



**FIOCRUZ**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ENSAIO QUANTIFERON MODIFICADO NA LEISHMANIOSE  
VISCERAL CANINA**

**PAULA ROCHA DANTAS SILVA**

**Salvador – Bahia**

**2018**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

**ENSAIO QUANTIFERON MODIFICADO NA LEISHMANIOSE  
VISCERAL CANINA**

**PAULA ROCHA DANTAS SILVA**

Orientador: Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Mestre.

**Salvador - Bahia**

**2018**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S586e Silva, Paula Rocha Dantas.  
Ensaio quantiFERON modificado na leishmaniose visceral canina. / Paula  
Rocha Dantas Silva. - 2018.  
105 f. : il. ; 30 cm.

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

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa)  
Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2018.

1. Leishmaniose Visceral Canina. 2. Citocinas. 3. *Leishmania Infantum*.  
I. Título.

CDU 616.993.161

" ENSAIO QUANTIFERON MODIFICADO NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA."

PAULA ROCHA DANTAS SILVA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 19 de dezembro de 2018.

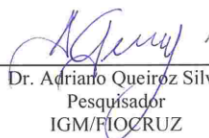
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Theolis Costa Barbosa Bessa  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ



Dra. Maria Fernanda Rios Grassi  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ



Dr. Adriano Queiroz Silva  
Pesquisador  
IGM/FIOCRUZ

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

*Á Deus,*

Que me guiou me dando força, sabedoria e paciência.

*Aos meus pais e irmãos,*

Que me deram tanto carinho e apoio durante esse caminho.

*Ao meu eterno amor, Thiago Silva,*

Que sempre acreditou em meu potencial, sempre me incentivou e me apoiou.

## AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho:

Aos meus pais, meu esposo, meus irmãos, e filho canino Hércules, meus alicerces principalmente nos momentos mais difíceis, sempre estiveram ao meu lado;

Ao IGM pela estrutura oferecida para a execução deste trabalho;

Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, pela oportunidade de ampliar os conhecimentos teóricos e práticos;

Ao orientador Dr. Geraldo Gileno, pela oportunidade, confiança e por todo conhecimento transmitido;

A Dr. Washington dos Santos pelas orientações e a todos do grupo WLCS;

Aos queridos Maria Carolina Souza, Matheus Moreno, Marcus David, Raphaela Lisbôa, um presente para mim ter convivido com eles, além disso, tanto me ajudaram;

As minhas queridas amigas Maria Carolina Gonçalves e Msc. Fernanda Gomes pela paciência e por me apoiarem principalmente nos momentos mais difíceis;

A Dr. Carlos Gustavo, pelos valiosos conselhos e orientações;

Aos queridos Fernanda Lessa, Aisla Mércia, Jéssica Souza, Rodrigo Moura, Fabiana Souza, Marcos Amorim e em especial Gisele Brito, meu anjinho, pela convivência com todos, apoio e tantas risadas;

A minha querida Elivani Sacramento, pelo presente de ter convivido, pelos conselhos, orientações e por todo carinho;

A Sérgio, Marineide e Patrícia Luz, tão solícitos sempre que precisei e pelas boas conversas e risadas;

A Dra. Naiara Bagues e Msc. Jéssica Mendes pelas orientações e pelo carinho;

A Dra. Ana Vitória Meneses, que tive a oportunidade de conviver e aprender, e principalmente pelo presente de ter desfrutado de sua amizade;

As Dra. Deborah Fraga, Msc. Bruna Leite e Dra. Manuela Solcà, sem as quais não seria possível a realização das campanhas de coleta em campo, por todo apoio, convivência e aprendizado e a todos do Grupo Cão pelo apoio e convivência no campo e no IGM;

A Dra. Isadora Lima e Yuri Silva pela convivência, conselhos e pela amizade;

A Dra. Micely Hermida, pelas orientações;

Aos funcionários do IGM por serem tão solícitos, em especial aos funcionários da Biblioteca e as funcionárias da coordenação de ensino, por todo apoio e ajuda nas correções;

Aos amigos do LAIPHE, por todo apoio, pela convivência e aprendizado no decorrer destes anos;

A Dr. Matheus Côrrea do grupo Merck, pelos conhecimentos adquiridos durante o treinamento Luminex e pelo esclarecimento de dúvidas sempre que solicitado.

Às Msc. Emília Belitardo e Msc. Flávia Sena do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) UFBA pelo auxílio na realização do ensaio milliplex, pela convivência durante o período do ensaio e por todo aprendizado;

Aos animais do estudo, os cães do município de Camaçari e do canil experimental do IGM.



*Ninguém ignora tudo, ninguém sabe tudo,  
Por isso aprendemos sempre.*

*Paulo Freire*

SILVA, Paula Rocha Dantas. Ensaio quantiFERON modificado na leishmaniose visceral canina. 2018. 105 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) –Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2018.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A leishmaniose visceral (LV) é uma doença grave que acomete principalmente o homem e o cão, sendo o último o principal reservatório do agente causal, *Leishmanias* do complexo *Leishmania donovani*. No Brasil, o programa de controle de leishmaniose visceral tem como principais diretrizes o tratamento de casos humanos, combate ao inseto vetor, identificação e eliminação de cães infectados e medidas de educação em saúde e estabelece como método de detecção da LV canina (LVC) a triagem com um teste rápido (DPP, plataforma de duplo percurso) e a confirmação por um ensaio imunoenzimático. Contudo, somente uma parte dos cães infectados é capaz de transmitir o parasito para insetos vetores. Provavelmente, para o controle da LV, é contraproducente remover das áreas endêmicas cães infectados que exibem a capacidade de controlar a infecção e não infectivos para o inseto vetor. Um ensaio denominado QuantiFERON, utilizado para o diagnóstico da tuberculose, tem despertado interesse em pesquisas sobre leishmaniose. **OBJETIVO:** No presente trabalho, foi avaliada a eficácia de um ensaio QuantiFERON modificado para a discriminação de cães susceptíveis e resistentes a LV. **MATERIAL E MÉTODOS:** Para isso, foi realizada uma avaliação de corte transversal em uma área endêmica de LV, na qual cães foram classificados em grupos: a) sem marcador de infecção ou b) infectados com baixo escore clínico ou c) infectados com alto escore clínico para LV. Além disso, um segundo grupo de cães de área endêmica foi selecionado e classificados como: a) infectados com baixo escore clínico, b) infectados com escore clínico intermediário e c) infectados com alto escore clínico para LV. Um grupo de cães sem infecção, controle negativo de área não endêmica foi utilizado em ambos estudos. No ensaio, amostras de sangue periférico anticoagulado foram incubadas na ausência de antígenos ou na presença de antígenos solúveis *Leishmania* ou de antígenos recombinantes de *Leishmania* (rLc2-NT-CT, rLc2-NT-5R-CT ou KMP-11) e a concentração de interferon gama (IFN- $\gamma$ ), interleucina-2 (IL-2), IL-6, IL-10 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). **RESULTADOS:** Infelizmente devido a problemas técnicos, a mensuração de IFN- $\gamma$  não pode ser realizada. O ensaio QuantiFERON modificado apresentou utilidade na identificação de cães infectados por *Leishmania* com as citocinas IL-6, e principalmente TNF- $\alpha$  e IL-10 nos cães com baixo e escore clínico, os antígenos SLA, rLc2-NT-CT e rLc2-NT-5R-CT apresentaram maior potencial, o antígeno KMP-11 não foi útil na maior parte das análises. Nenhum dos antígenos induziram a produção de IL-2 em nenhum dos grupos. **CONCLUSÃO:** O ensaio QuantiFERON modificado apresentou utilidade na identificação de cães infectados por *Leishmania* mas não diferenciou cães resistentes de cães susceptíveis a leishmaniose visceral com as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-6.

**Palavras-chaves:** Leishmaniose Visceral Canina; Citocinas; Quantiferon modificado; *Leishmania Infantum*; Resposta imune.

SILVA, Paula Rocha Dantas. QuantiFERON assay modified in canine visceral leishmaniasis. 2018. 105 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2018.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Visceral leishmaniasis (VL) is a serious disease affecting mainly man and dog, the latter being the main reservoir and the main reservoir of the causative agent, *Leishmania* of the *Leishmania donovani* complex. In Brazil, the visceral leishmaniasis control program has as main guidelines the treatment of human cases, combating the insect vector, identification and elimination of infected dogs and health education measures and establishes as a method of detecting canine LV screening with a rapid test (DPP, double-path platform) and confirmation by an enzyme-linked immunosorbent assay. However, only a few infected dogs are able to transmit the parasite to vector insects. Probably, for the control of LV, it is counterproductive to remove from the endemic areas infected dogs that exhibit the ability to control the infection and not infective to the insect vector. A trial called QuantiFERON, used for the diagnosis of tuberculosis, has aroused interest in research on leishmaniasis. **OBJECTIVE:** In the present study, the usefulness of a modified QuantiFERON assay for the discrimination of susceptible and resistant LV dogs was evaluated. **MATERIAL AND METHODS:** For this, a cross-sectional evaluation was performed in an endemic LV area, in which dogs were classified into groups: a) without infection detected or b) infected with low clinical score or c) infected with high LV clinical score. In addition, in a longitudinal evaluation, in which dogs infected with endemic area were followed for two years, these were classified as clinical manifestations in groups: a) infected with low clinical score, b) infected with intermediate clinical score and c) infected with high clinical score for LV. A group of dogs without infection, negative control of non-endemic area was used in both studies. In the assay, anticoagulated peripheral blood samples were incubated in the absence of antigens or in the presence of soluble *Leishmania* antigens or recombinant *Leishmania* antigens (rLc2-NT-CT, rLc2-NT-5R-CT or KMP-11) and the concentration of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), interleukin-2 (IL-2), IL-6, IL-10 and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ). **RESULTS:** Unfortunately due to technical problems, the measurement of IFN- $\gamma$  can not be performed. The modified QuantiFERON assay proved to be useful in the identification of *Leishmania*-infected dogs with IL-6 cytokines, especially TNF- $\alpha$  and IL-10 in resistant and low-grade dogs, and the SLA antigens, rLc2-NT-CT and rLc2-NT-5R-CT showed higher potential, the KMP-11 antigen was not useful in most analyzes. None of the antigens induced IL-2 production in either group. **CONCLUSION:** The modified QuantiFERON assay had a high potential in the identification of the infection even in the group of dogs without infection detected by the other tests applied, the rLc2-NT-CT recombinant antigen inducing IL-10 production had the highest potential in the QuantiFERON assay modified.

**Keywords:** Canine Visceral Leishmaniasis; Cytokines; Modified quantiferon; *Leishmania infantum*; Immune response.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Caracterização de cães de estudo de corte transversal de área endêmica para leishmaniose visceral Camaçari, Bahia.....	47
Tabela 2 Caracterização de cães de estudo prospectivo de área endêmica para leishmaniose visceral Camaçari, Bahia.....	58

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Evolução clínica de cães infectados por *Leishmania* em estudo prospectivo longitudinal de área endêmica para leishmaniose visceral Camaçari, Bahia.....48
- Figura 2. Avaliação da produção de TNF- $\alpha$  por células de sangue de estudo de corte transversal de área endêmica para leishmaniose visceral.....49
- Figura 3. Avaliação da produção de IL-10 por células de sangue de estudo de corte transversal de área endêmica para leishmaniose visceral.....50
- Figura 4. Avaliação da produção de IL-6 por células de sangue de cães de estudo cortetransversal de área endêmica para leishmaniose visceral.....52
- Figura 5. Avaliação da produção de TNF- $\alpha$  por células de sangue de cães estudo de corte transversal de área endêmica para leishmaniose visceral com teste de reação de hipersensibilidade tardia positivo ou negativo.....53
- Figura 6. Avaliação da produção de IL-10 por células de sangue de cães estudo de corte transversal de área endêmica para leishmaniose visceral com teste de reação de hipersensibilidade tardia positivo ou negativo.....54
- Figura 7. Avaliação da produção de IL-6 por células de sangue de cães estudo de corte transversal de área endêmica para leishmaniose visceral com teste de reação de hipersensibilidade tardia positivo ou negativo.....55
- Figura 8. Avaliação da produção de TNF- $\alpha$  por células de sangue de cães de estudo prospectivo longitudinal de área endêmica para leishmaniose visceral.....56
- Figura 9. Avaliação da produção de IL-10 por células de sangue de cães de estudo prospectivo longitudinal de área endêmica para leishmaniose visceral.....59
- Figura 10. Avaliação da produção de IL-6 por células de sangue de cães de estudo prospectivo longitudinal de área endêmica para leishmaniose visceral.....60
- Figura 11. Avaliação da produção de TNF- $\alpha$  por células de sangue de cães estudo de corte transversal de área endêmica para leishmaniose visceral com teste de reação de hipersensibilidade tardia positivo ou negativo.....62
- Figura 12. Avaliação da produção de IL-10 por células de sangue de cães estudo de corte transversal de área endêmica para leishmaniose visceral com teste de reação de hipersensibilidade tardia positivo ou negativo.....63

- Figura 13. Avaliação da produção de IL-6 por células de sangue de cães estudo de corte transversal de área endêmica para leishmaniose visceral com teste de reação de hipersensibilidade tardia positivo ou negativo.....64
- Figura 14. Avaliação por mapa de calor da produção de TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-6 por células de sangue estimulado pelo mitógeno concanavalina A, e pelos antígenos de cães de estudo de corte transversal de área endêmica para leishmaniose visceral.....65
- Figura 15. Avaliação por mapa de calor da produção de TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-6 por células de sangue estimulado pelo mitógeno concanavalina A, e pelos antígenos de cães de estudo prospectivo longitudinal de área endêmica para leishmaniose visceral.....66

## LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1	Avaliação da proteína rLci2-NT-CT rLci2-NT-5R-CT por SDS-PAGE 10%.....	85
Apêndice 2	Mensuração de endotoxinas nos antígenos de <i>L. infantum</i> .....	86
Apêndice 3	Avaliação de dose-resposta ao mitógeno concanavalina A e ao antígeno solúvel de <i>Leishmania infantum</i> para utilizar no ensaio QuantiFERON modificado....	87
Apêndice 4	Caracterização individual do primeiro grupo de cães de área endêmica para leishmaniose visceral Camaçari, Bahia.....	88
Apêndice 5	Caracterização individual do segundo grupo de cães de área endêmica para leishmaniose visceral Camaçari, Bahia.....	90
Apêndice 6	Avaliação da produção de TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-6 por células de sangue estimulado pelo mitógeno concanavalina A de cães do primeiro grupo de área endêmica para leishmaniose visceral.....	91
Apêndice 7	Avaliação da produção de TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-6 por células de sangue estimulado pelo mitógeno concanavalina A de cães do segundo grupo de área endêmica para leishmaniose visceral.....	93
Apêndice 8	Valores de mediana e percentil da produção de TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-6 do primeiro grupo de cães de área endêmica para LV.....	94
Apêndice 9	Valores de mediana e percentil da produção de TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-6 do primeiro grupo de cães em cães positivos e negativos para o teste de hipersensibilidade tardia.....	96
Apêndice 10	Valores de mediana e percentil da produção de TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-6 do segundo grupo de cães de área endêmica para leishmaniose visceral.....	97
Apêndice 11	Valores de mediana e percentil da produção de TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-6 de cães em estudo prospectivo longitudinal em cães positivos e negativos para o teste de hipersensibilidade tardia.....	98
Apêndice 12	Ficha clínica de avaliação dos cães de área endêmica para leishmaniose visceral.....	99

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>‘O</b>	Oeste
<b>‘Se</b>	Sudeste
<b>µg</b>	Microgramas
<b>µL</b>	Microlitros
<b>10X</b>	Dez vezes
<b>AEC</b>	Subgrupo de cães com alto escore clínico para LV
<b>BrU</b>	Brometo de uridina
<b>BEC</b>	Subgrupo de cães com baixo escore clínico para LV
<b>CD4</b>	Célula T auxiliadora
<b>Células B</b>	Linfócito B
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética para o Uso de Animais
<b>ConA</b>	Concanavalina A
<b>CN</b>	Subgrupo de cães controle negativo de área não endêmica
<b>CT</b>	Extremidade carboxila terminal
<b>Cut-off</b>	Ponto de corte
<b>DNA</b>	Ácidos desoxirribonucleico
<b>DTH</b>	Reação de Hipersensibilidade tardia (Reação de Montenegro)
<b>EIE® LVC</b>	Ensaio imunoenzimático para diagnóstico da LVC
<b>ELISA</b>	Ensaio imunoenzimático
<b>EU</b>	Unidade de endotoxinas
<b>g</b>	Força Gravitacional
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>IFI® LVC</b>	Imunofluorescência indireta para diagnóstico da LVC
<b>IFN-γ</b>	Interferon gamma
<b>Ig</b>	Imunoconjugado
<b>IL-10</b>	Interleucina dez
<b>IL-2</b>	Interleucina dois
<b>IL-4</b>	Interleucina quatro
<b>IL-5</b>	Interleucina cinco



<b>IL-6</b>	Interleucina seis
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-thiogalactosídeo
<b>kDa</b>	Kilo Daltons
<b>Km</b>	Quilômetros
<b>km<sup>2</sup></b>	Quilômetros quadrados
<b>KMP-11</b>	Proteína de membrana cinetoplastido-11
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LPG</b>	Lipophosfoglicano
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>LV</b>	Leishmaniose visceral
<b>LVC</b>	Leishmaniose visceral canina
<b>mg</b>	Miligramas
<b>mL</b>	Militros
<b>mm</b>	Milímetros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>MS</b>	Ministério da saúde
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Fosfato de sódio dibásico
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>nm</b>	Nanometros
<b>NNN</b>	Neal, Novy, Nicolle
<b>NT</b>	Extremidade amino terminal
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>PBMC</b>	Células mononucleares de sangue periférico
<b>PBS</b>	Tampão fosfato tamponado com salina
<b>PCR</b>	Reação em cadeia de polimerase
<b>qPCR</b>	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
<b>R</b>	Domínio com motivo repetitivo
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>RPMI 1640</b>	Meio 1640 do Instituto Roswell Park Memorial
<b>SLA</b>	Antígeno solúvel de <i>Leishmania</i>

<b>SINAN</b>	Sistema de informação de agravos de notificação
<b>SMI</b>	Subgrupo de cães sem marcador de infecção por <i>Leishmania</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de transformação do crescimento beta
<b>Th</b>	Linfócitos T auxiliares
<b>Th1</b>	Resposta por linfócitos T auxiliares via celular
<b>Th2</b>	Resposta por linfócitos T auxiliares via humoral
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>TR-DPP</b>	Teste imunocromatográfico com plataforma de dupla migração

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	21
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	24
2.1	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL .....	24
2.2	LEISHMANIOSE VISCERAL .....	25
2.3	LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA .....	26
2.4	ASPECTOS GERAIS DA IMUNIDADE CONTRA <i>L. INFANTUM</i> .....	27
2.4.1	<i>Em seres humanos</i> .....	27
2.4.2	<i>Em cães</i> .....	28
2.5	DETECÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA .....	30
2.6	ENSAIO QUANTIFERON MODIFICADO .....	31
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
3.1	GERAL .....	34
3.2	<b>ESPECÍFICOS</b> .....	34
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
4.1	ANIMAIS E DESENHO DO ESTUDO.....	35
4.2	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	36
4.3	AValiação CLÍNICA .....	37
4.4	DETECÇÃO DO PARASITISMO POR <i>LEISHMANIA</i> .....	38
4.5	ANTÍGENOS DE <i>LEISHMANIA</i> .....	39
4.6	ELISA PARA AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- <i>LEISHMANIA</i> .....	41
4.7	ENSAIO QUANTIFERON MODIFICADO .....	41
4.8	MENSURAÇÃO DE CITOCINAS IFN- $\gamma$ , TNF-A, IL-2, E IL-10 E IL-6.....	42
4.9	ANÁLISE POR MAPA DE CALOR ( <i>HEAT MAP</i> ).....	43
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	45
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS CÃES DO PRIMEIRO GRUPO DO ESTUDO.....	45
5.1.1	<i>Controle negativo</i> .....	45
5.1.2	<i>Sem marcador de infecção</i> .....	45
5.1.3	<i>Com baixo escore clínico</i> .....	46
5.1.4	<i>Com alto escore clínico</i> .....	46
5.2	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IFN- $\gamma$ , TNF-A, IL-2, IL-10 E IL-6 PELO ENSAIO QUANTIFERON MODIFICADO .....	48
5.2.1	<i>Por subgrupo</i> .....	48

5.2.2	<i>Em cães com DTH negativo ou DTH positivo</i> .....	52
5.2.3	<i>Análise por mapa de calor (heat map)</i> .....	55
5.3	<b>CARACTERIZAÇÃO DOS CÃES DO SEGUNDO GRUPO DO ESTUDO</b> .....	57
5.3.1	<i>Controle negativo</i> .....	57
5.3.2	<i>Com baixo escore clínico</i> .....	57
5.3.4	<i>Com alto escore clínico</i> .....	58
5.4	<b>AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IFN-<math>\gamma</math>, TNF-A, IL-2, IL-10 E IL-6 PELO ENSAIO QUANTIFERON MODIFICADO</b> .....	59
5.4.1	<i>Por subgrupo</i> .....	59
5.4.2	<i>Em cães com DTH negativo ou DTH positivo</i> .....	64
5.5	<b>AVALIAÇÃO POR MAPA DE CALOR (HEAT MAP)</b> .....	66
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	68
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	73
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	74
	<b>APÊNDICES</b> .....	86

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Leishmanioses constituem um grupo de doenças causadas por diferentes espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania* (FERNANDEZ-BELLON *et al.*, 2005), sendo a leishmaniose visceral (LV) considerada a forma mais grave dessas enfermidades.

A LV é causada por protozoários do complexo *Leishmania donovani*, que compreende *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (Nicolle 1908) [syn.*L. chagasi* (CUNHA e CHAGAS 1937)]. A LV é amplamente distribuída em países das regiões subtropicais e temperadas na Europa, Ásia, norte da África e América do Sul (ROSYPAL *et al.*, 2003; DUPREY *et al.*, 2006, MAIA, 2008), Índia, Bangladesh, Brasil e Sudão (DESJEUX, 1996, GOMES *et al.*, 2008).

No Brasil, duas espécies são responsáveis pela transmissão da doença: *Lutzomyia longipalpis*, a principal; e *Lutzomyia cruzi*, também atribuído como vetor em regiões específicas dos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (BRASIL 2014). E tem como reservatório principal o cão doméstico (GRADONI *et al.*, 2005; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009). A doença inicialmente exibia uma distribuição rural, porém com o passar do tempo, passou a ser encontrada em muitas cidades, principalmente na periferia dessas cidades (DEANE, 1956; MAIA-ELKHOURY, *et al.*, 2008).

Após a inoculação do *L. infantum* pelo inseto vetor, o indivíduo, homem ou cão, pode apresentar desde uma forma assintomática até uma forma grave da infecção com várias manifestações clínicas, incluindo hepatoesplenomegalia, anemia, hipergamaglobulinemia e imunossupressão crônica (MUZAMIL *et al.*, 2015). Em cães, adicionalmente, podem ocorrer, ceratite, uveíte, onicogribose e perda de pelos e o desfecho da infecção, provavelmente, depende de vários fatores, como o tipo de resposta imune adaptativa desenvolvida contra o parasito. (BETTINI e GRADONI, 1986; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009).

