103 understand better the limitation and significance of determining the parasite load in  
104 only one sample of a few organs in studies that involve: a) diagnosis of the infection  
105 and disease, b) pathogenesis, c) development of therapeutic and prophylactic  
106 methods. A deeper knowledge of the parasite load will allow the designing of more  
107 rational studies of pathogenesis and assessment of the outcome of immunization or  
108 treatment protocols, for example, in terms of the required number of animals per  
109 experimental group and number of samples to be collected.

110 In the present work, parasite loads and morphological changes were evaluated in 9  
111 aspirate samples and 6 fragments, respectively, collected to represent the upper,  
112 middle and lower third sections of the spleen of 6 dogs with VL. The parasite load was

113 assessed by real-time PCR using the TaqMan system and the morphological changes  
114 were assessed by conventional histology. Interestingly, although there was  
115 considerable variation in the distribution of the parasite load (between 3.2 to 34.7  
116 times in spleen samples of the same animal), relatively little variation in the  
117 histological alterations was observed in different splenic sections of the same dog.

118

## 119 **Methods**

### 120 **Animals**

121 Blood samples of 800 pet dogs were collected while conducting a project with the  
122 objective of studying the natural history and develop diagnostic methods for canine  
123 visceral leishmaniasis in Camaçari, Brazil [28]. With the consent of their owners, these  
124 dogs were clinically examined and subjected to spleen aspirate puncture, by the  
125 method previously described by Barrouin-Melo and collaborators [29], followed by  
126 culture of the aspirate in NNN biphasic medium supplemented with 20 % fetal bovine  
127 serum (FBS). Among the 800 dogs, 6 mongrel animals that showed: a) anti-*Leishmania*  
128 antibodies, detected by indirect immunofluorescence assay (IFAT, carried out with  
129 BioManguinhos leishmaniasis detection kit, Rio de Janeiro, Brazil, at the Central  
130 Laboratory of the State of Bahia, Brazil), b) *Leishmania* promastigotes growth in culture  
131 of splenic aspirate, and c) clinical signs compatible with visceral leishmaniasis were  
132 selected for the study. Four months later, the selected dogs were housed at the CCZ.  
133 The animals were clinically re-examined and then euthanized, according to Brazilian  
134 Ministry of Health determinations, under deep anesthesia (1 mg/kg of xylazine, 15



135 mg/kg of ketamine and 25 mg/kg thiopental) by intravenous injection of saturated  
136 potassium chloride solution.

137

### 138 **Collecting splenic samples for real-time PCR and histological studies**

139 After euthanasia, the spleen of each animal was removed from the abdominal cavity  
140 and subjected to needle puncture aspirations in 9 different spots (3 in each third of the  
141 organ: upper, middle and lower third; Figure 1). For this, a separate 42 x 1.2 mm  
142 needle attached to a 20 mL syringe set up was used for each sample collection. Each  
143 splenic aspirate was transferred to a pre-weighted Eppendorf tube that was  
144 immediately placed under dry ice and then stored at -70° C until use. Later, each  
145 sample weight was determined. In addition, cross sections of the spleen were  
146 performed in each third of the spleen (see Figure 1) and two fragments of about 4 mm  
147 thickness of each third of the organ were collected and fixed in phosphate-buffered 10  
148 % formalin.

149

### 150 **Tissue processing and analysis**

151 Histological sections with 3 µm thickness of the splenic fragments were stained with  
152 hematoxylin and eosin, and then examined in an optical microscope. Tissue section  
153 analysis was performed by a pathologist, one of the authors, who has extensive  
154 experience in histological evaluation of dogs with VL, without knowledge of the clinical  
155 manifestations and splenic parasite load of the animal under analysis. The criteria used  
156 for analyzing the tissue sections were essentially those previously described by

157 Santana and collaborators [21]. Each histological finding was semi-quantified according  
158 to the intensity as mild (1), moderate (2) or intense (3).

159

#### 160 **Real-time PCR**

161 DNA was extracted from the splenic aspirate samples with DNAeasy Blood & Tissue kit  
162 (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's recommendations, and had  
163 the concentration determined in a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher  
164 Scientific, Wilmington, USA). The tissue samples were digested with proteinase K  
165 overnight [30]. The real-time PCR assay was performed, essentially, according to the  
166 method described by Francino and collaborators [31]. Briefly, triplicates of 25  $\mu$ L  
167 reactions were performed with 150 ng of sample DNA, primers LEISH-1 (5'-  
168 AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') and LEISH-2 (5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3') and FAM-  
169 MGB probe (FAM-5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'-MGB) for *Leishmania* minicircle DNA  
170 conserved sequence or specific primers and probe for detection of mammalian 18S  
171 rDNA (negative control, Applied Biosystems, Carlsbad, USA), 0.2 mg/ $\mu$ L of bovine  
172 serum albumin, and TaqMan master mix (Applied Biosystems). For preparation of a  
173 calibration curve, amounts of DNA from 0.1 to  $10^5$  *Leishmania* prosmatigotes were  
174 used. Reactions were carried out and read in a 7500 Fast real-time PCR system  
175 (Applied Biosystems, Foster City, USA). The parasite burden was expressed by number  
176 of *Leishmania* per gram of splenic tissue, using the formula below:

$$\text{Number of parasite per gram of spleen} = \frac{\text{Number of parasite per 150 ng of sample DNA} \times \frac{\text{Weight of DNA purified from aspirate sample in ng}}{\text{Weight of aspirate sample in mg}} \times 1.000}{150}$$

177

178 **Ethical statements**

179 The current work was carried out in accordance with the Brazilian Federal Law on  
 180 Animal Experimentation (Law 11794) ([http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm)). The protocol was approved by the Ethics Committee for  
 181 the Use of Animals in Goncalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation  
 182 (license number: 017/2010).  
 183

184

185 **Statistical analysis**

186 The parasitic burden of each splenic aspirate was expressed by the arithmetic mean of  
 187 the values from triplicate real-time PCR reactions.

188

189 **Results**190 **Immunological, parasitological and clinical characterization of the studied dogs**

191 The group of 6 dogs was composed of males and females and had an estimate age  
 192 ranging from 3 to 7 years of age. All the 6 dogs showed positive results for IFAT (>1:50)  
 193 and *Leishmania* promastigotes detection in semi-solid splenic aspirate cultures (Table  
 194 1). In addition, these animals displayed in two clinical examinations, carried out twice

195 with a 4-month interval, signs compatible with LV (Table 1). In these animals, the most  
196 frequent clinical manifestations were: skin lesions, including dermatitis with  
197 hyperkeratosis, alopecia, onychogryphosis and popliteal lymphadenopathy (Table 1).  
198 None of the animals showed weight loss. Four out of 6 animals showed 2 signs and 3  
199 or more signs compatible with VL in the first and in the second evaluation,  
200 respectively, suggesting a progression to a more severe form of the disease over time  
201 (Table 1).

202

### 203 **Evaluation of parasite burden in the spleen of dogs with LV**

204 The parasite burden was determined as the number of *Leishmania* per gram of tissue  
205 collected in 9 different spots of the spleen, being 3 samples from each third of the  
206 organ, by real-time PCR. Five out of the 6 animals showed parasite DNA in all 9  
207 samples evaluated and in one dog no protozoan DNA was detected (Figure 2). In the  
208 dogs in which parasite DNA was found, there was a large variation in the median of  
209 parasite load, being the median values 978,694 (dog# 320), 15,863 (dog# 325), 268,768  
210 (dog #332), 20,169 (dog #335) and 23,505 (dog #353) leishmanias per gram of spleen.  
211 The parasite load also varied in different samples of the spleen from each animal, the  
212 ratio between the highest and the lowest value for each animal was as follows: 25.8  
213 (dog # 320), 3.2 (dog # 325), 5.4 (dog # 332), 34.7 (dog # 335) and 5.6 (dog # 353). The  
214 animal (dog# 343) that showed no detectable *Leishmania* DNA in any tested samples  
215 displayed a good amplification of 18s rDNA in every one of its splenic samples (data  
216 not shown), suggesting that the DNA samples were in good condition and devoid of  
217 PCR inhibitory factors.