Cães que desenvolvem resposta imune celular (resposta denominada Th1), detectada por proliferação de células mononucleares de sangue periférico, teste de hipersensibilidade tardia (DTH), e produção das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  por células mononucleares de sangue periférico estimuladas com antígenos do parasito, as quais podem ativar macrófagos e promover atividade microbicida (BARBIÉRI, 2006), tendem a controlar a infecção e apresentar resistência ao desenvolvimento da doença. No entanto, cães que não apresentam predominância de resposta imune Th1 e presença de resposta imune humoral específica com altos títulos de anticorpos tendem a não controlar a infecção e apresentar manifestações

clínicas e cargas parasitárias elevadas (MARTÍNEZ-MORENO *et al.*, 1995; DOS-SANTOS *et al.*, 2008; HOSEIN *et al.*, 2017).

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). Os métodos usados para a detecção de cães infectados, um ensaio rápido em plataforma de duplo percurso (DPP) e um ensaio imunoenzimático (ELISA), são baseados na descoberta de anticorpos específicos reativos a antígenos de *Leishmania* (BRASIL, 2011). No entanto, esses ensaios apenas detectam a infecção, mas não são capazes de distinguir cães resistentes de cães susceptíveis a infecção. Provavelmente, para o programa de controle da LV, seria vantajosa a identificação de cães resistentes a infecção e/ou doença, os quais podem não apresentar infectividade para os insetos vetores e não deveriam ser removidos da área endêmica.

Há um ensaio que avalia a produção de interferon gama por células mononucleares de sangue total que vem sendo amplamente utilizado para o diagnóstico de infecção latente por *Mycobacterium tuberculosis*, denominado ensaio QuantiFERON (MAZUREK e VILARINO 2003; CONNELL *et al.*, 2006; LIGHTER *et al.*, 2009). Esse ensaio foi inicialmente desenvolvido para o diagnóstico de tuberculose bovina por KIRCHNER (1982), WOOD *et al.* (1990, 1991, 1992).

Um ensaio parecido com o QuantiFERON (QuantiFERON modificado) tem despertado o interesse de pesquisadores em estudos sobre leishmaniose visceral. Alguns autores cultivaram amostras de sangue periférico humano anticoagulado na ausência ou na presença de antígenos de *Leishmania* e avaliaram se existe uma relação entre a produção de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10, IL-2, e o potencial do ensaio como marcador de infecção por *Leishmania* (TURGAY, 2010; GIDWANI *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2012; ALIMOHAMMADIAN *et al.*, 2012; CARRILLO *et al.*, 2015). Esses autores encontraram que esse ensaio tem potencial na detecção de infecção em pacientes curados e com infecção ativa, além disso, pacientes curados e assintomáticos tiveram uma alta produção de IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , e pacientes com a infecção ativa produziram IL-10 em níveis altos. Esses dados sugerem que o ensaio QuantiFERON modificado pode contribuir para a avaliação da resposta imune celular.

É possível que antígenos recombinantes tenham utilidade no ensaio QuantiFERON modificado na definição de resistência ou susceptibilidade a LVC. Os antígenos rLci2-NT-5R-CT (com 5 domínios repetitivos) e rLci2-NT-CT (sem domínios repetitivos), podem ser candidatos a serem usados nessa avaliação. Esses antígenos foram selecionados a partir de

uma biblioteca de cDNA da forma amastigota de *L. infantum*, cepa MHOM/BR2000 (BALEEIRO *et al.*, 2006). A inserção de Lci2, codifica segmentos de uma cinesina de *L. infantum* que é homóloga a região C terminal do produto do gene *LinJ14\_V3.1180*, esses antígenos rLci2-NT-5R-CT e rLci2-NT-CT possuem 293 aminoácidos, e o rLci2-NT-5R-CT cinco repetições completas de 39 aminoácidos e a proteína C-terminal (OLIVEIRA *et al.*, 2011). KMP-11 (proteína de membrana do kinetoplasto de 11 KDa, *kinetoplastic membrane protein 11*), outro antígeno candidato, é uma proteína de membrana de superfície associada ao lipofosfoglicano, que se expressa de forma diferente nos estágios amastigota e promastigota de *Leishmania* (CARRILLO *et al.*, 2008). O potencial imunoprotetor da molécula LPG foi testado em modelos murinos nos quais o componente LPG provocou imunidade protetora (CONVILLE *et al.*, 1987; BERBERICH *et al.*, 1997). Foi mostrado, no entanto, que a estimulação de células T, associada à imunidade protetora do componente LPG, ocorreu devido a uma proteína ligada ao LPG que foi renomeada como proteína de membrana quinoplastóide 11 (KMP-11) (TOLSON *et al.*, 1994; BERBERICH *et al.* 1997).

Há poucos trabalhos utilizando ensaios de produção de citocinas em sangue periférico de cães. SOLANO-GALLEGO *et al.* (2016) e ZIBRI *et al.* (2017), encontraram que cães com estágio clínico discreto de LV tiveram maior produção de IFN- $\gamma$  do que cães com doença clínica.

Como até o momento, poucos ensaios semelhantes foram realizados em cães, no presente trabalho, propõe-se realizar o ensaio QuantiFERON modificado em cães de uma área endêmica para LV classificados quanto as manifestações clínicas, resposta imune humoral e celular específicas e detecção do parasito, para determinar a utilidade do ensaio na discriminação entre a resistência e susceptibilidade dos animais à infecção, para contribuir no controle da LV e em evitar eutanásias de cães resistentes a infecção. O QuantiFERON modificado proposto envolve a incubação de sangue periférico anticoagulado na ausência de antígenos ou na presença de antígenos solúveis ou recombinantes de *Leishmania* e mensuração das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-6.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por parasitos protozoários de espécies do gênero *Leishmania* e transmitida pela fêmea infectada do inseto flebotomíneo.

Endêmica em mais de 90 países, sendo a forma visceral, a doença mais grave. Em 2015 houve cerca de 22 mil casos de LV relatados no mundo, afetando principalmente crianças (WHO, 2017). No Brasil, de 2001 a 2014, 47.859 novos casos de LV foram relatados ao SINAN, tendo uma média anual de 3418,6 casos e uma taxa de incidência média de 1,8 a cada 100.000 habitantes. (DOS REIS *et al.*, 2017). Essa zoonose é caracterizada por evolução crônica e envolvimento sistêmico, se não tratada, resulta na morte em 90% dos casos. (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008), apresentando então, um amplo espectro epidemiológico no mundo, ocorrendo em áreas tropicais e subtropicais (MELO, 2004).

A LV é causada pelo parasito de espécie *Leishmania infantum*, é uma doença grave, endêmica em países do Mediterrâneo, leste da Ásia, e sul da América (REIS *et al.*, 2010; DOS REIS *et al.*, 2017). Nas Américas, permanece como um problema de saúde pública devido a sua magnitude clínica, biológica e complexidade imunológica, afetando principalmente países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, necessitando assim, de esforço coletivo entre governos, organizações, instituições e sociedades para seu controle (WHO, 2017). No Brasil, é considerada endêmica em boa parte dos estados, principalmente na região Nordeste, cujo o maior número de casos foi relatado, em 2012, representando 43,1 % dos casos do país (DE OLIVEIRA, *et al.*, 2010; BRASIL 2014). O Estado da Bahia, região nordeste do Brasil, registrou, entre 1984 a 2002, uma incidência média de 790 casos, sendo um dos estados mais atingidos pela doença (BRASIL, 2003). E entre 2001 a 2014, uma incidência de 2683 casos para cada 100 000 habitantes (DOS REIS *et al.*, 2017).

Geralmente a LV estava associada às áreas xéricas, semiáridas, típica de áreas rurais e periurbanas (GONTIJO e MELO, 2004; SILVA, 2007), todavia, dados revelam a periurbanização e a urbanização da LV, destacando os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (BRASIL, 2014).

A área de ocorrência da LV tem aumentado no Estado da Bahia, especialmente na região semiárida onde a doença já era conhecida. A partir do final da década de oitenta,



municípios das regiões norte e oeste da Bahia tornaram-se endêmicos, provavelmente em decorrência da implantação de grandes projetos agrícolas, bem como, municípios ao leste, próximos a Salvador, capital do Estado, onde o progressivo adensamento populacional, decorrente da instalação de pólos industriais, foi seguido por registros frequentes de casos autóctones de LV (FRANKE *et al.*, 1999; JULIÃO *et al.*, 2007). Dentre os municípios pertencentes à Região Metropolitana de Salvador (RMS), Camaçari registrou o maior número de casos humanos e caninos de LV, além do registro de um surto epidêmico da doença em 1991, quando 243 pessoas foram examinadas, resultando em 30% de intradermoreação positiva para *Leishmania* e uma sorologia positiva em 14% dos indivíduos; 460 cães foram incluídos na pesquisa sorológica apresentando reação positiva em 6,3% (CUNHA *et al.*, 1995; JULIÃO *et al.*, 2007).

## 2.2 LEISHMANIOSE VISCERAL

A leishmaniose visceral atinge as células do sistema monocular fagocitário do ser humano sendo os órgãos mais afetados o baço, fígado, linfonodos, medula óssea e pele. Outros órgãos e tecidos podem também ser afetados, por exemplo o intestino e os pulmões. Em casos avançados da doença, quase todos os órgãos são envolvidos (MELO, 2004).

Os protozoários do gênero *Leishmania* pertencem a ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, com ciclo biológico heteroxênico, necessitando assim de dois hospedeiros, um vertebrado, representado por canídeos silvestres e domésticos, além de roedores e humanos, e de um invertebrado, representado pelo inseto vetor (SCHLEIN, 1993; SILVA, 2007). *Lutzomyia longipalpis* pertence à família dos flebotomíneos e é o principal vetor da *Leishmania infantum* (Nicolle 1908) [sin. *L. chagasi* (CUNHA e CHAGAS 1937)] (SANTOS *et al.*, 2008). A transmissão ocorre em habitats que variam de regiões florestais, onde vivem os reservatórios silvestres, até o peridomicílio de ambas, região rural e áreas urbanas, cujo o cão é o principal reservatório (MELO 2004).

Segundo MELO (2004), quando a fêmea de flebotomíneo pica o hospedeiro mamífero com leishmaniose, ingere formas amastigotas junto com o repasto sanguíneo, no tubo digestivo do inseto as amastigotas se transformam em promastigotas, as quais sofrem uma série de mudanças morfológicas e fisiológicas. Ao se alimentarem novamente, os insetos depositam as formas promastigotas na pele do novo hospedeiro. Os parasitos são fagocitados e transformam-se em amastigotas que se dividem, as células parasitadas se rompem e as

amastigotas são fagocitadas por novos macrófagos. O ciclo se completa quando as amastigotas são ingeridas por novos flebotomíneos.

Programas de controle podem incluir o tratamento de casos humanos, controle do inseto vetor e a eliminação do reservatório animal. Em áreas do Brasil onde a leishmaniose visceral é endêmica, enfatiza-se a eliminação de animais soropositivos. Contudo, estudos mostram que a estratégia não é efetiva (ASHFORD *et al.*, 1998).

### 2.3 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Há várias espécies de mamíferos vertebrados naturalmente infectados com *Leishmania*. Canídeos são os reservatórios descritos mais comumente entre as espécies viscerotrópicas na região do Mediterrâneo, Ásia, África do Norte e Sul América (PALATNIK-DE-SOUSA, 2001). Dentre eles, os cães domésticos são o principal reservatório hospedeiro para doenças humanas (CIARAMELA, *et al.*, 1997; FOGLIA-MANZZILLO *et al.*, 2013) e desempenham uma importante função na transmissão para humanos (PALATINIK-DE-SOUSA *et al.*, 2001; REIS *et al.*, 2010).

A história natural da leishmaniose canina depende de vários fatores, como carga parasitária, imunidade mediada por células, subconjuntos de células, resposta humoral e expressão de citocinas (REIS *et al.*, 2010). E a forma grave é caracterizada por evolução crônica de sinais viscero-cutâneos, como aumento de linfonodo, lesões cutâneas, esplenomegalia, onicogribose, danos renais e oculares devido a deposição de complexos imunes (CIARAMELA *et al.*, 1997; FOGLIA-MANZZILLO *et al.*, 2013), sendo os principais achados encontrados em exames físicos clássicos lesões na pele, linfadenomegalia, baixo peso progressivo, atrofia muscular, intolerância ao exercício, letargia, diminuição de apetite, esplenomegalia, onicogribose, vômito, diarreia (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009). O período de incubação antes da apresentação de sinais clínicos compatíveis com a doença clínica pode variar de pelo menos três meses até sete anos (MIRÓ, *et al.*, 2008). Segundo o Ministério da Saúde, (2014), a classificação dos cães com leishmaniose visceral quanto aos sinais clínicos é definida como: cães assintomáticos, com ausência de sinais clínicos sugestivos da infecção por *Leishmania*; cães oligossintomáticos dentre os principais sinais clínicos estão adenopatia linfóide, pequena perda de peso e pelos opacos; e cães sintomáticos com todos ou alguns sinais mais comuns da doença como as alterações cutâneas (alopecia, eczema furfuráceo, úlceras, hiperqueratose), onicogribose, emagrecimento, ceratoconjuntivite e paralisia dos membros posteriores.

Diferente dos seres humanos, cães sintomáticos com leishmaniose visceral não desenvolvem cura parasitológica, isto é, voltam a apresentar sinais clínicos ao final do tratamento ou tempos depois da cura clínica (IKEDA-GARCIA *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2008, SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009). Dentro da população de cães de áreas endêmicas, uma fração susceptível de cães infectados tende a progredir com o desenvolvimento da doença clínica, enquanto a outra fração por ser resistente não desenvolve sinais clínicos (ALVAR *et al.*, 2004; FOGLIA MANZILLO *et al.*, 2013).

Cães assintomáticos não apresentam sinais clínicos visíveis, e possuem aparência de cão saudável, cães oligossintomáticos apresentam sinais como alterações cutâneas, baixo peso e alopecia localizada, e os cães sintomáticos apresentam os sinais clínicos típicos como alterações cutâneas podendo ser ulcerativas, baixo peso, onicogribose, dermatite, linfadenomegalia e esplenomegalia (SANCHEZ *et al.*, 2004; REIS *et al.*, 2006). Quando cães apresentam escore clínico entre zero e três são classificados com baixo escore clínico para LV, e os cães com alto escore clínico apresentam escore igual/superior a quatro (SOLCÀ *et al.*, 2016).

No Brasil a eutanásia de cães com LV é recomendada a todos os animais com sorologia positiva ou parasitológico positivo (BRASIL, 2014). Mesmo em áreas de transmissão zoonótica, o controle bem sucedido da doença foi atribuído ao tratamento em massa de pacientes humanos e ao uso de inseticidas para controle de vetores, tornando difícil atribuir o controle bem sucedido a eliminação do cão (COSTA, 2011; OTRANTO e DANTAS-TORRES, 2013). No entanto, numerosos cães foram eliminados, sem critérios definidos, pois qualquer cão encontrado em áreas onde a infecção era endêmica foi morto indiscriminadamente (OTRANTO e DANTAS-TORRES, 2013).

## 2.4 ASPECTOS GERAIS DA IMUNIDADE CONTRA *L. INFANTUM*

### 2.4.1 *Em seres humanos*

A evolução clínica ou cura da leishmaniose visceral depende da resposta imune do hospedeiro, principalmente quanto ao perfil de citocinas.

A evolução da infecção está relacionada à persistência e multiplicação do parasito no organismo (GOLLOB *et al.*, 2005). Segundo SINGH, (2014), na infecção por *Leishmania*, antígenos são apresentados a células T via complexo de histocompatibilidade (MHC) classe II, para células TCD4+ ativarem células que expressem receptores de células T (TCR)

específicos para MHC – complexo antígeno de forma a conduzir a diferenciação de células TCD4+ específicas para *Leishmania*.

Na infecção por *Leishmania*, a resposta Th1 é responsável por ativação da atividade microbicida por macrófagos do hospedeiro e subsequente controle da infecção. A resposta Th1 pode ser induzida rapidamente e tem a capacidade de ir aos sítios de infecção e drenar linfócitos até o local (GOLLOB *et al.*, 2005). A imunidade mediada por células T desempenha um papel central na resposta a patógenos intracelulares (ANTONELLI, *et al.*, 2005). Essas células estão envolvidas na morte do parasito *Leishmania* através da produção de citocinas que medeiam a ativação de macrófagos resultando na destruição do parasito intracelular e possivelmente na lise direta dos macrófagos infectados (PINELLI *et al.*, 1994). Pessoas com estado clínico assintomático de leishmaniose visceral desenvolvem resposta imune celular (Th1) (MICHALLIK e GENARO 2005; SILVA, 2007; SINGH *et al.*, 2012), com altos níveis de células T associadas de CD4+ e CD8+ que ativam a produção de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  (PINELLI *et al.*, 1994, 1999; CARRILLO e MORENO, 2009), sendo IFN- $\gamma$  a principal citocina envolvida na ativação de macrófagos e morte de amastigotas intracelulares auxiliada por TNF- $\alpha$ , principal mecanismo de controle da disseminação do parasito (VOULDOUKIS *et al.*, 1996; CARRILLO, MORENO, 2009). Em pessoas sintomáticas a resposta imune celular é prejudicada (REIS *et al.* 2009), estas, apresentam redução de células B CD21+ e de células T CD4+ (BOURDOISEAU *et al.*, 1997; SILVA, 2007), desenvolvendo resposta imune do tipo Th2 com a produção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, (ROGERS *et al.*, 2002; SILVA, 2007; CARRILLO, MORENO, 2009).

#### 2.4.2 Em cães

A resposta imune contra leishmaniose visceral canina parece não ser muito bem estabelecida. Não é sabido exatamente quais mecanismos nos cães são responsáveis pela proteção ou suscetibilidade à infecção, nem de que forma são afetados pelos fatores mencionados anteriormente (ALVAR *et al.*, 2004). Nem como fatores, como idade, genética, nutrição, co-infecção e/ou doença concomitante, condições imunossupressoras, ambiente das citocinas, carga parasitária podem afetar a resposta imune e o desfecho da infecção em cães (SIDERIS *et al.*, 1999; FRANCA-SILVA *et al.*, 2003, SOLANO-GALLEGU *et al.*, 2009).

Em estudos como o de PINELLI *et al.* (1994), foi observado uma diferença na resposta imune em cães susceptíveis ou resistentes a LV, com aumento de resposta linfoproliferativa em cães resistentes e em contraste cães susceptíveis com falha na resposta mediada por células

T. A ausência de uma resposta de células T adequada que possa controlar o parasito leva ao aparecimento de sinais clínicos, altos níveis de anticorpos específicos para *Leishmania* e de parasitos na pele, medula óssea, baço fígado e gânglios linfáticos (REIS *et al.*, 2010). Porém, segundo autores como (SILVA, 2007), o padrão de resposta Th não está muito bem estabelecido. A produção de IL-10 e TGF- $\beta$  está presente em todos os grupos estudados, nos cães assintomáticos e nos sintomáticos (SILVA, 2007; CORRÊA, *et al.*, 2007). Em contrapartida, COFFMAN *et al.* (1988); MOSMANN *et al.* (1986); SOLANO-GALLEGO *et al.* (2016), afirmaram que as células Th2 secretam interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-10 (IL-10) e fator de crescimento de transformação beta (TGF- $\beta$ ) e se correlacionam com a progressão da doença. No entanto, a IL-10, por sua vez, é uma citocina produzida por macrófagos ativados, células T e B (HOWARD e O'GARRA, 1992; GASIM *et al.*, 1998; CORRÊA *et al.*, 2007).

Em cães infectados, resistência é associada com a existência de imunidade mediada por células com a produção de IL-2, TNF, e IFN- $\gamma$  (ALVAR *et al.*, 2004; PINELLI *et al.*, 1994). Sendo o mecanismo chave efetor envolvido na resposta imune protetora de cães infectados por *L. infantum* a ativação de macrófagos por IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  para a morte de amastigotas intracelulares através da via óxido nítrico de l-arginina (VOULDOUKIS *et al.*, 1996; BARBIÉRI, 2006).

O papel da produção de IL-6 na fisiopatologia da LV ainda não está claro. Em estudos realizados por DE LIMA *et al.* (2007), houve um aumento na produção de IL-6 em soros de cães com leishmaniose visceral ativa. Em mamíferos como por exemplo o cão, a IL-6 foi associada ao desenvolvimento tanto da resposta Th1 como da resposta Th2 (DE LIMA *et al.*, 2007). E quando PBMC de cães saudáveis e assintomáticos foram estimulados com antígeno solúvel de *Leishmania*, semelhantes níveis de expressão de IL-6 mRNA e TNF- $\alpha$  mRNA foram observados (CHAMIZO *et al.*, 2005; DE LIMA *et al.*, 2007).

A elucidação dos mecanismos mediadores da resposta imune na LVC pode contribuir para o desenvolvimento de vacinas, estratégias de imunoterapia e no diagnóstico da infecção (BARBIÉRI, 2006). Assim como o desenvolvimento de técnicas quantitativas através do estudo de citocinas caninas permitirá uma melhor compreensão de seu papel regulador na resposta ao parasito e na patogênese da leishmaniose visceral canina, com aplicação ao desenvolvimento do tratamento e vacinas (ALVAR *et al.*, 2004), além de contribuir na identificação de cães resistentes a LV, evitando assim, eutanásias desnecessárias de cães não infectáveis para o vetor.

## 2.5 DETECÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Até a década de 30, o diagnóstico humano e os inquéritos caninos eram realizados por meio dos exames diretos como a punção de fígado, de baço e o raspado de pele. Esses exames são seguros quanto à positividade dos casos, todavia, sem eficácia na realização de uma cobertura total dos animais positivos (ADLER, 1932; ALVES e BEVILACQUA, 2004), além disso, são testes que permitem a identificação do parasito, porém, são laboriosos. Testes como métodos sorológicos e de aglutinação direta são utilizados, mas, a valoração como marcadores de infecção não é firmemente estabelecida. Esses testes detectam principalmente infecções mais recentes (GIDWANI *et al.*, 2011). O diagnóstico de leishmaniose visceral em cães deve ser baseado na integrada abordagem que inclui sinais clínicos, histórico, achados clínicos externos, e testes básicos de laboratório, análise que possa revelar danos indiretos e diretos causados pelo parasito e resposta imune do hospedeiro (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009; FOGLIA MANZILLO *et al.*, 2013).

Em área endêmica, usando várias técnicas de diagnóstico ou detecção de infecção ao parasito, como sorologia e proliferação de linfócitos, ou avaliação clínica, à avaliação de imunidade celular, através da reação de Montenegro, encontra-se tipicamente 5 a 10% dos cães sintomáticos e 90 a 95% clinicamente saudáveis (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009). Ensaio sorológicos têm vários problemas intrínsecos, entre eles a persistência de anticorpos específicos após a recuperação dos sinais clínicos ou diminuição da carga parasitária, ou reação cruzada com anticorpos contra outros patógenos como *Trypanosoma cruzi* e *Ehrlichia canis* (FERREIRA *et al.*, 2007; MAIA e CAMPINO, 2008).

O principal avanço no diagnóstico da LVC no Brasil ocorreu em dezembro de 2011, quando o MS substituiu o ensaio imunoenzimático (EIE LVC) usado na triagem de cães e a imunofluorescência indireta (IFI LVC) usada como método de confirmação da doença, por um novo protocolo de diagnóstico sorológico para LVC, utilizando o teste rápido imunocromatográfico (TR-DPP LVC) na triagem e o EIE LVC como teste confirmatório (BRASIL, 2011).

A detecção de LVC pode ser mais difícil em cães assintomáticos e nos animais com poucos achados clínicos (oligossintomáticos), nestes casos, um teste com alta sensibilidade seria imprescindível para evitar resultados falso-negativos subestimando a infecção por *Leishmania* em populações de áreas endêmicas, como também falso-positivos que podem

resultar numa eutanásia desnecessária de cães não infectados (MAIA e CAMPINO, 2008; GOMES *et al.*, 2008).

## 2.6 ENSAIO QUANTIFERON MODIFICADO

Ensaio de sangue total parecem reproduzir um ambiente natural, pois não apenas as interações célula a célula são preservadas, mas os mediadores estimuladores e inibitórios circulantes também estão presentes em sua concentração normal. Então este, aparenta ser o melhor meio para estudar a produção de citocinas (GROOTE *et al.*, 1992).

Estudos utilizando o ensaio de produção de IFN- $\gamma$  em sangue total com estímulos específicos começaram por volta da década de 80, ensaio idealizado em estudos realizados por KIRCHNER e WOOD e colaboradores para detecção de tuberculose bovina e humana, visto que, o método utilizado (teste cutâneo) apresentava por vezes resultados duvidosos. KIRCHNER *et al.* (1982) estudaram a produção de interferons alfa e gama em sangue total de adultos saudáveis diluído com meio de cultura de tecidos. Segundo eles, no ensaio de sangue total, a resposta a vários indutores de diferentes tipos de interferon podem ser prontamente monitoradas em condições sem soro.

Mais tarde WOOD *et al.* (1990) compararam o ensaio de produção de IFN- $\gamma$  em sangue total com o teste cutâneo de tuberculina para o diagnóstico de tuberculose bovina. Segundo WOOD *et al.* (1990; 1991; 1992) o teste de tuberculina, no qual o antígeno é inoculado e testado após três dias interfere no diagnóstico, por precisar haver uma repetição do teste devido a imprecisão, ou a ausência do paciente no retorno para a realização da leitura. Por esta razão, foi avaliado o desenvolvimento de um *ensaio in vitro* simples e rápido para o diagnóstico de tuberculose bovina, um ensaio de liberação de interferon gama. Resumidamente, neste ensaio, sangue periférico foi coletado de cada animal e cultivado em placa de 24 poços, e proteína purificada derivada de tuberculina (PPD) adicionada a placa, com incubação 24 horas a 37 °C para posterior coleta do plasma (WOOD *et al.*, 1992).

Posteriormente, STREETON *et al.* (1995); MAZUREK *et al.* (2001); BROCK *et al.* (2001); BELLETE *et al.* (2002), passaram a referir-se ao ensaio de sangue total como teste QuantiFERON, por tratar-se de um teste que quantifica a liberação de IFN- $\gamma$  por células de sangue total, nesse período, o teste passou a ser comercializado. Este fora melhorado de forma a torná-lo mais simples de realização. Resumidamente, o teste foi dividido em duas etapas: na primeira, amostras de sangue periférico incubadas na presença de antígeno específico e mitógeno, e na segunda etapa, realizada no dia seguinte, a quantificação de IFN- $\gamma$  em plasma

usando um simples ensaio imunoenzimático (STREETON *et al.*, 1995; 1998). Em alguns estudos o ensaio QuantiFERON apresentou uma melhor sensibilidade e especificidade quando comparado ao teste cutâneo de Tuberculina (CONVERSE *et al.*, 1997; MAZUREK *et al.*, 2001).

Atualmente o teste QuantiFERON é utilizado para detectar infecção latente de *Mycobacterium tuberculosis* através da mensuração de IFN- $\gamma$  produzida pela estimulação de células T em resposta a antígenos específicos, (PAI *et al.*, 2007; ANDERSEN *et al.*, 2006; LIGHTER *et al.*, 2009; METCALFE *et al.*, 2012).

Posteriormente, este ensaio despertou o interesse para estudo e avaliação de sua utilidade em doenças com leishmaniose. TURGAY (2010), foi o primeiro a avaliar o ensaio na detecção de infecção por *Leishmania*. Este que é na verdade, uma modificação do teste de tubo QuantiFERON (Cellestis, Austrália), um kit de teste comercial que mede níveis de IFN- $\gamma$  liberados por linfócitos T sensibilizados em uma amostra de sangue venoso estimulada com antígenos peptídicos do *Mycobacterium tuberculosis* (ANDERSEN *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2012).

Segundo autores como TURGAY (2010), a mensuração *in vitro* de resposta imune mediada por células T estimuladas por antígenos específicos, pode ser um método alternativo e eficaz para estudos epidemiológicos quanto a detecção de patógenos intracelulares como *Leishmania sp.* O ensaio baseia-se na mensuração de citocinas liberadas por células de sangue total. O ensaio QuantiFERON modificado com antígenos de *Leishmania* tem sido capaz de detectar infecção subclínica em pacientes saudáveis que vivem em área endêmica para leishmaniose visceral (CARRILLO *et al.*, 2015; TURGAY, 2010), e pacientes com doença ativa apresentaram elevados níveis de IL-10 (SINGH, 2014). A estimulação de sangue total com antígenos específicos de *Leishmania* é associada com concentrações significativamente altas de IFN- $\gamma$  em paciente curados (especialmente) e assintomáticos (IBARRA-MENESES *et al.*, 2016). SINGH *et al.* (2012) observaram um perfil similar de produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em pacientes curados de leishmaniose.

SCHNORR e MUNIZ (2012) avaliaram o QuantiFERON modificado em pacientes com leishmaniose cutânea e observaram que o uso do teste *in vitro* que avalia a produção de IFN- $\gamma$  foi útil, pois, não somente os níveis de produção de IFN- $\gamma$  aumentaram em pacientes com evidência da infecção por *Leishmania*, como também o teste demonstrou discordância entre os resultados do teste cutâneo.

Em cães, até o presente momento, existem poucos trabalhos que avaliaram o uso deste ensaio. SOLANO-GALLEGO *et al.* (2016), avaliaram a produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 secretadas



em sangue estimulado com antígeno de *Leishmania infantum*, cães com diferentes estágios clínicos da doença, e observaram que uma razoável parte dos cães que eram produtores de IFN- $\gamma$  específicos para *L. infantum* também foram classificados com os estágios clínicos mais discretos.

MARTÍNEZ-ORELLANA *et al.* (2017), destacaram que em cães que inicialmente tinham baixas concentrações de IFN- $\gamma$ , houve um aumento significativo da concentração desta citocina quando o sangue periférico foi estimulado com SLA durante o tratamento a longo prazo, juntamente com a diminuição dos níveis de anticorpos específicos de *L. infantum*, parasitemia e melhora clínica.

Esses achados mostram que a pesquisa nessa área é essencial para o desenvolvimento de possíveis ferramentas imunológicas e epidemiológicas para a leishmaniose canina e humana (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2016). O ensaio de produção de citocinas em sangue total na avaliação de cães com leishmaniose visceral, pode ser um desafio promissor por avaliar o perfil imunológico a partir da produção de citocinas. Sabe-se que as manifestações clínicas e o resultado da infecção na leishmaniose canina são uma consequência de interações complexas entre o parasito e os antecedentes genéticos e imunológicos do cão (MARTÍNEZ-ORELLANA *et al.*, 2017; HOSEIN *et al.*, 2017).

O ensaio de produção de citocinas por ser realizado em sangue total contém todas as populações celulares e os fatores solúveis necessários para a ativação das células T, refletindo o ambiente *in vivo* (ZIBRI *et al.*, 2017).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Avaliar a utilidade do teste QuantiFERON na definição de susceptibilidade ou resistência na leishmaniose visceral canina

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar um grupo de cães de área endêmica de leishmaniose visceral pela avaliação clínica, parasitismo por *Leishmania*, resposta imune humoral e celular específicas
- Determinar a concentração de citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-6) no plasma de sangue total cultivado na presença de antígenos de *Leishmania* utilizando o ensaio QuantiFERON modificado
- Correlacionar os grupos de cães classificados de acordo com parâmetros clínicos, parasitológicos e de resposta imune com a produção de citocinas no ensaio QuantiFERON modificado

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS E DESENHO DO ESTUDO

Para a realização do presente estudo, foram utilizados cães provenientes de Camaçari e cães controles negativos oriundos de Salvador, Bahia.

O município de Camaçari está localizado no estado da Bahia, na região metropolitana de Salvador, a 45 km da capital (12°42'Se 38°20'O). Camaçari possui uma extensão de aproximadamente 785 km<sup>2</sup>, população humana de 242.970 habitantes (IBGE, 2010) e população canina de cerca de 60.000 animais (FERNANDES *et al.*, 2014). O município de Camaçari apresenta clima úmido, com temperatura anual média de 24,5 °C, pluviosidade anual de 1977 mm, e é chuvoso entre os meses de fevereiro e agosto (BAHIA, 2013). Camaçari é um dos municípios brasileiros endêmicos para leishmaniose visceral (BRASIL, 2014).

O estudo foi realizado pela avaliação de corte transversal de dois grupos de cães provenientes de Camaçari. O primeiro grupo foi constituído por 29 cães, sendo 11 machos e 18 fêmeas, os quais foram recrutados em duas campanhas. 18 animais foram recrutados na primeira campanha (Bagues, 2016) e 11 animais foram recrutados na segunda campanha, em 2017. Os animais recrutados foram submetidos a exame clínico (ficha clínica, apêndice 12), coleta de sangue periférico, punção esplênica e teste de hipersensibilidade cutânea tardia (DTH, reação de Montenegro) em apenas uma oportunidade em um período de três dias. As amostras de sangue foram usadas para avaliação de anticorpos anti-*Leishmania* (ELISA) e ensaio QuantiFERON modificado. Foram considerados animais infectados, os cães que apresentaram resultado sorológico positivo (ver descrição secção 4.7), detecção de *Leishmania* no baço (por PCR ou cultura) ou resposta imune celular. Foram considerados animais sem marcador de infecção, quando independentemente de exibir manifestações clínicas, os cães que apresentaram resultado negativo nas avaliações da resposta imune humoral e celular e parasitológica. Um escore clínico para cada animal foi estabelecido baseando-se na frequência e gravidade dos sinais clínicos (ver secção 4.4). Os animais foram classificados quanto ao escore clínico em cães com escore clínico baixo ou cães com escore clínico alto quando o escore clínico foi inferior ou igual/ superior a quatro, respectivamente. Os animais foram distribuídos nos seguintes subgrupos: a) cães sem marcador de infecção, b) cães com baixo escore clínico e c) cães com alto escore clínico. Além disso, um grupo de cães foi usado como controle negativo (ver descrição abaixo). O segundo grupo de cães provenientes de Camaçari foi formado por 27 cães, sendo 12 machos e 15 fêmeas. Esses

animais correspondem a um subgrupo de cães recrutados inicialmente em um estudo para avaliação da história natural da leishmaniose visceral canina (Solcà, 2017). Tal estudo envolveu 122 cães, os quais foram acompanhados por dois anos, cujo em 65 foi detectada a infecção por *Leishmania*. Ao longo dos dois anos, os animais foram submetidos a exame clínico, coleta de sangue periférico (para sorologia e PCR para detecção de DNA de leishmânia) a cada três meses e punção esplênica a cada seis meses (para PCR e cultura para detecção de DNA de leishmânia). Dentre os animais, aqueles que exibiram algum resultado positivo, em (a) cultura (em material aspirado de baço) ou reação em cadeia da polimerase para detectar DNA de leishmânia (em amostra sangue periférico, pele ou material aspirado de baço) ou b) detecção de anticorpos anti-*Leishmania* (usando-se método baseado na plataforma de duplo percurso, DPP ou ELISA Biomanguinhos, FIOCRUZ), ao longo do acompanhamento foram recrutados para mais uma coleta de amostras (sangue periférico e material aspirado do baço) e avaliação (pelo exame clínico e ensaios sorológico, DTH, parasitológico e QuantiFERON modificado). A coleta e avaliação que envolveu o ensaio QuantiFERON modificado foram realizadas em 2018 e ocorreram em um período de três dias. Os animais foram classificados de acordo com o escore clínico em cães com escore clínico baixo ou cães com escore clínico alto quando o escore clínico foi inferior ou igual/ superior a quatro, respectivamente. Os animais foram distribuídos nos seguintes subgrupos: a) cães com baixo escore clínico e b) cães com alto escore clínico. Além disso, um grupo cães foi usado como controle negativo, sendo esse grupo o mesmo usado como controle negativo no primeiro grupo de animais.

Nove cães oriundos de Salvador, Bahia, doados pelos seus proprietários quando ainda filhotes, com cerca de 60 a 90 dias de idade, e mantidos no canil experimental do Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fiocruz, Bahia, foram usados como controles negativos. Esses animais foram mantidos no canil separados por índole e porte e recebendo ração industrializada e água *ad libitum*. Esses animais foram ainda acompanhados periodicamente por avaliação clínica, sorológica e parasitológica e submetidos a tratamento com vermífugos e vacinação contra raiva, leptospirose, cinomose, adenovírus, virose causada por parainfluenza, parvovirose, hepatite viral e coronavirose (Vanguard Plus e Defensor Zoetis, Lincoln, EUA, uma vez por ano). Os animais foram usados como controle negativo quando tinha uma idade de cerca de 2 a 4 anos.

#### 4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

As manipulações dos cães foram realizadas de acordo com as recomendações para experimentação animal da Fundação Oswaldo Cruz e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animal do IGM (protocolo CEUA 017/2015). Nos animais oriundos de Camaçari, as avaliações clínicas, coletas de sangue, punções esplênicas, e teste de hipersensibilidade cutânea tardia, foram realizadas por médico veterinário ou supervisão de médico veterinário com o consentimento do proprietário de cada cão.

### 4.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os animais foram submetidos a exame clínico por um médico veterinário usando-se uma ficha de avaliação clínica (Apêndice 12). Nas fichas clínicas foram anotados os pesos corpóreos bem como aspectos da pele e mucosas, unhas, linfonodos superficiais, fígado e baço dos cães. A cada sinal clínico foram atribuídos escores dependendo da intensidade e/ou extensão (ver ficha clínica, Apêndice 12). Um escore clínico final para cada animal foi estabelecido a partir da soma dos escores (Apêndice 13).

#### **Coleta de sangue**

As amostras de sangue foram coletadas pela veia cefálica ou jugular. As amostras foram coletadas em tubos (Vacutainer, BD, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA) com (8 mL) ou sem (4 mL) heparina.

#### **Punção esplênica**

As punções esplênicas de baço dos cães para obtenção de material aspirado foram realizadas conforme método descrito por BARROUIN-MELO e colaboradores, (2006).

#### **Teste de hipersensibilidade cutânea tardia**

Os testes de hipersensibilidade cutânea tardia nos cães foram realizados conforme método descrito por PARANHOS-SILVA e colaboradores. Resumidamente, em cada animal foram injetados de antígenos brutos de *Leishmania infantum* na região do abdômen (250 µg de proteína em salina em um volume de 100 µL). Na região contralateral do abdômen foram injetados 100 µL de salina para uso como controle negativo. Quarenta e oito horas após a

administração dos antígenos, foram realizadas as medições correspondentes a induração. As medidas das duas maiores dimensões das áreas de induração foram realizadas e uma média das medidas foi usada em análises posteriores. Foram consideradas reações positivas quando o valor médio da área de induração alcançou mais que 5 mm (CARDOSO *et al.*, 1998; BALEEIRO *et al.*, 2006; DOS-SANTOS *et al.*, 2008).

#### 4.4 DETECÇÃO DO PARASITISMO POR *LEISHMANIA*

Amostras de material aspirado dos baços dos cães foram inoculadas em meio NNN (Neal, Novy, Nicolle) com soro bovino fetal inativado e cultivadas a 24°C pelo período de um mês. A cada semana uma amostra de cultura de cada cão foi coletada e examinada sob o microscópio óptico para a detecção de formas promastigotas de *Leishmania*.

Amostras de material aspirado dos baços dos cães foram submetidas a extração de DNA com DNAeasy Blood e Tissue kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. Antes da purificação de DNA, as amostras de aspirado esplênico foram digeridas com proteinase K por cerca de 12 h (MARY *et al.*, 2004). As amostras de DNA foram usadas para a realização de PCR em tempo real usando-se pequenas modificações no método descrito por FRANCINO e colaboradores, 2006. Resumidamente, triplicatas de reação de 25 µL foram realizadas com 150 ng de DNA, oligonucleotídeos iniciadores LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') e LEISH-2 (5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3'), e sonda FAM-MGB (FAM-5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'-MGB) para uma região conservada do mini círculo de *Leishmania* ou oligonucleotídeos e sonda específicos para a detecção de rDNA 18S (controle positivo do ensaio, Applied Biosystems, Carlsbad, USA), além de 0.2 mg/µL de albumina bovina e mistura master de TaqMan (Applied Biosystems). A PCR foi realizada através de uma colaboração com as Dra. Deborah Bittencourt Mothé Fraga, Dra. Manuela Solcá e Msc. Bruna Leite, Laboratório de interação parasito-hospedeiro e epidemiologia do Instituto Gonçalo Moniz, Fiocruz, Bahia.

#### 4.5 ANTÍGENOS DE *LEISHMANIA*

Os antígenos de *Leishmania* foram obtidos a partir da cepa MHOM/BR2000 *L. infantum* (BALEIRO *et al.*, 2006), para uso nos ensaios DTH (Reação de Montenegro) e nos Ensaios QuantiFERON modificado e Ensaio imunoenzimático ELISA para detecção de anticorpos específicos. Para isso, uma alíquota de macerado de baço de hamster infectado foi descongelada e, após lavagem, cultivada em meio de cultura Schneider (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), suplementado com 20% Soro Bovino Fetal inativado (Gibco) e meio NNN (Neal, Novy, Nicolle), a 24 °C. Formas promastigotas foram passadas na concentração de  $2 \times 10^6$  parasitos/mL. Antes da terceira passagem, formas promastigotas de um volume de 300 mL de cultivo foram sedimentadas, obtendo-se  $3 \times 10^{10}$  parasitos. O sedimento de *L. infantum* foi lavado 3 vezes em salina, pela centrifugação a  $3.000 \times g$  a 4 °C por 10 minutos, a cada vez. O sedimento final ressuspensionado em 10 mL de salina foi submetido quatro vezes ao congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em gelo. Em seguida, a suspensão foi submetida a sonicação (Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, EUA) com 10 ciclos de 20 segundos, com pulsos de 50% de potência e um minuto de intervalo em cada dois ciclos consecutivos. Uma parte da suspensão (lisado total, antígenos brutos) foi aliquoteada e armazenada a -20 °C até o momento do uso. A outra parte da suspensão foi centrifugada por 30 minutos a  $30.000 \times g$  a 4 °C e o sobrenadante resultante (antígenos solúveis de *Leishmania*, SLA) foi aliquoteado e armazenado a -20 °C. A concentração protéica do lisado total e dos SLA foi determinada pelo método de Lowry modificado (LOWRY, 1951). Além disso, a concentração de endotoxinas no SLA foi mensurada usando-se lisado de amebócitos de *Limulus* kit *Limulus Amebocyte Lysate*, QCL-1000 (Lonza), seguindo-se as recomendações do fabricante (Apêndice 2).

O antígeno recombinante de *L. infantum* rLci2-NT-CT, possui as extremidades amina (701 AA) e carboxila (76 AA) o antígeno recombinante rLci2-NT-5R-CT possui a mesma sequência de aminoácidos do rLci2-NT-CT além da inserção de 5 domínios com motivos repetitivos de 39AA entre os domínios não repetitivos de 701AA e 76AA. As proteínas recombinantes foram obtidas a partir de construções plasmídicas em *pRSET* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) e *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3) -RP (Invitrogen), seguindo-se as recomendações do fabricante (Bagues, 2016). Resumidamente, amostras de colônias de *E. coli* foram usadas para inocular caldo Luria-Bertani (LB) com glicose 1mg/mL (Sigma) e ampicilina e cloranfenicol e cultivadas a 37 °C a 250 rpm por cerca de 12 horas. Depois disso, uma amostra das suspensões bacterianas foi diluída e cultivadas a 37°C a 250

rpm até a densidade óptica 600 nm a atingir cerca de 0,5. A partir daí, isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosídeo (IPTG, Invitrogen) foi adicionado para alcançar a concentração de 0,1 mM. Três horas depois, os sedimentos bacterianos foram obtidos por centrifugação (6.000 x g a 4°C por 15 minutos), pesados e armazenados a -20 °C até o momento do uso. As proteínas recombinantes foram purificadas conforme descrição prévia (BAGUES, 2016). Resumidamente, os sedimentos foram ressuspensos em tampão contendo lisozima (Sigma), ácido desoxicólico (Sigma), fosfato de sódio a 20 mM e cloreto de sódio a 500 mM, pH 7,4. Em seguida, as suspensões foram submetidas a sonicação (Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, EUA) e centrifugadas a 17.000 x g a 4 °C por 30 minutos. Depois de lavar os sedimentos por três vezes com tampão NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 20 mM e NaCl a 500 mM pH 7,4. Os sedimentos foram solubilizados com tampão 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol e 8 M de uréia, pH 7,4 (tampão de ligação com uréia) e o material insolúvel removido pela centrifugação a 23.000 x g, 4 °C por 1 hora e 30 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados (filtros 0,45  $\mu$ m e de 0,22  $\mu$ m) e aplicados em colunas cromatográficas de Sepharose-níquel (HisTrap HP, GE Healthcare Bio-Sciences, EUA) e as colunas foram lavadas com 50 volumes de tampão NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<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, iochemika, France), pH 7,4; a 10°C (REICHELDT, 2006), para a eliminação de lipopolissacarídeos (LPS) contaminantes. As colunas foram eluídas com NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 20 mM, NaCl a 500 mM, imidazol a 500 mM e uréia a 8 M, pH 7,4. As frações cromatográficas com as proteínas de interesse foram misturadas e dialisadas contra tampão fosfato tamponado com salina a 4°C. As proteínas purificadas foram esterilizadas sob o gelo com irradiação gama a 60.000 rads por irradiador Cobalto pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN, São Paulo, Brasil) e armazenadas a -20 °C até o momento do uso. Alíquotas das proteínas foram usadas para a determinação da concentração proteica Micro BCA (THERMOFISHER), seguindo-se as recomendações do fabricante. Por tratar-se de proteínas insolúveis, essas foram solubilizadas com uréia a 2 M. A análise por SDS-PAGE em gel a 10 % foi avaliada (Apêndice 1) e a concentração de endotoxinas (LAL) foi detectada (Apêndice 2).

A proteína recombinante KMP-11 foi doada por Dr. Javier Moreno, Institute del Salud Carlos III (ISCIII, Espanha).



#### 4.6 ELISA PARA AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*LEISHMANIA*

A detecção de níveis de imunoglobulina G específica contra antígenos de *Leishmania infantum* foi realizada em soros dos cães através do ensaio imunoenzimático (ELISA) padronizado (BALEEIRO *et al.*, 2006), com modificações na diluição utilizada no imunoc conjugado. Resumidamente, placas de microtitulação de 96 poços foram sensibilizadas com SLA (5 µg/poço, 100 µL/poço) em tampão carbonato/bicarbonato de cálcio a 0,06 M, pH 9,8. Depois disso, as placas foram bloqueadas com PBS, pH 7,2 (NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e polioxietileno-sorbitan-monolareto (Tween 20) a 0,05 % e albumina sérica bovina a 4 g/L (150 µL/poço) a 37 °C por 1 hora. Amostras dos soros dos cães foram usadas em diluições duplas seriadas de 1:50 até 1:102.400. Amostras de soro de cão controle negativo e de um cão controle positivo foram utilizadas em cada placa de microtitulação em diluições duplas seriadas de 1:50 até 1:102.400. Em dois poços de cada placa de microtitulação foi acrescentado apenas PBS com Tween 20 a 0,05 % (branco). Após a incubação 37 °C por 1 hora, IgG de coelho anti-IgG de cão conjugada a peroxidase (*Jackson Immunoresearch Laboratories*) foi adicionada na diluição de 1:8000 (100 µL/poço). Depois da incubação a 37 °C por 1 hora, o substrato da peroxidase tetrametilbezidina (TMB) em tampão Fosfato-Citrato (Acetato de sódio e ácido cítrico) foi acrescentado aos poços das placas (100 µL/poço). Após 15 minutos, 50 µL/poço de solução neutralizante (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 M) foram acrescentados nas placas. A leitura da DO a 450 nm foi realizada em espectrofotômetro (Espectra Max 384 340 PC). A partir dos dados de DO das amostras de soros testadas, subtraindo-se os valores de DO dos poços brancos, foi realizada a determinação do título de ponto médio de anticorpos anti-*Leishmania* usando-se o programa *Graphpad prism* a partir de uma curva de quatro parâmetros gerada pelo programa.