218

**219 Histological analysis of the spleen**

220 The major histological findings are shown in Table 2. The most common histological  
221 findings were: a) plasma cell infiltration (in 6 out of 6 dogs), b) polymorphonuclear  
222 neutrophil infiltration (in 6 out of 6), b) granulomas (in 4 out of 6), c) chronic  
223 perisplenitis (in 3 out of 6), d) disorganized white pulp (in 3 out of 6), and e) large  
224 lymphoid follicles (in 2 out of 6) (Table 2 and Figure 3). Relatively little variation of  
225 histological findings, including their frequency or intensity, was observed in the splenic  
226 sections of the same animal (Table 2). The only variations observed were in the  
227 frequency of granuloma and in the intensity of perisplenitis in one animal each (Table  
228 2)

229

**230 Discussion**

231 Through the analysis of histological sections, one may develop the perception that the  
232 distribution of these parasites is far from homogeneous in the organs of naturally  
233 infected individuals [21]. Nevertheless, no systematic study on the intra-organ  
234 distribution of the protozoan in various organs (spleen, bone marrow, liver and lymph  
235 nodes) in naturally infected human beings and dogs has so far been carried out.

236 In a similar way, the pathological examination of the spleen, including in individuals  
237 with VL, has been carried out by examining one or more tissue fragments collected in a  
238 way that does not necessarily represent the whole organ.

239 The spleen offers several advantages for assessment of the parasitism in the dog with  
240 VL, since it is one of the major parasitized organ in the infection and samples are

241 relatively easy to obtain for analysis [29]. Sampling can be carried out by fine needle  
242 aspiration of the spleen of dogs sedated only superficially, almost without undesirable  
243 incidents [29]. Bleeding into the abdominal cavity, that is one of the concerns of spleen  
244 puncture in humans [32, 33], tends not to occur in dogs, probably due to the fact that  
245 the canine splenic capsule is thicker and contain smooth muscle bundles [17] capable  
246 of contracting and sealing the hole produced by the needle insertion during the  
247 procedure.

248 Several methods have been used to detect the presence of the parasite or determining  
249 the parasite load in an individual with VL, including collection of aspirates from spleen,  
250 bone marrow, and lymph nodes, followed by examination of stained smears under the  
251 microscope and culture involving or not limiting dilution. However, recently, real-time  
252 PCR has been the most widely used method by researchers to achieve the above cited  
253 goals.

254 Aiming at contributing to increase the robustness of data obtained in studies of  
255 leishmaniasis caused by protozoa of the *L. donovani* complex, it is described herein the  
256 distribution of parasite burden and histological changes in the spleen of 6 dogs with  
257 visceral leishmaniasis (VL).

258 All 6 dogs evaluated in the current work lived in an endemic area and in the first  
259 clinical exam showed signs compatible with the symptomatic form of VL [34-37]. In  
260 addition, these animals also had positive results for anti-*Leishmania* antibodies (IFAT)  
261 and positive splenic aspirate culture for *Leishmania*. Four months later, when the  
262 animals were examined for a second time, the clinical signs had a tendency to increase  
263 in intensity and new clinical signs appeared, suggesting that the disease was

264 progressing. After euthanasia, *Leishmania* DNA was detected by real-time PCR in all 9  
265 samples in 5 animals and was not detected in any sample of 1 animal. In the dogs in  
266 which the *Leishmania* DNA was detected, there was considerable variation in parasite  
267 load, the median number (M=978,694) of parasites per gram of tissue in the most  
268 parasitized was 61.7 times greater than the least parasitized animal (M=15,863).  
269 Moreover, a relatively large variation was observed in parasite load values of different  
270 samples in each dog, the proportion between the largest and the smallest value  
271 ranged from 3.2 (dog # 325) to 34.7 fold (dog # 335).

272 The current study, which was conducted with a small number of animals, does not  
273 allow for the determination of probability of *Leishmania* DNA detection or the  
274 accuracy of the parasite load estimation in a single spleen sample of a naturally  
275 infected dog. For this, a far greater number of dogs, including animals with different  
276 clinical presentations (asymptomatic, oligosymptomatic and polysymptomatic forms of  
277 the disease), would have to be studied, and the necessary mathematical modelling  
278 would have to be applied. Information obtained from such an approach may have an  
279 impact on studies of diagnosis, pathogenesis, and development of prophylactic and  
280 curative therapies.

281 In the current study, in 5 dogs in which *Leishmania* DNA was detected by real-time  
282 PCR, 4 showed at least one histological change (white pulp disorganization,  
283 granulomas, or perisplenitis) frequently found in potentially susceptible animals and all  
284 of them displayed plasma cell infiltration in leastwise one section of the spleen [21].  
285 Curiously, every single of these 5 animals showed some degree of polymorphonuclear  
286 neutrophil infiltration for unknown reasons. One could speculate that this finding

287 could be related to secondary bacterial infections predisposed by VL [24, 34].  
288 Interestingly, some variation regarding histological changes was found in sections of  
289 spleen of a few animals, for example in the numbers of granulomas (in dog # 332) and  
290 intensity of perisplenitis (in dog # 353), that ranged from small to large numbers and  
291 from mild to intense, respectively. In order to better appreciate the contribution of  
292 variation of histological changes in the overall disease, it would be interestingly to  
293 evaluate a greater number of animals and carry out morphometric analysis of several  
294 components in different regions of spleen.