#### 4.7 ENSAIO QUANTIFERON MODIFICADO

Amostras de 8 mL de sangue total de 56 cães de área endêmica foram coletadas em tubos heparinizados, mantidas a temperatura ambiente e protegidas da luz, seguindo-se a recomendação do fabricante dos reagentes/materiais usados para a mensuração das citocinas (Millipore-Merck, Darmstadt, Alemanha). No laboratório, amostras de 1 mL de sangue heparinado de cada cão foram transferidas tubos de 2 mL (Corning, Nova Iorque, EUA)

contendo 10 µL de: a) salina (controle negativo), b) com 20 µg de proteína SLA, c) com 10 µg rLci2-NT-CT, e d) com 10 µg rLci2-NT-5R-CT. Uma amostra de 1 mL de sangue diluído de 1:2 em RPMI de cada animal foi colocada em um tubo de 2 mL contendo 5 µL com 5 µg concanavalina A (controle positivo do ensaio). Além disso, uma amostra de 1 mL de sangue de cada cão do segundo grupo e do grupo controle negativo foi adotada a um tubo de 2 mL contendo 17 µL com 10 µg de KMP-11. Os tubos foram incubados por 24 horas a 37 °C em atmosfera úmida. Depois disso, tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos, e amostras de plasma foram transferidas para novos tubos, os quais foram armazenados a - 20 °C.

#### 4.8 MENSURAÇÃO DE CITOCINAS IFN- $\Gamma$ , TNF-A, IL-2, e IL-10 e IL-6

A mensuração de citocinas foi realizada utilizando-se reagentes e materiais do conjunto Milliplex map Canine (Millipore-Merck), seguindo-se instruções do fabricante. A curva de calibração para IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-6, foi realizada com diluições variando de 2,44 pg/mL a 10.000 pg/mL e 12,2 pg/mL a 50.000 pg/mL, respectivamente. Resumidamente, amostras de plasma foram homogeneizadas em vórtex por três segundos e centrifugadas por três minutos a 7.000 x g, temperatura ambiente. Em placas microtitulação de 96 poços. Amostras das citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-6) diluídas, dos plasmas diluídos 1:3 em tampão de ensaio, da solução matriz soro/plasma (controle negativo de ensaio) ou do tampão de ensaio (branco), em volumes de 25 µL, foram colocadas em poços da placa de microtitulação. Controles de qualidade designados pelo fabricante controle 1 e controle 2 foram usados. As amostras das citocinas diluídas, da solução matriz soro/plasma, do tampão de ensaio e dos controles de qualidade foram usadas em duplicatas. Microesferas magnéticas recobertas com anticorpos anti-citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 ou IL-6) suspensas em tampão de ensaio foram adicionadas em poços da placa de microtitulação, usando-se volumes de 25 µL, contendo amostras das citocinas diluídas, dos plasmas diluídos, da solução matriz soro/plasma, do tampão de ensaio e dos controles de qualidade. As placas de microtitulação foram incubadas por 12 a 16 h a 4 °C sob agitação. O líquido dos poços das placas foi removido e as microesferas magnéticas foram lavadas com 150 µL tampão de ensaio/poço. Anticorpos de detecção anti-citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 ou IL-6) foram adicionados aos poços em volumes de 100 µL/poço e as placas foram incubadas a temperatura ambiente por uma hora sob agitação. Após isso, a estreptavidina foi adicionada a placa de microtitulação em volumes de 50 µL/poço, e as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos

sob agitação. Posteriormente, as placas foram lavadas com tampão de ensaio, e acrescentado volumes de 150 µL de fluido do pressurizador do aparelho luminex, e as placas foram colocadas em agitador a temperatura ambiente por 10 minutos, protegidas da luz. A leitura das placas foi realizada em aparelho luminex 200 (Millipore-Merck) em uma colaboração as Mscs. Emília Belitardo e Flavia Sena, Laboratório de Alergia e Acarologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia. As curvas de calibração das citocinas (IL-2, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ ) foram estabelecidas usando-se com amostras das citocinas recombinantes com concentração variando de 12,2 a 50.000 pg/mL. As amostras de plasma que geraram valores de fluorescência inferiores aos obtidos para os pontos mais baixos das curvas de calibração (12,2 pg/mL de cada citocina) foram consideradas com valor de concentração igual a zero pg/mL. A análise dos resultados foi realizada usando os programas de computador: *Luminex Analyst Xponent* versão 3.1, Microsoft Excel versão 2016 e *GraphPad Prism* versão 5.01.

#### 4.9 ANÁLISE POR MAPA DE CALOR

Os resultados da mensuração de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-6) foram mostrados também em gráficos de mapa de calor usando-se a ferramenta da página da Internet <http://heatmapper.ca/expression/>, ajustando-se o brilho para o valor 20 e uma paleta de 80 tonalidades de cores e uma resolução de 144 pixels/polegada quadrada.

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Antes de realizar as análises estatísticas, os valores de concentração das citocinas em amostras de sangue/sangue diluído de cães incubadas com antígenos/mitógeno (SLA, rLci2-NT-CT, rLci2-NT-5T-CT, KMP-11 ou Con A) foram normalizados (CARRILLO *et al.*, 2015; IBARRA-MENESES *et al.*, 2016; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2016; ZIBRI *et al.*, 2017; MARTÍNEZ-ORELLANA *et al.*, 2017). A normalização consistiu em subtrair os valores de concentração das citocinas obtidos nas amostras de sangue incubadas apenas com salina dos valores de concentração obtidos nas amostras de sangue incubadas com antígenos/mitógeno. Por exemplo, os valores de concentração de TNF- $\alpha$  para as amostras de sangue do cão RUR 052 incubadas com salina e SLA foram de 98,1 pg/mL e 897,2 pg/mL, respectivamente. Com a normalização o valor da concentração atribuído para a amostra de sangue incubada com SLA foi de 799,1 pg/mL (897,2 - 98,1 = 799,1).

As distribuições dos valores de concentração das citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-6) e dos títulos médios de anticorpos anti-*Leishmania* dos cães foram avaliadas pelo teste

D'Agostino e Pearson e Shapiro-Wilk. Como as distribuições dos valores de concentração das citocinas e títulos de anticorpos dos cães do primeiro e do segundo grupo mostraram-se não normais, a comparação dos dados entre três ou mais subgrupos (por exemplo: controle negativo, cães sem marcador de infecção, cães com baixo escore clínico e cães com alto escore clínico) foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis e pelo pós-teste de Dunn. As comparações dos valores de concentração das citocinas entre os grupos com DTH+ e DTH- foram realizadas pelo teste Mann Whitney. O programa de computador *GraphPad Prism* v.5.0 (*GraphPad Prism* Inc., San Diego, CA) foi utilizado para aplicação dos testes assim como a representação dos resultados em gráficos. Os valores estabelecidos para a significância estatística foram definidos como: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS CÃES DO PRIMEIRO GRUPO DO ESTUDO

Esse grupo foi composto por 23 fêmeas e 15 machos sendo 34 cães mestiços e quatro de raças puras, subdivididos nos subgrupos: a) controle negativo (9 cães), b) sem marcadores de infecção (5 cães), c) com baixo escore clínico (12 cães) e d) com alto escore clínico (12 cães). O critério estabelecido para classificação dos animais como cães com baixo e alto escore clínico foi o valor de escore  $<4$  e  $\geq 4$ , respectivamente (Tabela 1).

#### Subgrupos de cães:

##### 5.1.1 *Controle negativo*

Os cães de área não endêmica para LV avaliados como controle negativo do estudo foram mantidos no Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fiocruz-BA desde muito novos, e acompanhados periodicamente quanto a avaliação clínica, sorológica e parasitológica. Tratam-se de dois machos e sete fêmeas, todos mestiços. Um total de nove cães, nenhum apresentou sinais clínicos compatíveis com LV ou outra infecção, e todos foram negativos na avaliação parasitológica por qPCR. A avaliação sorológica foi recentemente realizada em cinco destes animais, assim como titulação de anticorpos anti-*Leishmania* e todos foram negativos e apresentaram títulos muito baixos, sendo a mediana de títulos médios igual a 1.612 (Tabela 1).

##### 5.1.2 *Sem marcador de infecção*

Trata-se de um grupo de cães de área endêmica para LV, composto por três machos e duas fêmeas, sendo três cães sem raça definida e dois da raça poodle. Na avaliação clínica somente um cão obteve um escore clínico considerado positivo (escore clínico positivo para LV  $\geq 4$ ). Todos os cães desse grupo (cinco cães) foram negativos nas avaliações parasitológicas e de resposta imune.

A avaliação de resposta imune humoral foi realizada através do ensaio ELISA, (protocolo padronizado em laboratório, todos os cães foram negativos para essa avaliação. A titulação de anticorpos anti-*Leishmania* todos tiveram títulos parecidos com os títulos obtidos

no grupo controle negativo, os títulos médios de anticorpos variaram entre 1.300 e 1.900 a mediana de títulos médios no grupo foi 1.436 (Tabela 1).

#### 5.1.3 Com baixo escore clínico

Esse grupo é composto por oito fêmeas e quatro machos, sendo dez cães mestiços e dois de raça pura. Na avaliação clínica foi observado que dois cães não apresentavam qualquer sinal clínico compatível com leishmaniose visceral, um animal com escore 1, cinco cães com escore 2 e quatro cães com escore 3. A média de escore clínico encontrada no grupo foi 2. Portanto, doze cães com escore clínico considerado negativo para LVC (Figura 1).

Na avaliação parasitológica, para a detecção de *Leishmania* em cultura de aspirado esplênico, todos os cães desse grupo foram negativos, e foi detectado DNA do parasito por qPCR em somente um cão.

Na avaliação de resposta imune humoral, os títulos médios anti-*Leishmania*, variaram entre 1.200 e 6.550, sendo a mediana encontrada no grupo 2.740.

Na avaliação de resposta imune celular realizada com o teste de hipersensibilidade tardia, cinco cães foram positivos (Tabela 1).

#### 5.1.4 Com alto escore clínico

Esse grupo é composto por seis fêmeas e seis machos, todos mestiços. Na avaliação clínica, dois cães obtiveram o escore 4, seis cães com escore 5, três cães com escore 6 e um cão com escore 7 (Figura 1).

Quanto a avaliação parasitológica somente um cão foi positivo na cultura de aspirado esplênico para detecção do parasito, esse mesmo resultado também foi encontrado na avaliação de qPCR para detecção de DNA de *Leishmania*, sendo o mesmo cão positivo para ambos testes.

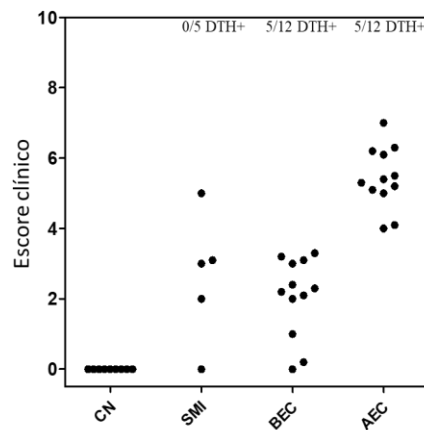
Na avaliação de resposta imune humoral, a de titulação de anticorpos de *Leishmania*, nesse grupo os títulos médios variaram entre 632 e 6.500, sendo a mediana encontrada no grupo 2.588.

A avaliação de resposta imune celular foi realizada através do teste de hipersensibilidade tardia obteve cinco cães foram positivos (Tabela 1).

**Tabela 1. Caracterização do primeiro grupo de cães de área endêmica para leishmaniose visceral Camaçari, Bahia.**

Dados		Controle negativo	Sem marcador de infecção	Baixo escore clínico	Alto escore clínico
<b>Sexo</b>	M	2	3	4	6
	F	7	2	8	6
<b>Raça pura</b>		0	2	2	0
<b>Escore clínico (mediana)</b>		0	3	2	5
<b>Detecção de <i>Leishmania</i></b>	PCR (-/+)	9/0	5/0	11/1	11/1
	Cultura (-/+)	NF	5/0	12/0	11/1
<b>Anticorpos anti-<i>Leishmania</i></b>	Positividade (-/+)	5/0	5/0	1/11	1/11
	Títulos médios (mediana)	1.612	1.436	2.740	2.588
<b>DTH</b>	Média (em mm)	NF	0	5,2	3,8
	(-/+)	NF	5/0	7/5	7/5

Sexo: Fêmea (F) e Macho (M), escore clínico: Os critérios utilizados para identificar como infectados por *Leishmania infantum* foram, cultura, ou qPCR, ou ELISA. 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. NF: não foi realizada a avaliação; (-/+): (negativo/positivo).



**Figura 1. Escores clínicos de cães do primeiro grupo.** Os grupos controle negativo (CN), sem marcador de infecção (SMI), com baixo escore clínico (BEC) e alto escore clínico (AEC) para LV foram definidos pela origem (de área não endêmica ou de área endêmica para LV) e resultado de cultura e/ou qPCR para detecção de *Leishmania* e pela resposta imune específica humoral (avaliada por ELISA) e celular (avaliada teste de hipersensibilidade tardia, DTH). Os cães do grupo CN foram provenientes de área não endêmica e apresentavam resultado de qPCR, ELISA negativos. Os cães dos grupos SMI, BEC e AEC foram provenientes de área endêmica para LV. Os cães do grupo SMI exibiam resultado de cultura, qPCR, ELISA e DTH negativos. Os grupos BEC e AEC revelavam resultado positivo em pelo menos um dos ensaios: cultura, qPCR, ELISA ou DTH, sendo que os grupos BEC e AEC exibiam escore  $<4$  ou  $\geq 4$ , respectivamente. Os escores clínicos foram mensurados conforme descrição em Solcá, 2016. Cada símbolo representa o escore clínico de um cão.

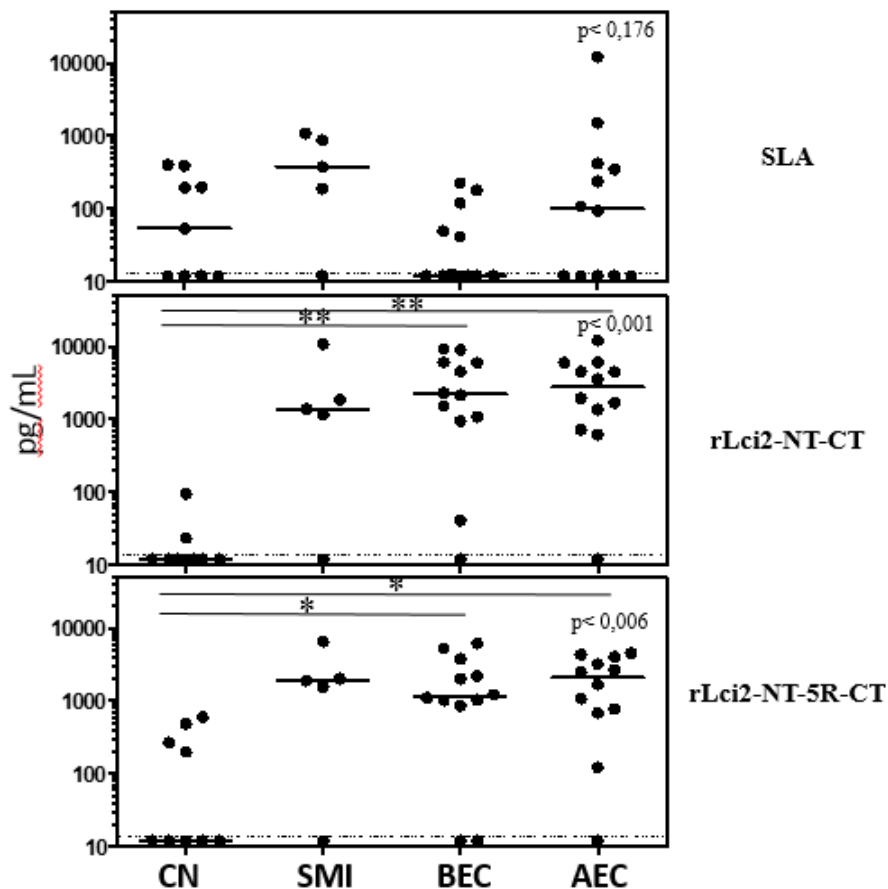
## 5.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IFN- $\gamma$ , TNF-A, IL-2, IL-10 E IL-6 PELO ENSAIO QUANTIFERON MODIFICADO

### 5.2.1 Por subgrupo

Com os cães desse grupo devidamente classificados, foi possível avaliar a eficácia do ensaio QuantiFERON modificado quanto a discriminação de resistência ou susceptibilidade a LV. Infelizmente, a citocina IFN- $\gamma$  apresentou problemas técnicos, em quatro ensaios utilizando o kit de quatro lotes diferentes. Por essa razão, o estudo seguiu com a avaliação das outras quatro citocinas. Não houve diferença na concentração de TNF- $\alpha$  entre as amostras de sangue incubadas com SLA ( $p < 0,176$ ) dos subgrupos de cães. Houve diferença na concentração de TNF- $\alpha$  entre de amostras de sangue incubadas com rLci2-NT-CT dos subgrupos de cães (Kruskall-Wallis  $p < 0,001$ ). O pós-teste de Dunn mostrou diferença entre os grupos CN (Mediana, 0 pg/mL) e baixo escore (2.217 pg/mL,  $p < 0,01$ ) e entre grupos CN e alto escore (2.755 pg/mL,  $p < 0,01$ ). Embora o valor da mediana da concentração de TNF- $\alpha$  do subgrupo sem marcador de infecção (1.392 pg/mL) exiba um valor próximo ao das medianas dos subgrupos baixo escore e alto escore, não detectada diferença estatisticamente significativa entre o subgrupo CN e sem marcador de infecção. A avaliação da concentração de TNF- $\alpha$  após a



estimulação com o antígeno recombinante rLci2-NT-5R-CT mostrou que os subgrupos com baixo escore clínico (1.165 pg/mL,  $p < 0,05$ ), com alto escore clínico (2.101 pg/mL,  $p < 0,05$ ), apresentaram valores superiores ao subgrupo controle negativo (0 pg/mL). A mediana do subgrupo sem marcador de infecção (1.904 pg/mL) foi maior do que CN contudo devido ao número pequeno de animais nesse subgrupo. Os antígenos permitiram somente a identificação da infecção por *Leishmania* (Figura 2).

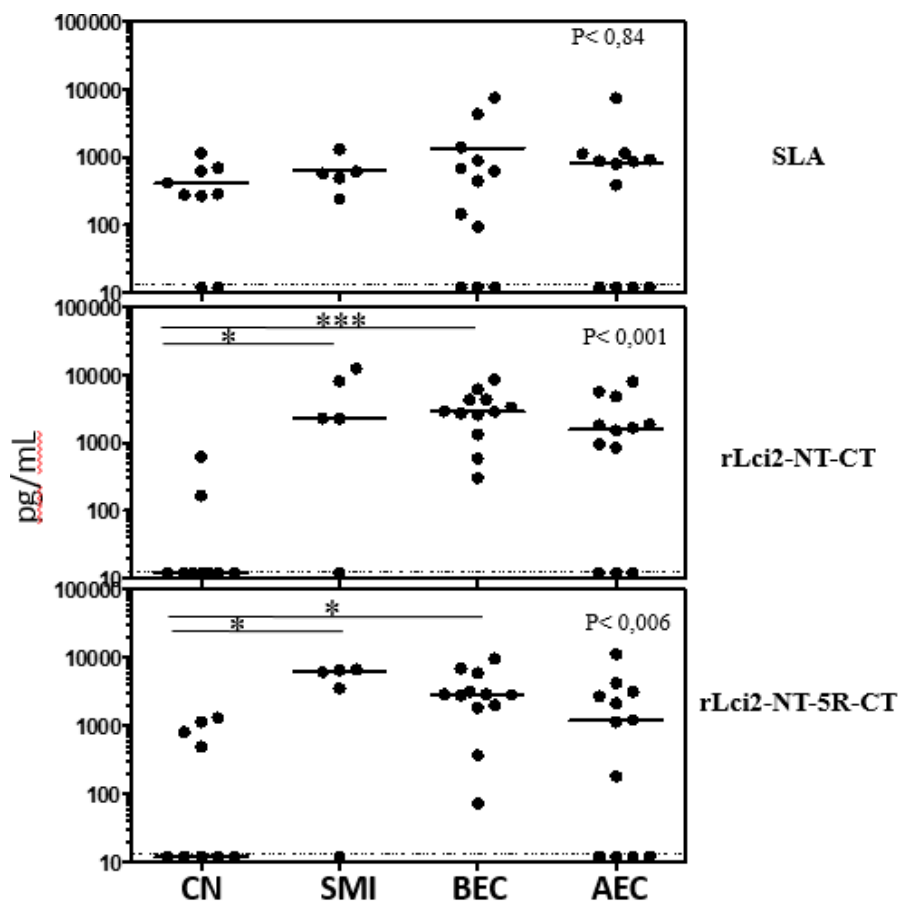


**Figura 2. Avaliação da produção de TNF- $\alpha$  por células de sangue de cães do primeiro grupo de área endêmica para leishmaniose visceral Camaçari, Bahia.** Sangue de cães de área endêmica e não endêmica para leishmaniose visceral canina foi coletado e estimulado na presença dos estímulos: salina, antígeno solúvel de *Leishmania infantum* a 20  $\mu\text{g/mL}$  rLci2NT-CT a 10  $\mu\text{g/mL}$ , rLci2-NT-5R-CT a 10  $\mu\text{g/mL}$ , e concanavalina A a 5  $\mu\text{g/mL}$  por 24h. O plasma foi coletado e o ensaio Milliplex foi realizado para dosar citocinas. CN: subgrupo de cães controle negativo; SMI: cães sem marcador de infecção; BEC: cães com baixo escore clínico para LV; AEC: cães com alto escore clínico para LV. 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 Kruskal Wallis, 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 \*\*\*  $p < 0,001$ .

A avaliação da produção da citocina IL-2 em sangue estimulado com os antígenos e mitógeno, nas análises realizadas, os valores em pg/mL brutos e os valores normalizados

apresentavam-se muito baixos, assim como os valores de medianas encontradas em cada subgrupo (Apêndices 6 e 8).

Na avaliação da citocina IL-10, não houve diferença na concentração de IL-10 entre de amostras de sangue incubadas com SLA dos subgrupos de cães ( $p < 0,84$ ), (Apêndice 8). Após a estimulação de amostras de células de sangue total com o antígeno rLci2-NT-CT, a concentração de IL-10 mostrou diferença entre os subgrupos de cães ( $p < 0,001$ ). O pós-teste de Dunn mostrou diferença entre os subgrupos CN (0 pg/mL) e sem marcador de infecção (2.268 pg/mL,  $p < 0,01$ ) e entre os subgrupos CN e baixo escore (2.876 pg/mL,  $p < 0,001$ ). A avaliação da concentração de IL-6 após a estimulação com o antígeno recombinante rLci2-NT-5R-CT mostrou que houve diferença entre de amostras de sangue incubadas dos subgrupos de cães ( $p < 0,006$ ). O pós-teste de Dunn mostrou diferença entre os subgrupos CN (0 pg/mL) e sem marcador de infecção (6.100 pg/mL,  $p < 0,05$ ) e entre os subgrupos CN e baixo escore (2.851 pg/mL,  $p < 0,05$ ), (Figura 3).

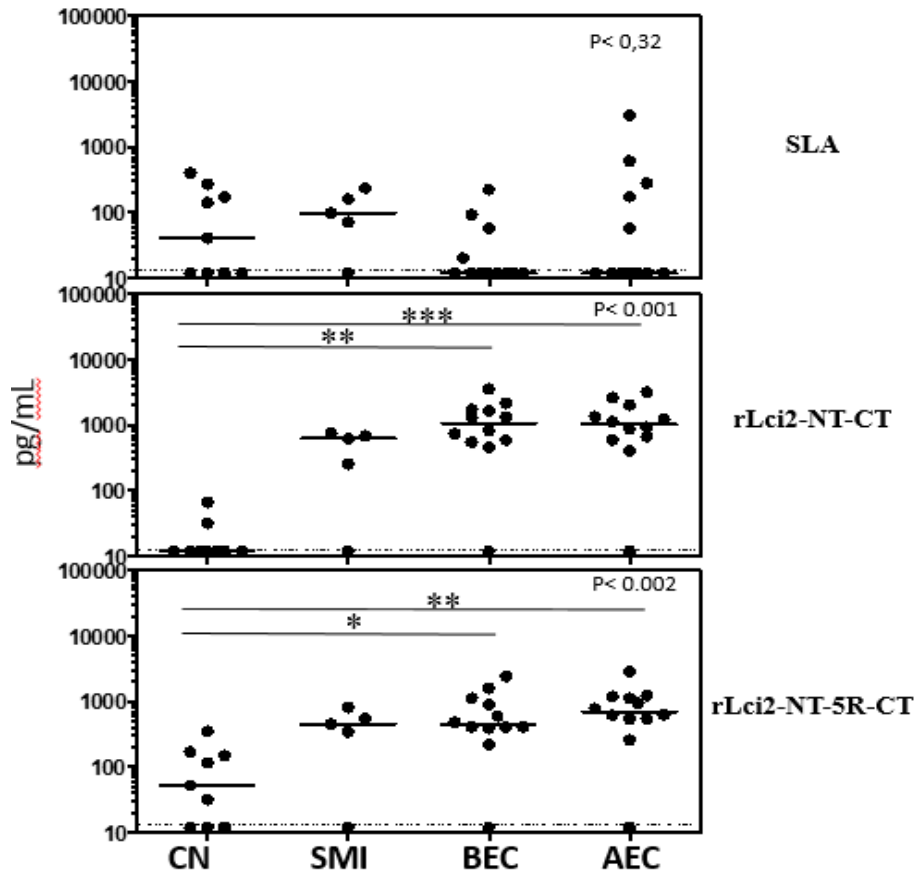


**Figura 3.** Avaliação da produção de IL-10 por células de sangue de cães do primeiro grupo de área endêmica para leishmaniose visceral Camaçari, Bahia. Sangue de cães de área endêmica e não endêmica para leishmaniose visceral canina foi coletado e estimulado na presença dos estímulos: salina, antígeno solúvel de *Leishmania infantum* a 20 µg/mL rLci2NT-CT a 10 µg/mL, rLci2-NT-5R-CT a 10 µg/mL, e concanavalina A a

5 µg/mL por 24h. O plasma foi coletado e o ensaio Milliplex foi realizado para dosar citocinas. CN: subgrupo de cães controle negativo; SMI: cães sem marcador de infecção; BEC: cães com baixo escore clínico para LV; AEC: cães com alto escore clínico para LV. 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 Kruskal Wallis, 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 \*\*\*  $p < 0,001$ .

Não houve diferença na concentração de IL-6 entre de amostras de sangue incubadas com SLA dos subgrupos de cães ( $p < 0,32$ ). A avaliação da concentração de IL-6 após a estimulação com o antígeno recombinante rLci2-NT-CT mostrou diferença na concentração de IL-6 entre amostras de sangue incubadas com rLci2-NT-CT dos subgrupos de cães ( $p < 0,001$ ). O pós-teste de Dunn mostrou diferença entre os subgrupos CN (0 pg/mL) e baixo escore (1.068 pg/mL,  $p < 0,01$ ) e entre os subgrupos CN e alto escore (1.029 pg/mL,  $p < 0,001$ ). Após a estimulação de amostras de células de sangue total com o antígeno rLci2-NT-5R-CT, a concentração de IL-6 mostrou que houve diferença na concentração de IL-6 entre amostras de sangue incubadas com rLci2-NT-5R-CT dos subgrupos de cães ( $p < 0,002$ ). O pós-teste de Dunn mostrou diferença entre os subgrupos CN (52,38 pg/mL) e com baixo escore clínico (446,1 pg/mL,  $p < 0,05$ ) e entre os subgrupos CN e alto escore (697 pg/mL,  $p < 0,01$ ), (Figura 4). Para avaliar a utilidade do mitógeno concanavalina A, comparou-se a mediana dos valores brutos comparados com a produção das citocinas sem estímulo. O mitógeno Con A, não induziu fortemente a produção inespecífica de

citocinas como era esperado, apesar disso, observou-se uma produção maior das citocinas IL-10 e TNF- $\alpha$  (Apêndice 6).

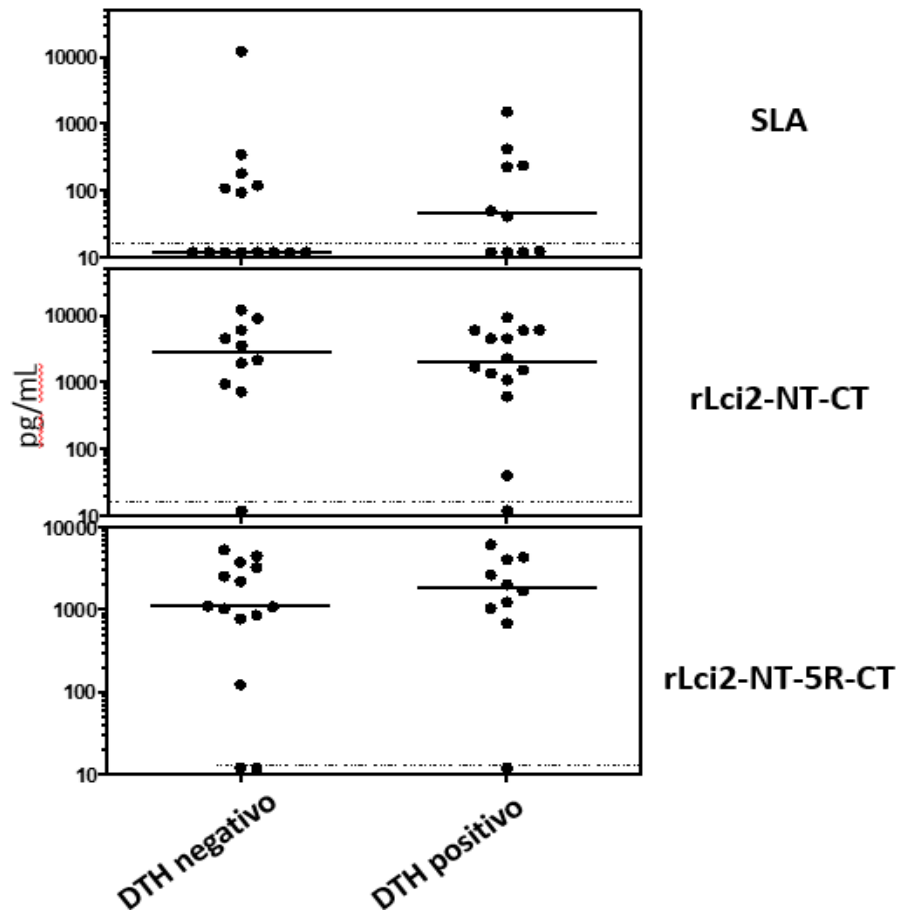


**Figura 4.** Avaliação da produção de IL-6 por células de sangue de cães do primeiro grupo de área endêmica para leishmaniose visceral Camaçari, Bahia. Sangue de cães de área endêmica e não endêmica para leishmaniose visceral canina foi coletado e cultivado por 24 h na presença de: salina, antígeno solúvel de *Leishmania infantum* (SLA) a 20  $\mu\text{g/mL}$ , rLci2NT-CT a 10  $\mu\text{g/mL}$ , rLci2-NT-5R-CT a 10  $\mu\text{g/mL}$ , e concanavalina A a 5  $\mu\text{g/mL}$ . O plasma foi coletado e o ensaio Milliplex foi realizado para dosar citocinas. Subgrupo de cães: controle negativo (CN), sem marcador de infecção (SMI), com baixo escore clínico para LV (BEC) e com alto escore clínico para LV (AEC). 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 Kruskal Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 5.2.2 Em cães com DTH negativo ou DTH positivo

Devido a problemas técnicos não foi possível avaliar a concentração de IFN- $\gamma$  nas amostras.

As avaliações da concentração de TNF- $\alpha$  em amostras de plasma quando sangue total foi cultivado na presença de SLA (Mann Whitney  $p < 0,101$ ), rLci2-NT-CT ( $p < 0,682$ ) e rLci2-NT-5R-CT ( $p < 0,5$ ), não mostraram diferenças estatísticas entre os cães DTH positivos comparados aos negativos para o teste (Figura 5).

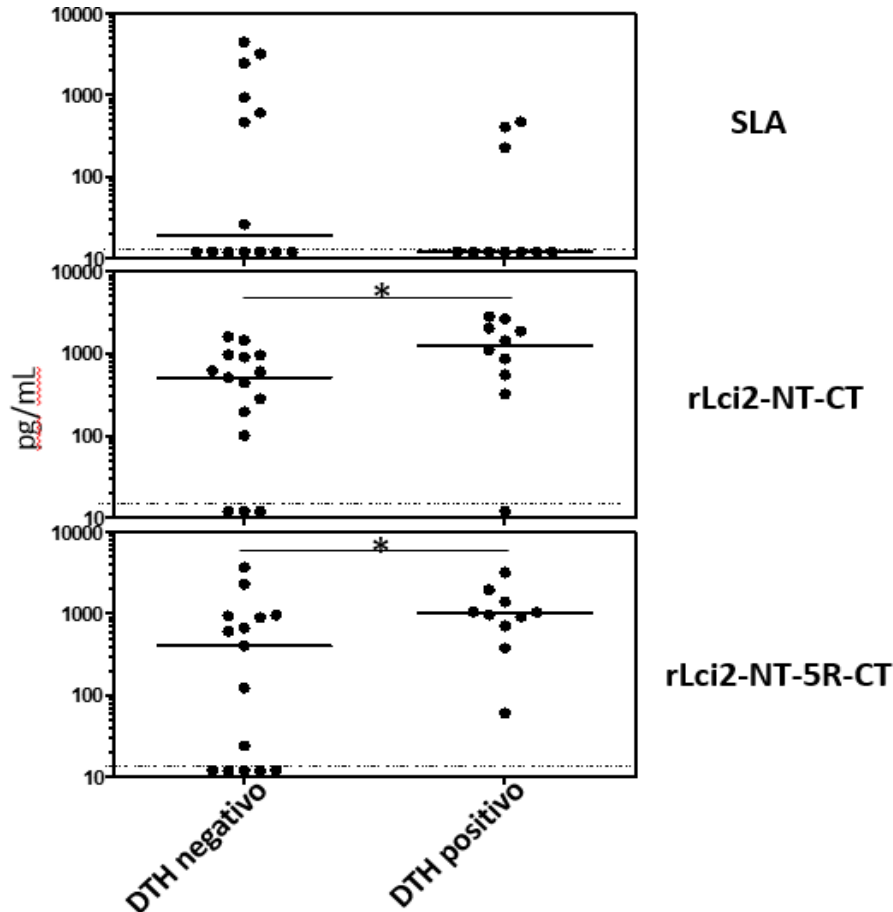


**Figura 5.** Avaliação da produção de TNF- $\alpha$  por células de sangue de cães do primeiro grupo de área endêmica para leishmaniose visceral Camaçari, Bahia, com teste de reação de hipersensibilidade tardia negativo ou positivo. Sangue de cães de área endêmica para leishmaniose visceral infectados por *Leishmania* (com resultado de cultura e/ou qPCR e/ou ELISA e/ou DTH) foi coletado e cultivado por 24 h na presença de: antígeno solúvel de *Leishmania infantum* (SLA) a 20  $\mu\text{g/mL}$ , rLci2NT-CT a 10  $\mu\text{g/mL}$  e rLci2-NT-5R-CT a 10  $\mu\text{g/mL}$ . O plasma foi coletado e o ensaio Milliplex foi realizado para dosar citocinas. Os pontos representam os valores individuais e as barras representam a mediana. A comparação dos valores de TNF- $\alpha$  entre os grupos foi realizada pelo teste Mann Whitney. Significância estatística estabelecida como:  $p < 0,05$ .

Os valores obtidos para a concentração de IL-2 foram muito baixos e próximos ao primeiro ponto da curva de calibração. Não houve diferença estatística entre os diversos grupos avaliados (Apêndice 8).

Não houve diferença estatística entre os valores de concentração de IL-10 dos subgrupos de cães com DTH<sup>-</sup> e DTH<sup>+</sup> quando amostras de sangue foram incubadas com SLA ( $p < 0,056$ ). Contudo, observou-se que o subgrupo de cães DTH<sup>-</sup> apresentou uma tendência a ter valores mais altos de IL-10. Os valores de concentração de IL-10 dos subgrupos de cães com DTH<sup>-</sup> e DTH<sup>+</sup> quando amostras de sangue foram incubadas com rLci2-NT-CT e rLci2-NT-5R-CT mostraram-se significativamente diferentes, sendo a mediana do subgrupo DTH<sup>+</sup>

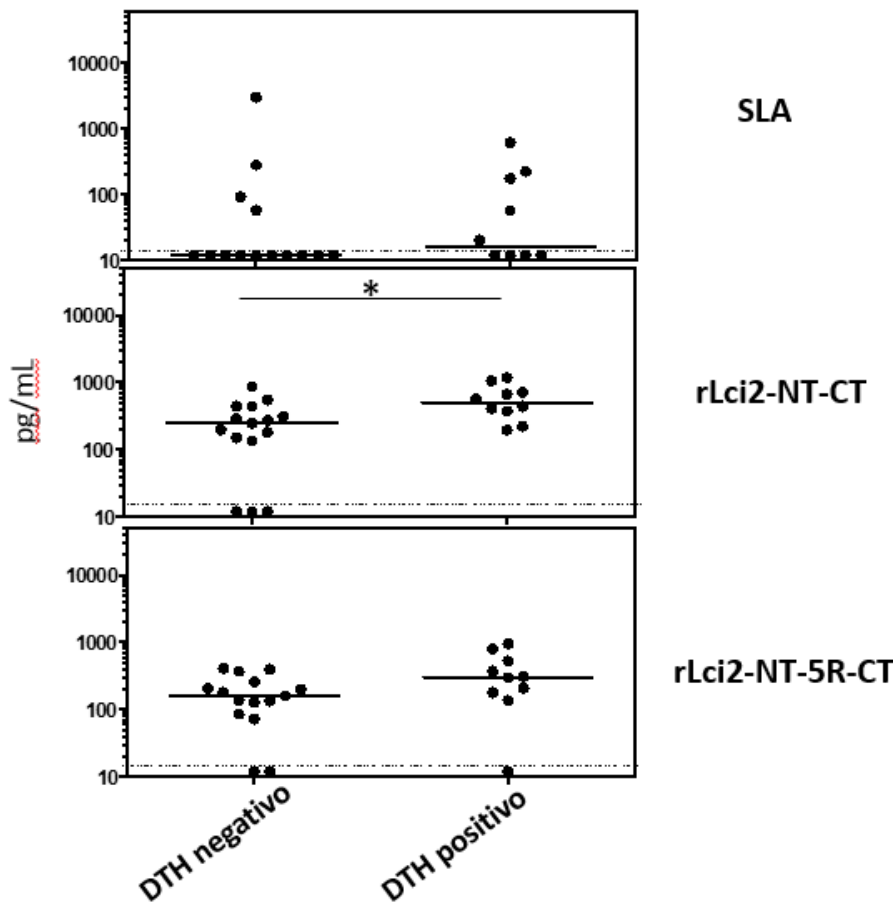
maior do que a do subgrupo DTH<sup>-</sup> primeiro (rLci2-NT-CT: 1.270 pg/mL vs 507 pg/mL,  $p < 0,045$ , rLci2-NT-5R-CT: 1.005 pg/mL vs 404 pg/mL,  $p < 0,038$ ) (Figura 6).



**Figura 6. Avaliação da produção de IL-10 por células de sangue de cães do primeiro grupo de área endêmica para leishmaniose visceral Camaçari, Bahia, com teste de reação de hipersensibilidade tardia negativo ou positivo.** Avaliação da produção de IL-10 por células de sangue de cães do primeiro grupo de área endêmica para leishmaniose visceral Camaçari, Bahia, com teste de reação de hipersensibilidade tardia negativo ou positivo. Sangue de cães de área endêmica para leishmaniose visceral infectados por *Leishmania* (com resultado de cultura e/ou qPCR e/ou ELISA e/ou DTH) foi coletado e cultivado por 24 h na presença de: antígeno solúvel de *Leishmania infantum* (SLA) a 20  $\mu\text{g/mL}$ , rLci2NT-CT a 10  $\mu\text{g/mL}$  e rLci2-NT-5R-CT a 10  $\mu\text{g/mL}$ . O plasma foi coletado e o ensaio Milliplex foi realizado para dosar citocinas. Os pontos representam os valores individuais e as barras representam a mediana. A comparação dos valores de IL-10 entre os grupos foi realizada pelo teste Mann Whitney. Significância estatística estabelecida como:  $p < 0,05$ .

A concentração de IL-6 não foi significativamente diferente entre os subgrupos de cães com DTH<sup>-</sup> e DTH<sup>+</sup> quando amostras de sangue foram cultivados na presença de SLA ( $p < 0,925$ ) ou com rLci2-NT-5R-CT ( $p < 0,071$ ). No entanto, os valores da concentração de IL-6 foram significativamente maiores no subgrupo com DTH<sup>+</sup>, em comparação com DTH<sup>-</sup>, quando

amostras de sangue foram cultivados na presença de rLci2-NT-CT (DTH+ 506 pg/mL vs DTH- 406 pg/mL,  $p < 0,016$ ).

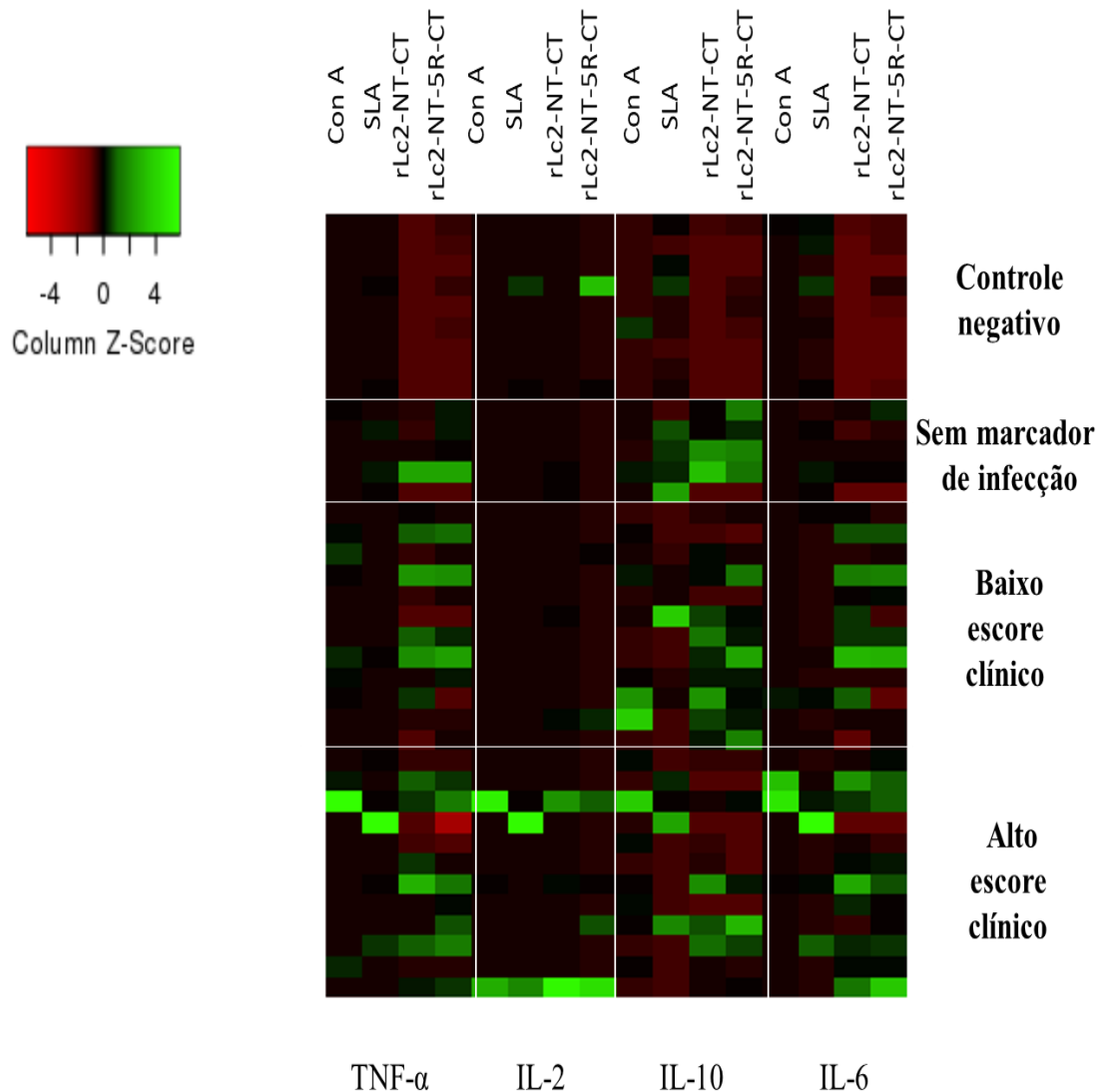


**Figura 7.** Avaliação da produção de IL-6 por células de sangue de cães do primeiro grupo de área endêmica para leishmaniose visceral Camaçari, Bahia, com teste de reação de hipersensibilidade tardia negativo ou positivo. Avaliação da produção de IL-10 por células de sangue de cães do primeiro grupo de área endêmica para leishmaniose visceral Camaçari, Bahia, com teste de reação de hipersensibilidade tardia negativo ou positivo. Sangue de cães de área endêmica para leishmaniose visceral infectados por *Leishmania* (com resultado de cultura e/ou qPCR e/ou ELISA e/ou DTH) foi coletado e cultivado por 24 h na presença de: antígeno solúvel de *Leishmania infantum* (SLA) a 20  $\mu\text{g/mL}$ , rLci2NT-CT a 10  $\mu\text{g/mL}$  e rLci2-NT-5R-CT a 10  $\mu\text{g/mL}$ . O plasma foi coletado e o ensaio Milliplex foi realizado para dosar citocinas. Os pontos representam os valores individuais e as barras representam a mediana. A comparação dos valores de IL-6 entre os grupos foi realizada pelo teste Mann Whitney. Significância estatística estabelecida como:  $p < 0,05$ .