295 It is a curious situation the one posed by dog # 343. That animal had lymphadenopathy  
296 in the first clinical evaluation, positive IFAT and positive culture of splenic aspirate for  
297 *Leishmania*. In the second clinical evaluation it had also alopecia and onychogryphosis.  
298 However, DNA from *Leishmania* was not detected in any of the 9 spleen samples  
299 evaluated, even though the 18S rDNA was detected by real time PCR in the same  
300 samples, eliminating the possibility of DNA degradation and the presence of some  
301 factor inhibiting the PCR. Histologically, the dog # 343 showed only plasma cell and  
302 neutrophil infiltration in the spleen, without revealing granuloma. One possible  
303 explanation would be concurrent infections by hookworm and *Leishmania* [38] with  
304 subsequent control of the latter to the point of promoting failure of detection of  
305 parasite DNA. Another possibility would be that the infection in dog # 343 was caused  
306 by other species of *Leishmania*, such as *L. amazonensis*, which would be poorly  
307 detectable by the PCR in real time used in this study [28].

308

## 309 **Conclusions**

310



311 One can conclude from the present results that, distribution of parasite load and  
312 histological changes in spleen of dogs with visceral leishmaniasis shows a certain  
313 degree of heterogeneity.

314

#### 315 **Competing interests**

316 The authors declare that they have no competing interests.

317

#### 318 **Authors' contributions**

319 NCTB was involved in carrying out all of the experiments and manuscript writing,  
320 CGMP was involved in carrying out some of the experiments and manuscript writing,  
321 LAB was involved in carrying out some of the experiments, DBMF was involved with  
322 field experiments, PSTV contributed with reagents, materials and analysis tools, LCPC  
323 was involved in planning the study and manuscript writing, WLCS was involved with  
324 histological and data analysis and GGSO was involved in planning the study,  
325 histological analysis and manuscript writing.

326

#### 327 **Ackowlegments**

328 The authors would like to thank Isadora dos Santos Lima, Valter dos Anjos Almeida,  
329 Manuela da Silva Solcà, Marcelo Bordoni Gonçalves and Gilmar Pereira for technical  
330 assistance with the field experiments.

331

#### 332 **Funding**

333 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Grant CNPq  
334 573839/2008-5).

335

### 336 **References**

- 337 1. WHO: Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee  
338 on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 2010.
- 339 2. Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA: **Genomic diversity in the Leishmania**  
340 **donovani complex**. *Parasitology* 1999, **119 ( Pt 3)**:237-246.
- 341 3. Lukes J, Mauricio IL, Schonian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, Kuhls K, Tintaya  
342 KW, Jirku M, Chocholova E *et al*: **Evolutionary and geographical history of the**  
343 **Leishmania donovani complex with a revision of current taxonomy**. *Proc Natl Acad*  
344 *Sci U S A* 2007, **104(22)**:9375-9380.
- 345 4. Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, Dunan S: **Canine**  
346 **leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction**  
347 **and immunoblotting**. *Am J Trop Med Hyg* 1996, **55(3)**:273-277.
- 348 5. Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L: **Prevalence of Leishmania**  
349 **infantum infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using**  
350 **PCR on several tissues and serology**. *J Clin Microbiol* 2001, **39(2)**:560-563.
- 351 6. Leontides LS, Saridomichelakis MN, Billinis C, Kontos V, Koutinas AF, Galatos AD,  
352 Mylonakis ME: **A cross-sectional study of Leishmania spp. infection in clinically**  
353 **healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece**. *Vet Parasitol*  
354 2002, **109(1-2)**:19-27.
- 355 7. Oliva G, Scalone A, Foglia Manzillo V, Gramiccia M, Pagano A, Di Muccio T, Gradoni L:  
356 **Incidence and time course of Leishmania infantum infections examined by**  
357 **parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs**  
358 **exposed to three consecutive transmission seasons**. *J Clin Microbiol* 2006, **44(4)**:1318-  
359 1322.
- 360 8. Slappendel RJ, Teske E: **The effect of intravenous or subcutaneous administration of**  
361 **meglumine antimonate (Glucantime) in dogs with leishmaniasis. A randomized**  
362 **clinical trial**. *Vet Q* 1997, **19(1)**:10-13.
- 363 9. Baneth G, Shaw SE: **Chemotherapy of canine leishmaniasis**. *Vet Parasitol* 2002,  
364 **106(4)**:315-324.
- 365 10. Ready PD: **Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents**. *Annu Rev*  
366 *Entomol* 2013, **58**:227-250.
- 367 11. Thalhofer CJ, Chen Y, Sudan B, Love-Homan L, Wilson ME: **Leukocytes infiltrate the**  
368 **skin and draining lymph nodes in response to the protozoan Leishmania infantum**  
369 **chagasi**. *Infect Immun* 2011, **79(1)**:108-117.
- 370 12. Ibrahim MK, Barnes JL, Anstead GM, Jimenez F, Travi BL, Peniche AG, Osorio EY, Ahuja  
371 SS, Melby PC: **The malnutrition-related increase in early visceralization of Leishmania**  
372 **donovani is associated with a reduced number of lymph node phagocytes and**  
373 **altered conduit system flow**. *PLoS Negl Trop Dis* 2013, **7(8)**:e2329.
- 374 13. Stanley AC, Engwerda CR: **Balancing immunity and pathology in visceral**  
375 **leishmaniasis**. *Immunol Cell Biol* 2007, **85(2)**:138-147.
- 376 14. Mebius RE, Kraal G: **Structure and function of the spleen**. *Nat Rev Immunol* 2005,  
377 **5(8)**:606-616.