### 5.2.3 Análise por mapa de calor

A análise dos resultados do QuantiFERON modificado pelo gráfico de calor indica que a avaliação da concentração IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  pode ser utilizada para a detecção da infecção por *Leishmania* em cães. Os antígenos recombinantes rLci2-NT-CT e rLci2-NT-5R-CT apresentaram maior potencial para identificação a infecção quando comparados a SLA

mensuração de IL-10 parece distinguir entre os subgrupos de área endêmica sem marcador de infecção e com marcador de infecção (Figura 8).



**Figura 8. Avaliação da concentração TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-6 em ensaio QuantiFERON modificado em cães.** Sangue de cães de área endêmica e não endêmica para leishmaniose visceral canina foi coletado e cultivado por 24 h na presença de: salina, antígeno solúvel de *Leishmania infantum* (SLA) a 20  $\mu\text{g/mL}$  rLc2NT-CT a 10  $\mu\text{g/mL}$ , rLc2-NT-5R-CT a 10  $\mu\text{g/mL}$ , e concanavalina A a 5  $\mu\text{g/mL}$ . O plasma foi coletado e o ensaio Milliplex foi realizado para dosar citocinas. Os valores para cada cão foram normalizados subtraindo o valor encontrado por salina do estímulo para cada cão. Subgrupo de cães: controle negativo (CN), sem marcador de infecção (SMI), com baixo escore clínico para LV (BEC) e com alto escore clínico para LV (AEC). Cada retângulo de tonalidade de cor que varia do vermelho, passando pelo preto, até verde representa resultado de um cão.



### 5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS CÃES DO SEGUNDO GRUPO DO ESTUDO

Esse grupo foi composto por 21 fêmeas e 15 machos, sendo 35 cães mestiços um cão de raça pura. Os cães selecionados para este trabalho foram acompanhados a cada 3 meses, por um período de dois anos, Dra. Manuela Solcà e a infecção foi identificada por avaliação sorológica e/ou parasitológica no primeiro ano do acompanhamento. O estudo da Dra. Manuela Solcà visava a descrição da história natural da infecção canina.

Os cães foram classificados em dois grupos: a) com baixo escore clínico (escore <4) e b) com alto escore clínico (escore  $\geq$ 4) (Apêndice 12).

#### **Subgrupos de cães:**

##### *5.3.1 Controle negativo*

Os cães utilizados como controles negativos foram os mesmos cães usados no primeiro grupo.

##### *5.3.2 Com baixo escore clínico*

O subgrupo de cães com baixo escore clínico foi constituído por 16 animais, sendo oito machos e oito fêmeas, 15 mestiços e um de raça pura (Figura 9).

A cultura de material de aspirado do baço, cuja coleta foi realizada no dia da obtenção da amostra de sangue usada no ensaio QuantiFERON modificado, revelou *Leishmania* em dois dos 16 cães. Na última avaliação por PCR em tempo real, DNA de *Leishmania* não foi detectado no sangue periférico de qualquer dos animais e foi detectado em aspirado esplênico de 8 dos 16 cães.

Avaliação de anticorpos de anti-*Leishmania* mostrou a recíproca dos títulos variando entre 1.828 e 11.198, sendo a mediana 4.911.

No teste DTH, observou-se diâmetro médio de induração que variaram entre 0 e 12 mm. Notou-se que oito de 15 cães apresentaram diâmetro médio de induração igual ou superior a 5 mm (resultado positivos). Infelizmente, em um dos animais foi possível realizar a leitura do teste (Tabela 2).

### 5.3.3 Com alto escore clínico

O subgrupo de cães com alto escore clínico foi formado por cinco animais machos e seis fêmeas, sendo todos mestiços. Os cães desse subgrupo apresentaram (Figura 9).

Na última avaliação por qPCR, o DNA do parasito foi detectado em cinco dos 11 cães.

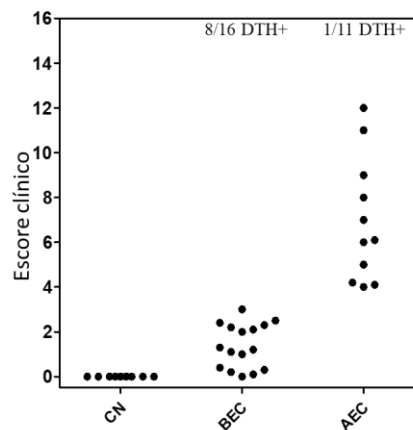
A avaliação de anticorpos anti-*Leishmania* mostrou títulos médios que variaram entre 890 até 9.895, sendo mediana 1.893. Houve diferença estatisticamente significativa entre a mediana dos subgrupos de cães com baixo escore clínico (resistentes) e com alto escore clínico (susceptíveis) a LV ( $p < 0,05$ ).

O teste DTH foi considerado positivo em um de 9 animais. Infelizmente, não foi possível realizar a leitura do teste em dois cães (Tabela 2).

**Tabela 2. Caracterização do segundo grupo de cães de área endêmica para leishmaniose visceral Camaçari, Bahia.**

Dados		Controle negativo	Com baixo escore clínico	Com alto escore clínico
<b>Sexo</b>	M	2	8	5
	F	7	8	6
<b>Raça pura</b>		0	1	0
<b>Última avaliação escore clínico (mediana)</b>		0	1	7
<b>Deteção de <i>Leishmania</i></b>	Média PCRs	NF	1,8	2,9
	Última PCR (-/+)	9/0	8/8	3/8
	Média culturas	NF	0,6	2
	Última cultura (-/+)	NF	14/2	11/0
<b>Anticorpos anti-<i>Leishmania</i></b>	Positividade (-/+)	5/0	5/11	0/11
	Título médio (mediana)	1.612	4.911*	1.893
<b>DTH</b>	Média (em mm)	NF	3,3	0,6
	(-/+)	NF	14/8	8/1

Sexo: Fêmea (F) e Macho (M), escore clínico: Os critérios utilizados para identificar como infectados por *Leishmania infantum* foram, cultura, ou qPCR, ou ELISA. 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. NF: não foi realizada a avaliação; (-/+): (negativo/positivo).



**Figura 9. Escores clínicos de cães do segundo grupo.** Os grupos controle negativo (CN), com baixo escore clínico (BEC) e alto escore clínico (AEC) para LV foram definidos pela origem (de área não endêmica ou de área endêmica para LV) e resultado de cultura e/ou qPCR para detecção de *Leishmania* e pela resposta imune específica humoral (avaliada por ELISA). Os cães do grupo CN foram provenientes de área não endêmica e apresentavam resultado de qPCR, ELISA negativos. Os cães dos grupos BEC e AEC foram provenientes de área endêmica para LV. DTH +: resultado de teste de hipersensibilidade tardia positivo. Os grupos BEC e AEC revelavam resultado positivo em pelo menos um dos ensaios: cultura, qPCR, ELISA, sendo que os grupos BEC e AEC exibiam escore  $<4$  ou  $\geq 4$ , respectivamente. Os escores clínicos foram mensurados conforme descrição em Solcá, 2016. Cada símbolo representa o escore clínico de um cão.

## 5.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IFN- $\gamma$ , TNF-A, IL-2, IL-10 E IL-6 PELO ENSAIO QUANTIFERON MODIFICADO

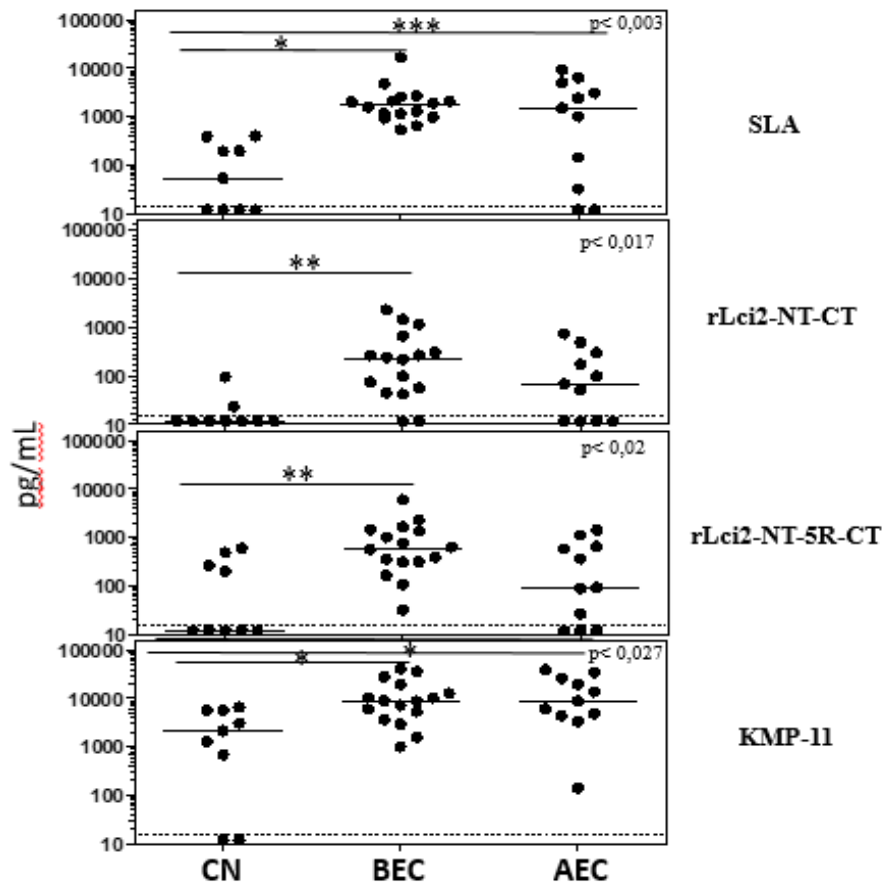
### 5.4.1 Por subgrupo

Infelizmente, a citocina IFN- $\gamma$  apresentou problemas técnicos. As curvas de calibração mostraram baixa sensibilidade de detecção de IFN- $\gamma$  em quatro lotes diferentes de reagentes.

A avaliação da concentração de TNF- $\alpha$  após a estimulação com o antígeno SLA mostrou diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos de cães (Kruskall-Wallis  $p < 0,003$ ). O pós-teste de Dunn mostrou que os subgrupos com baixo escore clínico (mediana 1.756 pg/mL,  $p < 0,001$ ) e com alto escore clínico (1.513 pg/mL,  $p < 0,05$ ) apresentaram valores superiores ao subgrupo controle negativo (53,46 pg/mL). Após a estimulação de células de sangue total com o antígeno rLci2-NT-CT, houve diferença entre os subgrupos de cães

( $p < 0,017$ ). O pós-teste de Dunn mostrou diferença entre o subgrupo de cães com baixo escore clínico (228,7 pg/mL,  $p < 0,01$ ) e o grupo CN (0 pg/mL). A avaliação da concentração de TNF- $\alpha$  após a estimulação com o antígeno rLci2-NT-5R-CT mostrou diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos de cães ( $p < 0,02$ ). O pós-teste de Dunn mostrou que o subgrupo com baixo escore clínico (601 pg/mL,  $p < 0,01$ ) apresentou o valor de mediana superior ao controle negativo CN (0 pg/mL).

A avaliação da concentração de TNF- $\alpha$  após a estimulação com a KMP-11 mostrou diferença entre os subgrupos de cães ( $p < 0,027$ ). O pós-teste de Dunn mostrou diferença entre o subgrupo com baixo escore clínico (8.967 pg/mL,  $p < 0,05$ ) e o grupo CN (2.160 pg/mL) e o subgrupo com alto escore clínico (8.838 pg/mL,  $p < 0,05$ ) e o grupo CN (Figura 10).

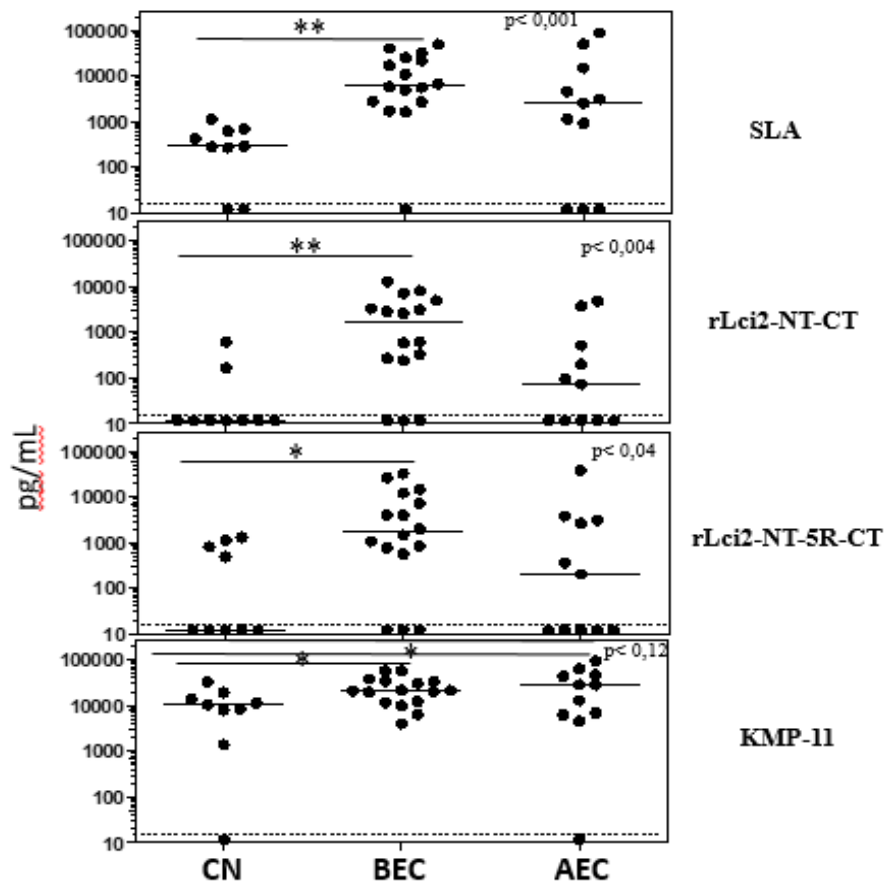


**Figura 10.** Avaliação da produção de TNF- $\alpha$  por células de sangue de cães do segundo grupo de área endêmica para leishmaniose visceral Camaçari, Bahia. Sangue de cães de área endêmica e não endêmica para leishmaniose visceral canina foi coletado e estimulado na presença dos estímulos: salina, antígeno solúvel de *Leishmania infantum* a 20  $\mu\text{g/mL}$  rLci2NT-CT a 10  $\mu\text{g/mL}$ , rLci2-NT-5R-CT a 10  $\mu\text{g/mL}$ , KMP-11 a 10  $\mu\text{g/mL}$  e concanavalina A a 5  $\mu\text{g/mL}$  por 24h. O plasma foi coletado e o ensaio Milliplex foi realizado para dosar citocinas. CN: subgrupo de cães controle negativo; BEC: cães com baixo escore clínico para LV; AEC: cães com alto escore clínico para LV. 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 Kruskal Wallis, 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 \*\*\*  $p < 0,001$ .

Os valores obtidos para a concentração de IL-2 foram muito baixos e próximos ao primeiro ponto da curva de calibração. Não houve diferença estatística entre os diversos grupos avaliados (Apêndice 7 e 9).

A avaliação da concentração de IL-10 após a estimulação com o antígeno SLA mostrou diferença entre os subgrupos de cães ( $p < 0,001$ ). O pós-teste de Dunn mostrou diferença entre o subgrupo com baixo escore clínico (6.258 pg/mL,  $p < 0,01$ ) e o grupo CN (287,3 pg/mL). Houve diferença na concentração de IL-10 entre de amostras de sangue incubadas com rLci2-NT-CT dos subgrupos de cães ( $p < 0,004$ ). O pós-teste de Dunn mostrou diferença entre o subgrupo com baixo escore clínico (1.602 pg/mL,  $p < 0,05$ ) o grupo CN (0 pg/mL) e após a estimulação de amostras de células de sangue total com o antígeno rLci2-NT-5R-CT houve diferença na concentração de IL-10 entre de amostras de sangue incubadas dos subgrupos de cães ( $p < 0,04$ ). O pós-teste de Dunn mostrou diferença entre o subgrupo com baixo escore clínico (1.741 pg/mL,  $p < 0,05$ ) e o grupo CN (0 pg/mL). Não houve diferença na concentração de IL-10 entre de amostras de sangue incubadas com KMP-11 dos subgrupos de cães ( $p < 0,12$ ).

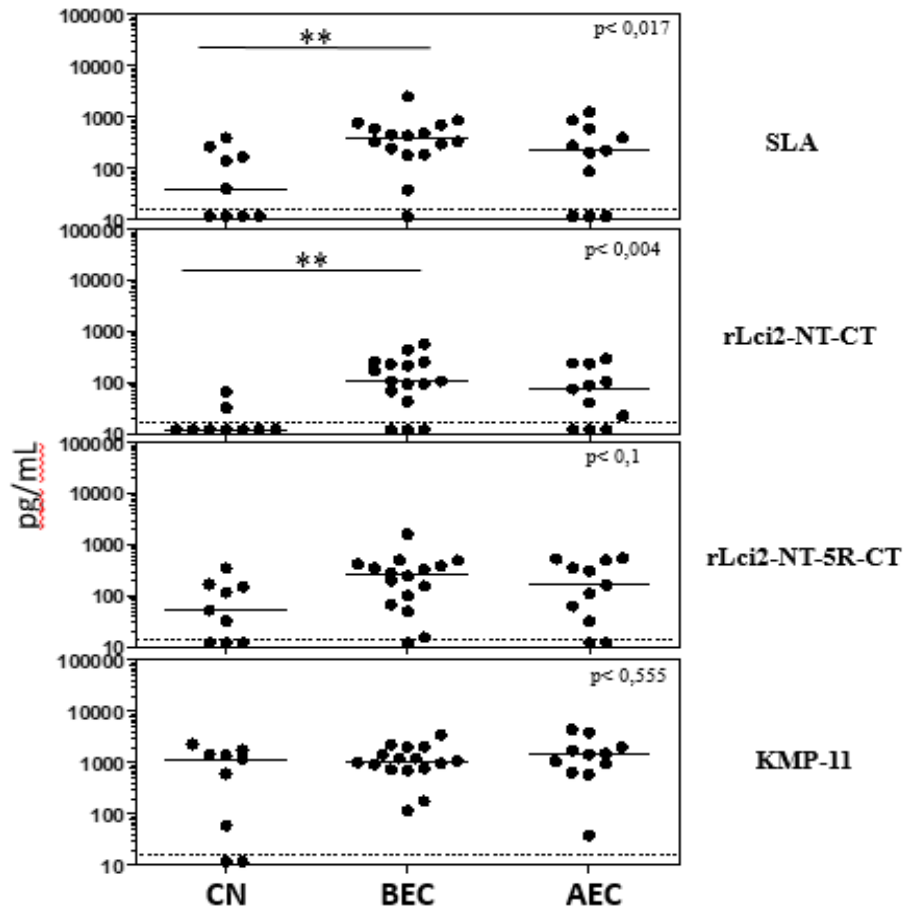


**Figura 11.** Avaliação da produção de IL-10 por células de sangue de cães do segundo grupo de área endêmica para leishmaniose visceral Camaçari, Bahia. Sangue de cães de área endêmica e não endêmica para leishmaniose visceral canina foi coletado e estimulado na presença dos estímulos: salina, antígeno solúvel de *Leishmania infantum* a 20 µg/mL rLci2NT-CT a 10 µg/mL, rLci2-NT-5R-CT a 10 µg/mL, KMP-11 a 10 µg/mL e concanavalina A a 5 µg/mL por 24h. O plasma foi coletado e o ensaio Milliplex foi realizado para dosar citocinas. CN: subgrupo de cães controle negativo; BEC: cães com baixo escore clínico para LV; AEC: cães com alto escore clínico para LV. 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 Kruskal Wallis, 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 \*\*\*  $p < 0,001$ .

A avaliação da concentração de IL-6 após a estimulação com o antígeno SLA mostrou diferença entre os subgrupos de cães ( $p < 0,017$ ). O pós-teste de Dunn que o subgrupo com baixo escore clínico (392,2 pg/mL,  $p < 0,05$ ) apresentou valor de mediana superior ao grupo CN (40,86 pg/mL). Houve diferença na concentração de IL-6 entre amostras de sangue incubadas com rLci2-NT-CT dos subgrupos de cães ( $p < 0,004$ ). O pós-teste de Dunn mostrou diferença entre o subgrupo com baixo escore clínico (106,2 pg/mL) e o grupo CN (0 pg/mL,  $p < 0,01$ ). Não houve diferença na concentração de IL-6 entre de amostras de sangue incubadas com rLci2-NT-5R-CT ( $p < 0,1$ ) e KMP-11 ( $p < 0,555$ ) dos subgrupos de cães.

As avaliações com SLA e rLci2-NT-CT permitiram a detecção dos cães infectados por *Leishmania*, além disso, mostraram diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos

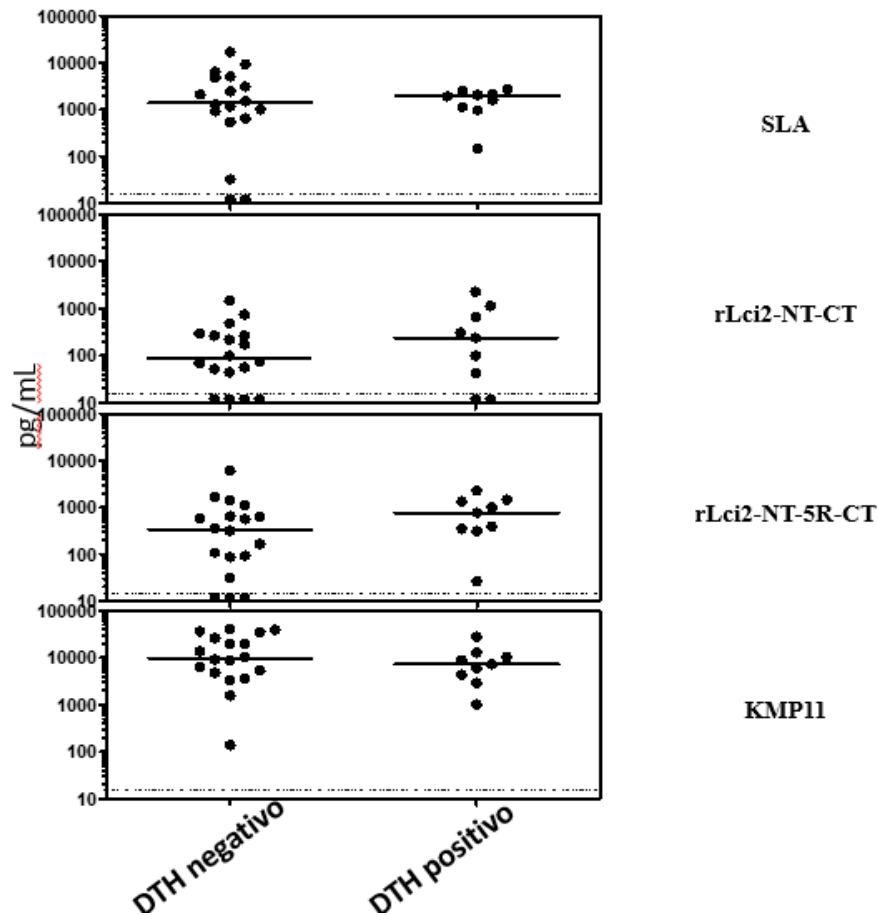
de cães com baixo escore clínico e o grupo CN, porém, não houve diferença entre os subgrupos de cães infectados (Figura 12).



**Figura 12. Avaliação da produção de IL-6 por células de sangue de cães do primeiro grupo de área endêmica para leishmaniose visceral Camaçari, Bahia.** 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 20 µg/mL rLci2NT-CT a 10 µg/mL, rLci2-NT-5R-CT a 10 µg/mL, KMP-11 a 10 µg/mL e concanavalina A a 5 µg/mL por 24h. O plasma foi coletado e o ensaio Milliplex foi realizado para dosar citocinas. CN: subgrupo de cães controle negativo; BEC: cães com baixo escore clínico para LV; AEC: cães com alto escore clínico para LV. 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 Kruskal Wallis, 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 \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 5.4.2 Em cães com DTH negativo ou DTH positivo

A comparação das concentrações de TNF- $\alpha$  em amostras de sangue de cães com resultados de DTH positivo ou negativo incubadas com SLA (Mann Whitney  $p < 0,98$ ), rLci2-NT-CT ( $p < 0,453$ ), rLci2-NT-5R-CT ( $p < 0,208$ ) e KMP-11 ( $p < 0,316$ ) não revelou diferenças estatisticamente significantes.

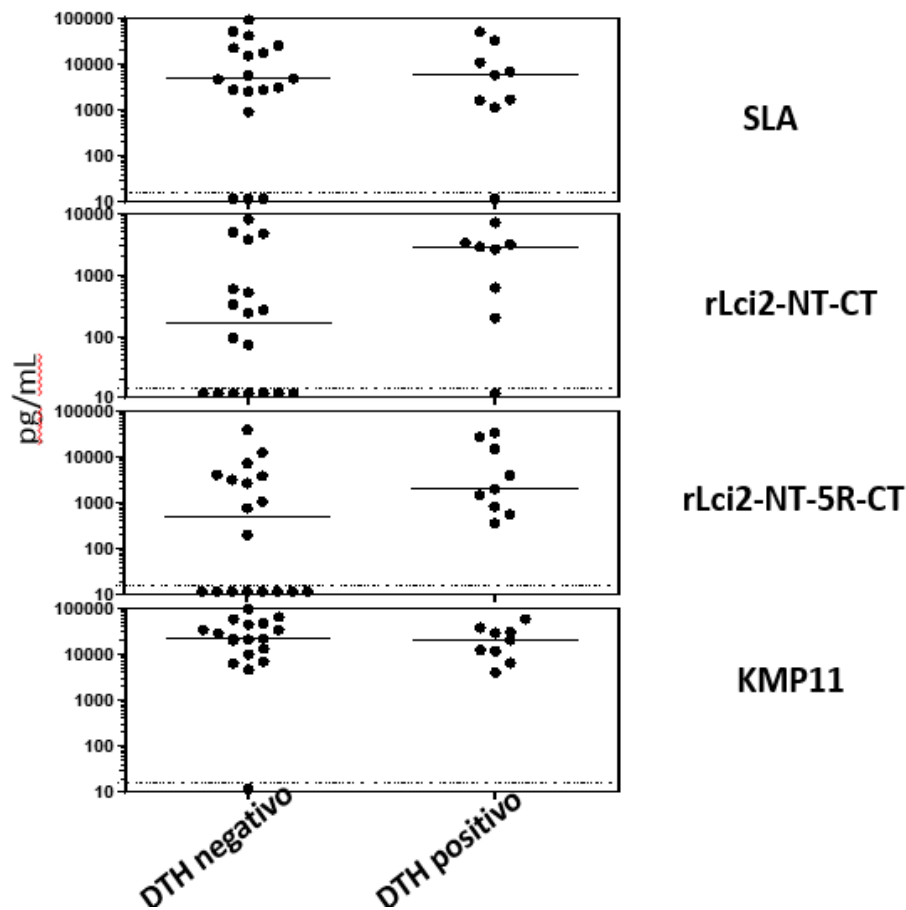


**Figura 13. Avaliação da produção de TNF- $\alpha$  por células de sangue de cães do primeiro grupo de área endêmica para leishmaniose visceral Camaçari, Bahia, com teste de reação de hipersensibilidade tardia negativo ou positivo.** Sangue de cães de área endêmica para leishmaniose visceral infectados por *Leishmania* (com resultado de cultura e/ou qPCR e/ou ELISA) foi coletado e cultivado por 24 h na presença de: antígeno solúvel de *Leishmania infantum* (SLA) a 20  $\mu\text{g/mL}$  rLci2NT-CT a 10  $\mu\text{g/mL}$ , rLci2-NT-5R-CT a 10  $\mu\text{g/mL}$  e KMP-11 a 10  $\mu\text{g/mL}$ . O plasma foi coletado e o ensaio Milliplex foi realizado para dosar citocinas. Os pontos representam os valores individuais e as barras representam a mediana. A comparação dos valores de TNF- $\alpha$  entre os grupos foi realizada pelo teste Mann Whitney. Significância estatística estabelecida como:  $p < 0,05$ .

Os valores obtidos para a concentração de IL-2 foram muito baixos e próximos ao primeiro ponto da curva de calibração. Não houve diferença estatística entre os diversos grupos avaliados (Apêndice 8). (Apêndice 7).

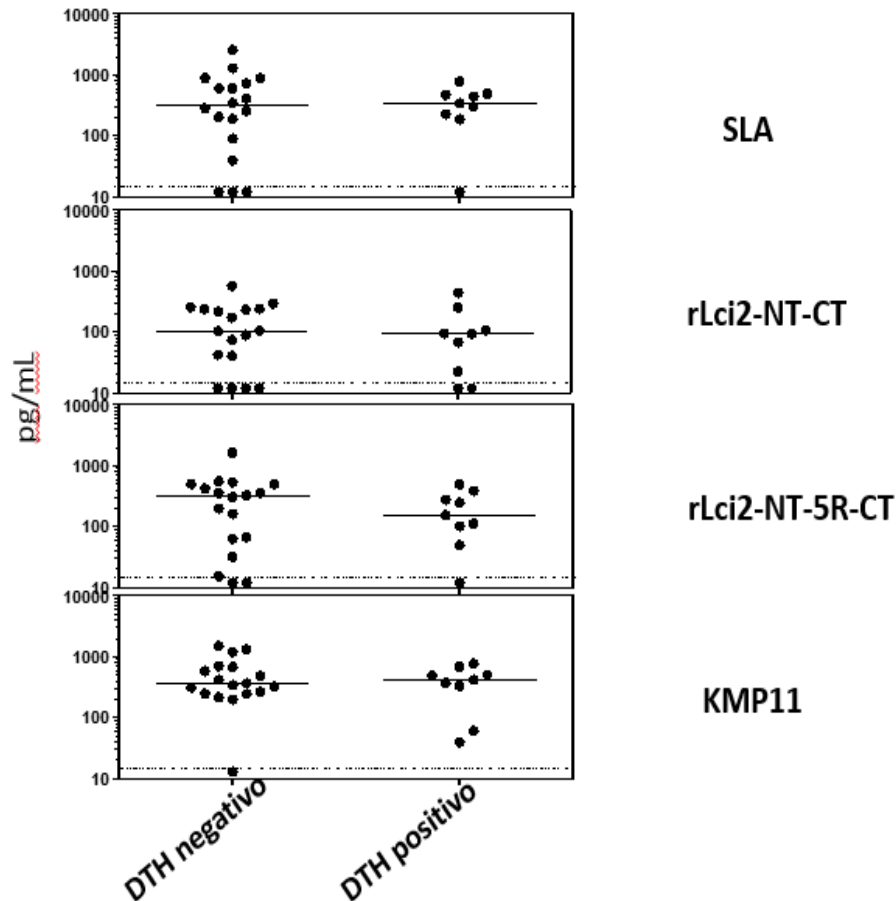


Não houve diferença estatística entre os valores de concentração de IL-10 dos subgrupos de cães com DTH<sup>-</sup> e DTH<sup>+</sup> quando amostras de sangue foram incubadas com SLA ( $p < 0,877$ ). A comparação das concentrações de IL-10 frente a estimulação com os antígenos rLci2-NT-CT ou rLci2-NT-5R-CT mostrou uma tendência do subgrupo de cães com resultado do teste de DTH positivo (mediana= 943,5 pg/mL,  $p < 0,061$  ou 672 pg/mL,  $p < 0,085$  respectivamente) apresentar valores de mediana superiores ao subgrupo de cães com resultado de DTH negativo (55,67 pg/mL ou 161,6 pg/mL). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de concentração de IL-10 dos subgrupos de cães com DTH<sup>-</sup> e DTH<sup>+</sup> quando amostras de sangue foram incubadas com KMP-11 ( $p < 0,877$ ).



**Figura 14.** Avaliação da produção de IL-10 por células de sangue de cães do primeiro grupo de área endêmica para leishmaniose visceral Camaçari, Bahia, com teste de reação de hipersensibilidade tardia negativo ou positivo. Sangue de cães de área endêmica para leishmaniose visceral infectados por *Leishmania* (com resultado de cultura e/ou qPCR e/ou ELISA) foi coletado e cultivado por 24 h na presença de: antígeno solúvel de *Leishmania infantum* (SLA) a 20 µg/mL rLci2NT-CT a 10 µg/mL, rLci2-NT-5R-CT a 10 µg/mL e KMP-11 a 10 µg/mL. O plasma foi coletado e o ensaio Milliplex foi realizado para dosar citocinas. Os pontos representam os valores individuais e as barras representam a mediana. A comparação dos valores de IL-10 entre os grupos foi realizada pelo teste Mann Whitney. Significância estatística estabelecida como:  $p < 0,05$ .

Não houve diferença estatisticamente significativa na concentração de IL-6 entre amostras de sangue incubadas com SLA ( $p < 0,918$ ), rLci2-NT-CT ( $p < 0,586$ ), rLci2-NT-5R-CT ( $p < 0,424$ ) e KMP-11 ( $p < 0,898$ ) do subgrupo de cães com resultado positivo para o teste DTH comparados com os cães com resultado negativo.

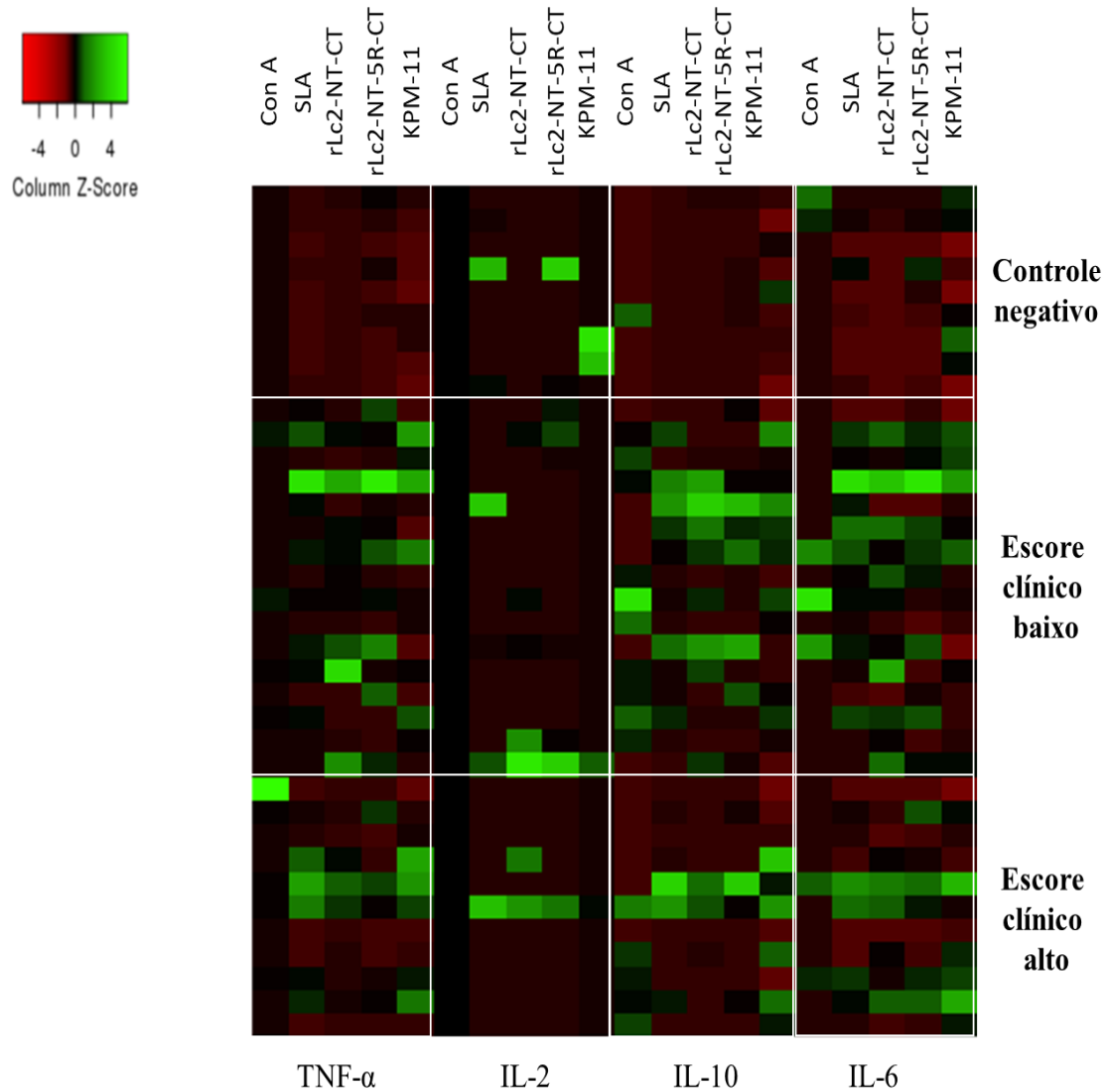


**Figura 15.** Avaliação da produção de IL-6 por células de sangue de cães do primeiro grupo de área endêmica para leishmaniose visceral Camaçari, Bahia, com teste de reação de hipersensibilidade tardia negativo ou positivo. Sangue de cães de área endêmica para leishmaniose visceral infectados por *Leishmania* (com resultado de cultura e/ou qPCR e/ou ELISA) foi coletado e cultivado por 24 h na presença de: antígeno solúvel de *Leishmania infantum* (SLA) a 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , rLci2NT-CT a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , rLci2-NT-5R-CT a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e KMP-11 a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . O plasma foi coletado e o ensaio Milliplex foi realizado para dosar citocinas. Os pontos representam os valores individuais e as barras representam a mediana. A comparação dos valores de IL-6 entre os grupos foi realizada pelo teste Mann Whitney. Significância estatística estabelecida como:  $p < 0,05$ .

### 5.5 AVALIAÇÃO POR MAPA DE CALOR (HEAT MAP)

A análise dos resultados do ensaio QuantiFERON modificado pelo gráfico de calor indica que a concentração das citocinas IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  pode ser utilizada para a detecção da infecção por *Leishmania* em cães de área endêmica para leishmaniose visceral. Os

antígenos recombinantes rLci2-NT-CT e rLci2-NT-5R-CT apresentaram maior potencial para identificação a infecção quando comparados aos antígenos SLA e KMP-11 (Figura 16).



**Figura 16. Avaliação da concentração TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-6 em ensaio QuantiFERON modificado em cães.** Sangue de cães de área endêmica e não endêmica para leishmaniose visceral canina foi coletado e cultivado por 24 h na presença de: salina, antígeno solúvel de *Leishmania infantum* (SLA) a 20  $\mu$ g/mL, rLci2NT-CT a 10  $\mu$ g/mL, rLci2-NT-5R-CT a 10  $\mu$ g/mL, KMP-11 a 10  $\mu$ g/mL e concanavalina A a 5  $\mu$ g/mL. O plasma foi coletado e o ensaio Milliplex foi realizado para dosar citocinas. Os valores para cada cão foram normalizados subtraindo o valor encontrado por salina do estímulo para cada cão. Subgrupo de cães: controle negativo (CN), com baixo escore clínico para LV (BEC) e com alto escore clínico para LV (AEC). Cada retângulo de tonalidade de cor que varia do vermelho, passando pelo preto, até verde representa resultado de um cão.

## 6 DISCUSSÃO

No presente trabalho os cães de área endêmica para leishmaniose visceral foram classificados como cães sem marcador de infecção, cães com baixo escore clínico e cães com alto escore clínico para LV, no primeiro grupo. Já os cães do segundo grupo foram classificados como cães com baixo escore clínico, e cães com alto escore clínico. Para a classificação, parâmetros clínicos, parasitológicos e imunológicos foram avaliados em ambos os grupos. Cães saudáveis de área não endêmica para LV foram utilizados como controle negativo em ambos os grupos.

Com os cães devidamente classificados foi possível avaliar a produção de citocinas por células de sangue total estimulado por antígenos solúveis de *Leishmania infantum* na concentração de 20 µg/mL, rLci2-NT-CT, rLci2-NT-5R-CT e KMP-11 ambos a 10 µg/mL e concanavalina a 5 µg/mL (sangue diluído de 1:2), esses antígenos foram produzidos (exceto KMP-11) e testados no ensaio QuantiFERON modificado em todos os grupos de cães de área endêmica para LV (KMP-11 foi testado nos cães do segundo grupo), e, por conseguinte avaliada a utilidade desse ensaio na definição do perfil de citocinas em cada grupo. Estudos foram realizados para avaliar a produção de citocinas por células de sangue total em pacientes com leishmaniose visceral (TURGAY, 2010; GIDWANI *et al.*, 2011; CARRILLO *et al.*, 2015; IBARRA-MENESES *et al.*, 2016) e em cães de áreas endêmicas para LV (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2016; MARTÍNEZ-ORELLANA *et al.*, 2017; ZIBRI *et al.*, 2017), usando um ensaio previamente desenvolvido para diagnóstico de tuberculose (QuantiFERON).

Na avaliação com o mitógeno concanavalina A, esperava-se que houvesse uma alta produção inespecífica de citocinas em todos os subgrupos, inclusive nos cães de controle negativo, no entanto, a produção das citocinas avaliadas frente a esse mitógeno foi menor do que a produção por células de sangue estimulado com antígenos de *Leishmania*. Houve uma pequena produção somente de IL-10 e TNF- $\alpha$ . DE LUNA *et al.* (1999), avaliaram três mitógenos diferentes em cães saudáveis e cães com LV, entre eles o Con A, e observaram que a imunossupressão de uma resposta linfoproliferativa pode facilmente ocorrer como consequência do estabelecimento da infecção por *Leishmania*. Curiosamente, por razões desconhecidas, não houve grande produção das citocinas avaliadas frente ao Con A nos cães do grupo controle negativo de área não endêmica, mas, assim como nos cães infectados por *Leishmania*, houve uma pequena produção de IL-10 e TNF- $\alpha$ . Outra explicação para esse

resultado pode ser a cinética, talvez a incubação de 24 horas não seja suficiente para o mitógeno Con A induzir as células de sangue total a produzirem citocinas.

Quanto a produção de TNF- $\alpha$ , em ambos os grupos, o ensaio permitiu a identificação da infecção por *Leishmania*, principalmente com os antígenos rLci2-NT-CT e rLci2-NT-5R-CT, esses talvez sejam úteis na avaliação dessa citocina, em conjunto para uma melhor identificação de infecção. No segundo grupo do estudo, os cães do subgrupo com baixo escore clínico apresentaram níveis mais elevados de TNF- $\alpha$  quando comparados ao controle negativo. Em estudos de PINELLI e de MENESES-SOUZA, cães assintomáticos apresentaram níveis mais altos de TNF- $\alpha$  quando comparados aos cães sintomáticos, oligossintomáticos e cães controle (PINELLI *et al.*, 1994; MENESES-SOUZA *et al.*, 2011). No entanto em estudo realizado por DE LIMA *et al.* (2007), foram detectados níveis de TNF- $\alpha$ , mas, não houve diferença significativa na produção dessa citocina no soro de cães saudáveis e infectados (DE LIMA *et al.*, 2007).

A avaliação de IL-2 nesse ensaio não apresentou utilidade, em todos os subgrupos avaliados de ambos os grupos, uma vez que, apresentaram valores muito baixos e próximos do primeiro ponto da curva de calibração (12,2 pg/mL). GROOTE *et al.* (1992), em estudo de comparação de produção de citocinas por PBMC e por células de sangue total de seres humanos, sugeriram que pode haver uma baixa regulação de IL-2 pelos componentes de sangue total. Talvez seja necessário realizar uma avaliação cinética da produção dessa citocina em células de sangue total canino, para descobrir qual o melhor tempo de incubação. No mesmo estudo de GROOTE *et al.* (1992) foi observado ocorrer um aumento gradativo na produção dessa citocina até 72 horas em sangue total de humanos.

A avaliação da produção de IL-10 em ambos os grupos avaliados mostrou uma tendência, embora paradoxal, ao subgrupo de cães com baixo escore clínico para LV terem uma produção mais elevada dessa citocina frente à estimulação dos antígenos recombinantes rLci2-NT-CT e rLci2-NT-5R-CT em amostras de sangue total, o mesmo foi observado com os cães com DTH positivo comparados aos cães com o teste negativo, isso sugere que esses cães tenham desenvolvido uma regulação da resposta inflamatória. Esse resultado corrobora com o estudo de SOLANO-GALLEGO *et al.* (2016), cujo a IL-10 pode contrabalançar o efeito pró-inflamatório, levando a uma regulação adequada das respostas imunes. Além disso, alguns dos dados encontrados na literatura sugerem que essa citocina não parece ser um marcador da gravidade da LV ativa (MANNA *et al.*, 2006; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2016). Nossos achados também corroboram com CORRÊA *et al.* (2007) e com ALVAR *et al.* (2004), que cães assintomáticos e sintomáticos produzem citocinas pertencentes aos perfis

Th1 e Th2 e que coexistem na LVC. Os antígenos recombinantes rLci2-NT-CT e rLci2-NT-5R-CT foram capazes de induzir produção de IL-10 por células de sangue total, no subgrupo de cães sem marcador de infecção por *Leishmania* com diferença estatisticamente significativa comparado aos cães de controle negativo, isso sugere que o ensaio QuantiFERON modificado, quando sangue é estimulado por esses antígenos recombinantes a produzir IL-10 permita a identificação de cães considerados negativos em avaliações parasitológicas, sorológicas e de hipersensibilidade tardia, mas é necessária uma avaliação com um número maior de cães de área endêmica para LV sem infecção por *Leishmania* detectada. O mesmo foi observado com as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 embora não estatisticamente significativa quando comparados ao controle negativo, pois, dos cinco cães do subgrupo sem marcador de infecção, um não produziu essas citocinas em amostras de sangue total estimuladas com os antígenos de *Leishmania*, talvez devido ao número de cães desse subgrupo ser pequeno. SINGH *et al.* (2012), encontraram que o ensaio QuantiFERON modificado foi positivo em uma parte dos pacientes do grupo controle negativo de área endêmica para LV, confirmando a capacidade desse ensaio em detectar infecção subclínica por *L. donovani*. A correlação entre o ensaio QuantiFERON modificado e o teste DTH de forma geral, sugere que cães com o teste DTH positivo parecem produzir níveis mais elevados de IL-10 em sangue total estimulado pelos antígenos rLci2-NT-CT e rLci2-NT-5R-CT.