- 378 15. Suttie AW: **Histopathology of the spleen.** *Toxicol Pathol* 2006, **34**(5):466-503.
- 379 16. Bronte V, Pittet MJ: **The spleen in local and systemic regulation of immunity.**
- 380 *Immunity* 2013, **39**(5):806-818.
- 381 17. Onkar DaG, SA.: **Comparative histology of human and dog spleen.** *J Morphol Sci* 2013,
- 382 **30**(1):16-20.
- 383 18. Ahmed S, Colmenares M, Soong L, Goldsmith-Pestana K, Munstermann L, Molina R,
- 384 McMahon-Pratt D: **Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies**
- 385 **of murine visceral leishmaniasis.** *Infect Immun* 2003, **71**(1):401-410.
- 386 19. Paranhos-Silva M, Oliveira GG, Reis EA, de Menezes RM, Fernandes O, Sherlock I,
- 387 Gomes RB, Pontes-de-Carvalho LC, dos-Santos WL: **A follow-up of Beagle dogs**
- 388 **intradermally infected with Leishmania chagasi in the presence or absence of sand**
- 389 **fly saliva.** *Vet Parasitol* 2003, **114**(2):97-111.
- 390 20. Veress B, Omer A, Satir AA, El Hassan AM: **Morphology of the spleen and lymph nodes**
- 391 **in fatal visceral leishmaniasis.** *Immunology* 1977, **33**(5):605-610.
- 392 21. Santana CC, Vassallo J, de Freitas LA, Oliveira GG, Pontes-de-Carvalho LC, dos-Santos
- 393 WL: **Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral**
- 394 **leishmaniasis: a study on naturally infected dogs.** *Parasite Immunol* 2008, **30**(10):515-
- 395 524.
- 396 22. Silva JS, Andrade AC, Santana CC, Santos LQ, Oliveira CI, Veras PS, Vassallo J, dos-
- 397 Santos WL: **Low CXCL13 expression, splenic lymphoid tissue atrophy and germinal**
- 398 **center disruption in severe canine visceral leishmaniasis.** *PLoS One* 2012,
- 399 **7**(1):e29103.
- 400 23. Lima IS, Silva JS, Almeida VA, Junior FG, Souza PA, Lorangeira DF, Moura-Neto JP, Fraga
- 401 DB, de Freitas LA, dos-Santos WL: **Severe clinical presentation of visceral**
- 402 **leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp.**
- 403 *PLoS One* 2014, **9**(2):e87742.
- 404 24. Andrade TM, Carvalho EM, Rocha H: **Bacterial infections in patients with visceral**
- 405 **leishmaniasis.** *J Infect Dis* 1990, **162**(6):1354-1359.
- 406 25. Ato M, Maroof A, Zubairi S, Nakano H, Kakiuchi T, Kaye PM: **Loss of Dendritic Cell**
- 407 **Migration and Impaired Resistance to Leishmania donovani Infection in Mice**
- 408 **Deficient in CCL19 and CCL21.** *J Immunol* 2006, **176**(9):5486-5493.
- 409 26. Ato M, Stager S, Engwerda CR, Kaye PM: **Defective CCR7 expression on dendritic cells**
- 410 **contributes to the development of visceral leishmaniasis.** *Nat Immunol* 2002,
- 411 **3**(12):1185-1191.
- 412 27. Strauss-Ayali D, Baneth G, Jaffe CL: **Splenic immune responses during canine visceral**
- 413 **leishmaniasis.** *Vet Res* 2007, **38**(4):547-564.
- 414 28. Solca Mda S, Bastos LA, Guedes CE, Bordonni M, Borja LS, Lorangeira DF, da Silva Estrela
- 415 Tuy PG, Amorim LD, Nascimento EG, de Sa Oliveira GG *et al*: **Evaluating the accuracy**
- 416 **of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class**
- 417 **analysis.** *PLoS One* 2014, **9**(7):e103635.
- 418 29. Barrouin-Melo SM, Lorangeira DF, de Andrade Filho FA, Trigo J, Juliao FS, Franke CR,
- 419 Palis Aguiar PH, Conrado dos-Santos WL, Pontes-de-Carvalho L: **Can spleen aspirations**
- 420 **be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A**
- 421 **study on asymptomatic and polysymptomatic animals.** *Vet J* 2006, **171**(2):331-339.
- 422 30. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H: **Quantification of Leishmania infantum DNA**
- 423 **by a real-time PCR assay with high sensitivity.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**(11):5249-
- 424 5255.
- 425 31. Francino O, Altet L, Sanchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer
- 426 L, Sanchez A, Roura X: **Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and**
- 427 **monitoring of canine leishmaniosis.** *Vet Parasitol* 2006, **137**(3-4):214-221.

- 428 32. Chulay JD, Bryceson AD: **Quantitation of amastigotes of Leishmania donovani in**  
429 **smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis.** *Am J Trop Med*  
430 *Hyg* 1983, **32**(3):475-479.
- 431 33. Sundar S, Rai M: **Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis.** *Clin Diagn Lab*  
432 *Immunol* 2002, **9**(5):951-958.
- 433 34. Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A,  
434 Persechino A: **A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs**  
435 **naturally infected by Leishmania infantum.** *Vet Rec* 1997, **141**(21):539-543.
- 436 35. Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A, Plevraki  
437 KG: **Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective**  
438 **study of 158 cases (1989-1996).** *J Am Anim Hosp Assoc* 1999, **35**(5):376-383.
- 439 36. Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S: **Studies on canine leishmaniasis control.**  
440 **1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following**  
441 **antimonial treatment.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988, **82**(4):566-567.
- 442 37. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P,  
443 Oliva G, Baneth G: **Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and**  
444 **prevention of canine leishmaniosis.** *Vet Parasitol* 2009, **165**(1-2):1-18.
- 445 38. Muller and Kirk's. Small Animal Dermatology. In William H . Jr. M., Craig E. G., Karen L.  
446 C., Miller G. C., Elsierv. 2013. p. 733.

447

**Table 1. Clinical, immunological and parasitological characterization of dogs with visceral leishmaniasis**

Dog #	<sup>1</sup> Sex	<sup>2</sup> Age (years)	<sup>3</sup> Body weight (kg)	<sup>4</sup> IFAT (>1:50)	<sup>5</sup> Culture	<sup>6</sup> Clinical evaluation	
						First	Second
320	M	5-7	9.4	+	+	Hyperkeratosis on the nose and popliteal lymphadenopathy	Hyperkeratosis on the nose and submandibular lymphadenopathy
325	M	5-7	11	+	+	Hyperkeratosis on the nose and submandibular lymphadenopathy	Hyperkeratosis on the nose, popliteal and submandibular lymphadenopathy alopecia, periocular dermatitis, conjunctivitis and onychogryphosis
332	F	3-4	19	+	+	Hyperkeratosis on the nose, periocular dermatitis and onychogryphosis	Hyperkeratosis on the nose, periocular dermatitis, onychogryphosis, alopecia, popliteal and submandibular lymphadenopathy
335	F	3-4	11.2	+	+	Hyperkeratosis on the nose, popliteal and submandibular lymphadenopathy	Hyperkeratosis on the nose, popliteal and submandibular lymphadenopathy, alopecia and onychogryphosis
343	F	5-7	25	+	+	Popliteal lymphadenopathy	Alopecia and onychogryphosis
353	F	3-4	23	+	+	Hyperkeratosis on the nose, alopecia, and popliteal lymphadenopathy	Dermatitis, conjunctivitis and submandibular lymphadenopathy

<sup>1</sup>Sex: male (M), female (F). <sup>2</sup>Age estimated by physical examination. <sup>3</sup>Body weight measured on the day of euthanasia. <sup>4</sup>Indirect immunofluorescence assay test (IFAT) and <sup>5</sup>culture of splenic aspirate for parasitological diagnosis of leishmaniasis carried out at the time of the first clinical examination. <sup>6</sup>The two clinical evaluations were carried out 4 months apart.

**Table 2. Histological findings in the spleen of dogs with visceral leishmaniasis**

Dog #	Findings per <sup>1</sup> spleen sections																	
	<sup>2</sup> WP type			<sup>3</sup> LF size			<sup>4</sup> Granuloma			<sup>4</sup> Plasma cell infiltration			<sup>4</sup> Neutrophilic infiltration			<sup>5</sup> Perisplenitis		
	U	M	L	U	M	L	U	M	L	U	M	L	U	M	L	U	M	L
320	2	2	2	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0
325	1	1	1	2	2	2	0	0	0	1	1	1	2	3	2	0	0	0
332	1	2	1	3	3	3	3	1	1	0	1	1	1	2	1	1	1	1
335	3	3	2	3	3	2	1	1	1	1	2	2	1	1	1	3	3	2
343	1	1	1	2	2	2	0	0	0	2	2	2	2	2	1	0	0	0
353	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3

<sup>1</sup>Spleen sections: (U) upper third, (M) middle third, and (L) lower third. <sup>2</sup>White pulp (WP) type: (1): well organized; (2): slightly disorganized; (3): moderately to extensively disorganized. <sup>3</sup>The size of lymphoid follicles was graded as follows: 0 = absent; 1 = small; 2 = average; 3 = large. <sup>4</sup>Granuloma, plasma cell or neutrophilic infiltration: presence of a small (1), moderate (2) or large numbers (3) per tissue section. <sup>5</sup>Described as thickening and inflammatory infiltration of the capsule, which was graded as follows: 0 = absent; 1 = slight; 2 = moderate; 3 = intense.

## Figure Legends

### Figure 1. Schematic drawing of spleen showing sampling areas.

Schematic drawing of canine spleen indicating the spots (numbered 1 to 9) where separate aspirate punctures were carried out for determination of parasite burden and splenic fragments were taken out (labelled A to G) for histological analysis. The brackets show each third section of the organ.

### Figure 2. Parasite load in spleens of dogs with visceral leishmaniasis

Parasite burden measured in tissue from 9 different spots of the spleen (3 from each third section) in 6 dogs with clinical manifestations compatible with visceral leishmaniasis, positive indirect immunofluorescence assay test and positive culture for *Leishmania*. The parasite burden was determined by real time PCR using 150 ng of DNA samples and the TaqMan system as described in the Material and Methods section. PCR efficiency and coefficient of determination ( $R^2$ ) were 91 % and 0.998, respectively. The difference between the highest and the lowest value of CT ( $\Delta$ CT) obtained for each animal (which correlates with the higher and lower parasite load in the spleen, respectively) and the highest amplitude value of CT of the 9 triplicates (RA) of each animal, given in number of cycles of PCR, were the following ( $\Delta$ CT and RA): dog # 320 (4.001 and 0.182), dog # 325 (1.975 and 0.309), dog # 332 (2.943 and 0.173), dog # 335 (3.811 and 0.513), dog # 343 (not applicable), and dog # 353 (2.179 and 0.350).

### Figure 3. Histological findings in spleens of dogs with visceral leishmaniasis

Major histological findings: A) Organized lymphoid follicle (type 1 follicle, x40), B) Highly disorganized lymphoid follicle (type 3 follicle, x40), C) Well organized granuloma, x200, D) Plasma cell infiltration (arrows indicate plasma cell characteristic Golgi apparatus) x200, E) Polymorphnuclear neutrophil infiltration, x400, F) Chronic perisplenitis, x200.