A avaliação da produção de IL-6 em amostras de sangue total incubadas com antígenos de *Leishmania* permitiu a identificação da infecção por *Leishmania* em ambos os grupos, no primeiro grupo, principalmente com o antígeno recombinante rLci2-NT-CT, enquanto no segundo grupo com todos os antígenos, exceto KMP-11, mas, em ambas as análises o ensaio não foi capaz de diferenciar os grupos de infectados. Esse resultado corrobora com o estudo de PINELLI *et al.* (1994), ao avaliarem a atividade de IL-6 *in vitro*, afirmaram não ter havido associação demonstrável entre a produção desta citocina e a resistência ou desenvolvimento da doença. No entanto, DE LIMA *et al.* (2007), observaram que a IL-6 foi detectada nos soros de cães exibindo três ou mais sinais clínicos para leishmaniose visceral e os níveis de IL-6 não foram apenas elevados durante a fase da doença ativa (DE LIMA *et al.*, 2007). Em estudo realizado em cães da mesma área endêmica do presente trabalho, foram observados níveis elevados de IL-6 em amostras de soro de cães com baixo escore clínico para LV (SOLCÀ *et al.*, 2016).

A análise por *heat map* de forma geral mostrou que o ensaio QuantiFERON modificado apresentou permitiu a identificação da infecção por *Leishmania* com TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-6, mas confirmou não ser útil em diferenciar cães resistentes de susceptíveis a LV.

Para CHAMIZO *et al.* (2005); DE LIMA *et al.* (2007), na leishmaniose visceral canina, quando PBMC de cães saudáveis e assintomáticos são estimulados com antígeno solúvel de *Leishmania*, níveis semelhantes de expressão de mRNA IL-6 e mRNA TNF- $\alpha$  foram observados. A alta resposta linfoproliferativa de PBMC a antígenos de *Leishmania* está relacionada a produção de IL-2 e TNF- $\alpha$  e a resposta de hipersensibilidade tardia (PINELLI *et al.*, 1994; 1995).

Quanto a avaliação de parasitismo por *Leishmania*, tanto no primeiro grupo quanto no segundo a detecção de *Leishmania* em cultura de aspirado esplênico foi muito baixa. Esse resultado corrobora com os estudos de RODRIGUEZ-CORTES *et al.* (2010); SOLCÀ *et al.* (2014), cujo foi observado que o método de diagnóstico de LV por cultura apresentou uma baixa sensibilidade. Quanto a avaliação utilizando o método qPCR, no primeiro grupo foi detectado DNA de *Leishmania* em apenas dois cães, enquanto no segundo grupo detectou-se DNA em 16 cães.

A avaliação de resposta imune humoral foi realizada através da titulação de anticorpos anti-*Leishmania* com o ensaio ELISA, no qual, avaliou-se doze títulos de anticorpos (iniciando em 1:50 até 1:102400). Os títulos médios de anticorpos de *Leishmania* curiosamente apresentaram uma diferença entre o subgrupo de cães com baixo escore clínico e o subgrupo com alto escore clínico no segundo grupo do estudo. Esses dados sugerem que os cães do presente estudo tenham apresentado um equilíbrio entre as respostas imune celular e humoral. Assim como, os cães com baixo escore clínico para LV, podem ter desenvolvido uma regulação da resposta inflamatória. Esses resultados corroboram com os estudos de ALVAR *et al.* (2004), que em cães, os estudos que trataram de avaliação de resposta imune para leishmaniose visceral, não conseguiram estabelecer a existência de uma dicotomia das respostas Th1 / Th2. Assim como em estudos que mostraram que cães infectados assintomáticos são capazes de desenvolver tanto resposta imune celular específica quanto resposta humoral contra *Leishmania* (CABRAL *et al.*, 1998; MANNA *et al.*, 2006).

A avaliação de resposta imune celular realizada através do teste de hipersensibilidade tardia, não diferiu o subgrupo de cães com baixo escore clínico do subgrupo de cães com alto escore clínico para LV no primeiro grupo, uma vez que, cinco animais foram positivos em cada subgrupo. Entretanto, no segundo grupo, o teste DTH foi positivo em oito cães do subgrupo com baixo escore clínico e um cão do subgrupo com alto escore clínico para LV, esse resultado obtido no segundo grupo sugere que o teste pode ser um indicativo de resistência a LV em cães. O teste DTH indica a existência de imunidade mediada por células (SLAPPENDEL, 1988; ALVAR *et al.*, 2004). Para DOS-SANTOS *et al.* (2008), a presença

de reação ao teste DTH pode indicar que o sistema imune esteja controlando a infecção por *Leishmania*.



## 7 CONCLUSÃO

O ensaio QuantiFERON modificado permitiu a identificação de cães infectados por *Leishmania* mas não diferenciou cães resistentes de cães susceptíveis a leishmaniose visceral com as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-6.

## REFERÊNCIAS

- ADLER S, T. O. In vestigations on mediterranean kalaazar. VI. canine visceral leishmaniasis. **Proceedings Royal Society London**, v. 110, p. 402-412, 1932.
- ALIMOHAMMADIAN, M. H. *et al.* Assessment of Interferon-g Levels and Leishmanin Skin Test Results in Persons Recovered for Leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 1, p. 70–75, 2012.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 259-265, jan-fev. 2004.
- ANTONELLI, L. R. V. *et al.* Células T com atividade inflamatória ativada correlacionada com tamanho da lesão em leishmaniose cutânea humana. **Immunology Letters**, v. 101, p. 226–230, 2005.
- ASHFORD, D. A., *et al.* Estudo do controle de Leishmaniose Visceral: Impacto de controle de cães na Leishmaniose Visceral Canina e Humana em Jacobina, Bahia, Brasil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 1, p. 53–57, 1998.
- ALVAR, J. *et al.* Canine leishmaniasis. **Advance Parasitology**, v. 57, p. 1–88, 2004.
- BABICKI, S. *et al.* Heat mapper: web-enabled heat mapping for all. **Nucleic Acids Research**, v. 44, p. 147–153, 2016.
- BAGUES, N. C. T. Contribuição para o desenvolvimento de uma Vacina contra leishmaniose visceral canina. 2016. 120 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2016.
- BAHIA, (Governo). Estatísticas Dos Municípios Baianos. Salvador v. 4, n. 1, p. 1-204, 2013.
- BALEEIRO, C. O. *et al.* Montenegro's skin reactions and antibodies against different *Leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniosis endemic área. **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 21–28, 2006.
- BARBIÉRI, C. I. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 329–337, 2006.

BARROUIN-MELO, *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.

BELLETE, B. *et al.* Evaluation of a Whole-Blood Interferon-g Release Assay for the Detection of Mycobacterium tuberculosis Infection in 2 Study Populations. **Clinical Infectious Diseases** v. 34, p. 1449–56, 2002.

BERBERICH, C. *et al.* Cloning of Genes and Expression and Antigenicity Analysis of the Leishmania infantum KMP-11 Protein. **Experimental Parasitology**, v. 85, p. 105–108, 1997.

BETTINI, S.; GRADONI, L. Leishmaniose canina na área do Mediterrâneo e as implicações para a leishmaniose humana. **International Journal Tropical Insect Science**, v. 7, p. 241–245, 1986.

BOURDOISEAU G. *et al.* Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 59, p. 21–30, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. 2014. v. 1, 812 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Nota técnica conjunta N°01/2011-CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS**. Brasília, DF, 2011. p. 3.

BROCK, I. *et al.* Performance of whole blood IFN- $\gamma$  test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10. **International Journal Tuberculosis Lung Disease**, v. 5, p. 462–467, 2001.

CABRAL, M. *et al.* The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 76, p. 173–180, 1998.

CARVALHO, E. M., *et al.* Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. **Journal of Infectious Disease**, v. 165, p. 535–540, 1992.

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

CARRILLO, E. *et al.* Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 26, p. 1902-1911, 2008.

CARRILLO, E. MORENO, J. Perfil de citocinas na leishmaniose visceral canina. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, p. 67–70, 2009.

CARRILLO *et al.* Cytokine release assays as tests for exposure to *leishmania*, and for confirming cure from leishmaniasis, in solid organ transplant recipients. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, p. 1-14, 2015.

CHAMIZO, C. *et al.* Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 103, p. 67–75, 2005.

CIARAMELLA, P. *et al.* O estudo clínico retrospectivo de leishmaniose canina em 150 cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v. 141, p. 539-543, 1997.

COFFMAN R. L. *et al.* The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. **Immunological Review**, v. 102, p. 5–28, 1988.

CONNELL, T. G. *et al.* QuantiFERON-TB Gold: state of the art for the diagnosis of tuberculosis infection? **Future Drugs Ltd**, v. 6, p. 663-677, 2006.

COSTA, C.H. *et al.* Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 334–337, 2002.

CORRÊA, A. P. F. L. *et al.* Evaluation of transformation growth factor b1, interleukin-10, and interferon-g in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 143, p. 267–274, 2007.

CROWTHER, J. The ELISA guidebook. **Methods in molecular biology**. 2<sup>a</sup> ed. 2008. p. 1-563.

CUNHA S. *et al.* Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, p. 155-158, 1995.

DE OLIVEIRA, L. C. P. *et al.* Soroprevalência e fatores de risco para leishmaniose visceral canina na área endêmica de Dias D'Ávila, Estado da Bahia, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 400-404, 2010.

DEANE L. M. **Leishmaniose visceral no Brasil, estudos sobre reservatório e transmissores realizados no Estado do Ceará**. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária, 1956. 162 p.

DE LIMA, V. M. F. IL-6 and TNF-- $\alpha$  production during active canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, p. 189–193, 2007.

DE LUNA, R. *et al.* Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 70, p. 95 – 103, 1999.

DESJEUX P., Leishmanioses: Controle e Aspectos de Saúde Pública. **Clínica em Dermatologia**, v. 14, p. 417-423, 1996.

DEY, A. *et al.* Kinesin motor domain of *Leishmania donovani* as a future vaccine candidate. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 15, p. 836-42, 2008.

DOS REIS, L. L. *et al.* Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, p. 638-645, 2017.

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, p. 251–259, 2008.

DUPREY Z. A. *et al.* Leishmaniose Visceral Canina, nos Estados Unidos e Canadá, 200-203. **Doenças Infecciosas Emergentes**, v. 12, p. 440-446, 2006.

ESTATÍSTICAS DOS MUNICÍPIOS BAIANOS. Território de identidade N°26 Metropolitano de Salvador. n. 1 v. 4, p. 1-204, 2013.

FERNÁNDEZ-BELLON, H. *et al.* Comparison of three assays for the evaluation of specific cellular immunity to *Leishmania infantum* in dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 107, p. 163–169, 2005.

FERNANDES, C. B. *et al.* Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnoses. **Vaccine**, v. 32, p. 1287-1295, 2014.

FERREIRA, E. *et al.* Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology**, v. 146, p. 235–241, 2007.

FOGLIA MANZILLO, V. *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, p. 1-8, 2013.

FRANCA-SILVA, J.C. *et al.* Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 111, p. 161–173, 2003.

FRANCINO, O. *et al.* Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 214–221, 2006.

FRANKE, Leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil, from 1985 to 1999. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 1-6, 2002.

GASIM, *et al.* High levels of plasma IL-10 and expression of IL-10 by keratinocytes during visceral leishmaniasis predict subsequent development of post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Clinical Experimental Immunology**, v.112, p. 64-69, 1998.

GIDWANI, K. Interferon-Gamma release assay (Modified QuantiFERON) as a potential marker of infection for *Leishmania*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. 1-5, 2011.

GOLLOB, K. J. *et al.* Insights into CD4<sup>+</sup> memory T cells following *Leishmania* infection **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 347-350, 2005.

GOMES Y.M. *et al.* Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina: avanços biotecnológicos. **O Jornal de Veterinária**, v.175, p. 45–52, 2008.

GOTO, Y. *et al.* Cloning, characterization, and serodiagnostic evaluation of *Leishmania infantum* tandem repeat proteins. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 3939-3945, 2006.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 338-349, 2004.

GRADONI, L. Vacina para Leishmaniose Canina: ainda há um longo caminho a seguir. **Parasitologia Veterinária**, v. 208, p. 94–100, 2015.

GRADONI, L. *et al.* Falha de subunidades múltiplas de vacina leishmanial recombinante (MML) para proteção de cães infectados por *Leishmania infantum* e para prevenir a progressão da doença em animais infectados. **Vacina**, v. 23, p. 5245-5251, 2005.

GROOTE, D. de. *et al.* Direct stimulation of cytokines (IL-1p, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-2, IFN- $\gamma$  and GM-CSF) in whole blood. i. comparison with isolated pbmc stimulation. **Cytokine**, v. 4, p. 239-248, 1992.

HANDMAN, E. *et al.* Terapia em leishmaniose Cutânea Murina com vacina de DNA. **Vacina**, v. 18, p. 3011-3017, 2005.

HOSEIN, S. *et al.* Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. **Parasitology**, v. 144, p. 95–115, 2017.

HOWARD, M.; O’GARRA, A. Biological properties of interleukin 10. **Immunology Today**, v. 13, p. 198–200, 1992.

IBARRA-MENESES, A. V. *et al.* Interleukin-2 as a marker for detecting asymptomatic individuals in areas where *Leishmania infantum* is endemic. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 1, p. 1-4, 2016.

IKEDA-GARCIA, F.A. *et al.* Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. **Veterinary Parasitology**, v. 143, p. 254–259, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo demográfico 2010**. Disponível em: <https://censo2010.ibge.gov.br/>

JULIÃO, F. S. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 319-324, 2007.

KIRCHNER, H. *et al.* A whole-blood technique for testing production of human interferon by leukocytes. **Journal of Immunological Methods**, v. 48, p. 213—219, 1982.

KUMAR, R. *et al.* Evaluation of ex vivo human immune response against candidate antigens for a visceral leishmaniasis vaccine. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, p. 808–813, 2010.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, p. 811-827, 2005.

LIGHTER, J. *et al.* Latent tuberculosis diagnosis in children by using the QuantiFERON-TB gold In-Tube Test. **Pediatrics**, v. 123, p. 30-37, 2009.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAGALHÃES, P. O. *et al.* Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science**, v. 10, p. 388-404, 2007.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Métodos para diagnóstico de Leishmaniose canina e resposta imune a infecção. **Parasitologia Veterinária**, v. 158, p. 274–287, 2008.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S. *et al.* Leishmaniose visceral no Brasil: evolução e desafios. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, p. 2941-2947, 2008.

MANNA, L. *et al.* *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 271–280, 2006.

MANDALAKAS, A. M. *et al.* Interferon- gamma release assays and childhood tuberculosis: systematic review and meta-analysis. **International Journal Tuberculosis Lung Disease**, v. 15, p. 1018-1032, 2011.

MARY, C. *et al.* Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 5249–5255, 2004.

MARTÍNEZ-ORELLANA *et al.* *Leishmania infantum*-specific IFN- $\gamma$  production in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniosis at diagnosis and during treatment. **Veterinary Parasitology**, v. 248, p. 39–47, 2017.

MAZUREK, G. H.; VILLARINO, M. E. Guidelines for Using the QuantiFERON® -TB Test for Diagnosing Latent Mycobacterium tuberculosis Infection. **Centers for Disease Control and Prevention**, v.15, p. 15-18, 2003.

MC CONVILLE, M. J. *et al.* Lipophosphoglycan of *Leishmania major* that vaccinates against cutaneous leishmaniasis contains an alkylglycerophosphoinositol lipid anchor. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 84, p. 8941–8945, 1987.

MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: Desafios e Perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, 2004.

MERCK, MILLIPLEX®. **Multiplex Assays Using Luminex®** Disponível em: [http://www.merckmillipore.com/BR/pt/life-science-research/protein-detection-quantification/Immunoassay-Platform-Solutions/milliplex-multiplex-assays-using-luminex/UjGb.qB.8WQAAAE\\_rn8RHeN.,nav](http://www.merckmillipore.com/BR/pt/life-science-research/protein-detection-quantification/Immunoassay-Platform-Solutions/milliplex-multiplex-assays-using-luminex/UjGb.qB.8WQAAAE_rn8RHeN.,nav)

METCALFE, J. Z. *et al.* Test Variability of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube Assay in Clinical Practice. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 187. p. 203-212, 2013.

MICHALICK, M. S. M. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D.P. *et al.* (Eds.). **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, 10. ed, p. 31-35, 2003.



MIRÓ, G. *et al.* Leishmaniose Canina – Novos conceitos e destaques na expansão da zoonose: parte 02 **Trends in Parasitology**, v.24, p. 371-377, 2008.

MOL, C. J.; KOETHE, QuantiFERON TB Gold- An innovation in tuberculosis screening. **Workplace Health e Safety**, v. 54, p. 245-247, 2006.

MOSMANN, T. R. *et al.* Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. **Journal of Immunology**, v. 175, p. 5–14, 2005.

MUZAMIL, Y. W. *et al.* Eficácia terapêutica de artemizina conduzida por nanopartículas em leishmaniose visceral. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 130, p. 215–221, 2015.

OLIVEIRA, G. G. S. Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five Families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **A American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, p. 1025–1034, 2011.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. **Trends in Parasitology**, v. 29, p. 339-345, 2013.

PAI M, O'BRIEN R. Serial testing for tuberculosis: can we make sense of T cell assay conversions and reversions? **PLoS Med**, v. 4, p. 208, 2007.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. *et al.* Impacto do controle de cães na epidemiologia da Leishmaniose Visceral Canina e humana no Brasil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, p. 510–517, 2001.

PARANHOS-SILVA, M. *et al.* Skin reactions to thimerosal and *Leishmania* in dogs from a leishmaniasis endemic area: it is better to keep them apart. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 679-681., 2001.

PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. **Leishmaniose na biologia e na medicina**. London: Academic Press, 1987. v. 1, p. 1-120.

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

PINELLI, E. *et al.* *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner Protective. **European Journal Immunology**, v. 25, p. 1594-1600, 1995.

PINELLI, E. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 69, p. 121-126, 1999.

PINHEIRO, C. G. M. de Avaliação da resposta imune em camundongos utilizando diferentes protocolos de imunização com antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi*. 2011. 172 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantiFERON®, QFT® (QIAGEN Group). **Registered names, trademarks, etc. used in this document, even when not specifically marked as such, are not to be considered unprotected by law.** PROM-7540-003 10/16 1099497 © 2016 QIAGEN.

REIS, A. B. *et al.* Resposta imune sistêmica e compartimentalizada em Leishmaniose Visceral Canina. **Imunologia e Imunopatologia Veterinária**, v. 128, p. 87–95, 2009.

REIS, A. B. *et al.* Imunidade para *Leishmania* e a fonte de vacinas contra Leishmaniose Canina. **Avanços em Parasitologia**, v. 26, p. 341–349, 2010.

RHALEM, A. *et al.* Análise de resposta imune em cães com leishmaniose visceral canina, antes, durante e após o tratamento. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 71 p. 69-76, 1999.

RIBEIRO, R. R. *et al.* Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 2564–2572, 2008.

RODRIGUEZ-CORTES, A. *et al.* *Leishmania* infection: laboratory diagnosing in the absence of a “gold standard”. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, p. 251–256, 2010.

ROSYPAL, A. C. *et al.* Emergência de Leishmaniose Visceral zoonótica nos Estados Unidos: Isolamento e detecção imunohistocmica de *Leishmania infantum* de cães silvestres de Virginia. **Jornal de Eucariotos, Microbiologia Journal Eukaryotos**, v. 50, p. 691-693, 2003.

ROSÁRIO, E. Y. *et al.* Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, p. 197-203, 2005.

ROGERS, M. E. *et al.* The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis* **Parasitology**, v. 124, p. 495-507, 2002.

SANTOS, V. C. *et al.* A fisiologia do intestino médio de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva 1912): pH em diferentes condições fisiológicas e mecanismos envolvidos no seu controle. **O Jornal de Biologia Experimental**, v. 211, p. 2792-2798, 2008.

SASSI, A. *et al.* Leishmanin skin test lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic *Leishmania major* infection in Tunisia. **Clinical Experimental Immunology**, v. 116, p. 127–132, 1999.

SCHLEIN Y, *Leishmania* e Flebótomo: interações no ciclo biológico e transmissão. **Parasitologia Hoje**, v. 89, p. 9944-9948, 1993.

SCHNORR, D. MUNIZ, A. C. *et al.* IFN- $\gamma$  Production to *Leishmania* Antigen Supplements the *Leishmania* Skin Test in Identifying Exposure to *L. braziliensis* Infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, p. 1-8, 2012.

SIDERIS, V. *et al.* Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. **European Journal Epidemiology**, v. 15, p. 271–276. 1999.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, p. 20-31, 2007.

SINGH, O. P.; SUNDAR, S. Whole blood assay and visceral leishmaniasis: Challenges and promises **Immunobiology**, v. 219, p. 323–328, 2014.

SINGH, O. P. *et al.* Resposta de citocinas a novos antígenos na população indiana de área endêmica. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, p. 10-1874, 2012.

SLAPPENDEL, R. J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. **Veterinary Quarterly**, v. 10, p. 1–16, 1988.

SHERLOCK, I. A. Ecological Interactions of Visceral Leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 9, p. 671-683, 1996.

SOLANO-GALLEGU, L. *et al.* Direções para o diagnóstico, estágio clínico, tratamento e prevenção de Leishmaniose Canina. **Parasitologia Veterinária**, v. 165, p. 1–18, 2009.

SOLANO-GALLEGU, L. *et al.* *Leishmania infantum*-specific production of IFN- $\gamma$  and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniasis. **Parasites e Vectors**, v. 9, p. 1-10, 2016.

SOLCÀ, M. *et al.* Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. **Plos One**, v. 9, p. 1-11, 2014.

SOLCÀ, M. da S. Avaliação de biomarcadores de gravidade em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* classificados clinicamente e estratificados quanto à carga parasitária em estudos de corte transversal. 153 f. Tese (Doutorado em Patologia humana) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2017.

SOARES, R. P. P.; TURCO, S. J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, p. 301-330 2003.

STREETON, J A. *et al.* QuantiFERON-TB: a new in vitro test for tuberculosis and atypical mycobacterial infection. **American Journal Respiratory Critical Care**, v. 151, p. 511-515, 1995.

STREETON, J. A. *et al.* Sensitivity and specificity of a gamma- interferon blood test for tuberculosis infection. **International Journal Tuberculosis Lung Disease**, v. 2, p. 443–450, 1998.

SUN, L. *et al.* Interferon gamma release assay in diagnosis of pediatric tuberculosis: a meta-analysis. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v. 63, p. 165-73, 2011.

TOLSON, D. L. *et al.* The kinetoplastid membrane protein-11 of *Leishmania donovani* and African trypanosomes is a potent stimulator of T- lymphocyte proliferation, Infection and **Immunity**, v. 6217, p. 4893–4899, 1994.

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

VALLADA, M. G. *et al.* Acurácia do QuantiFERON-TB Gold in Tube no diagnóstico de tuberculose em uma população pediátrica jovem previamente vacinada com Bacille Calmette-Guérin. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 32, p. 4-10, 2014.

VOULDOUKIS, I. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 40, p. 253-256, 1996.

WOOD, P.R. *et al.* Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of 3' interferon. **Research in Veterinary Science**, v. 49, p. 46-49, 1990a.

WOOD, P. R. *et al.* Production and characterization of monoclonal antibodies specific for bovine gamma-interferon. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 25, p. 37-46, 1990b.

WOOD, P. R. *et al.* Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 68, p. 286-290, 1991.

WOOD, P. R. *et al.* A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. **Veterinary Microbiology**, v. 31, p. 71-79, 1992.

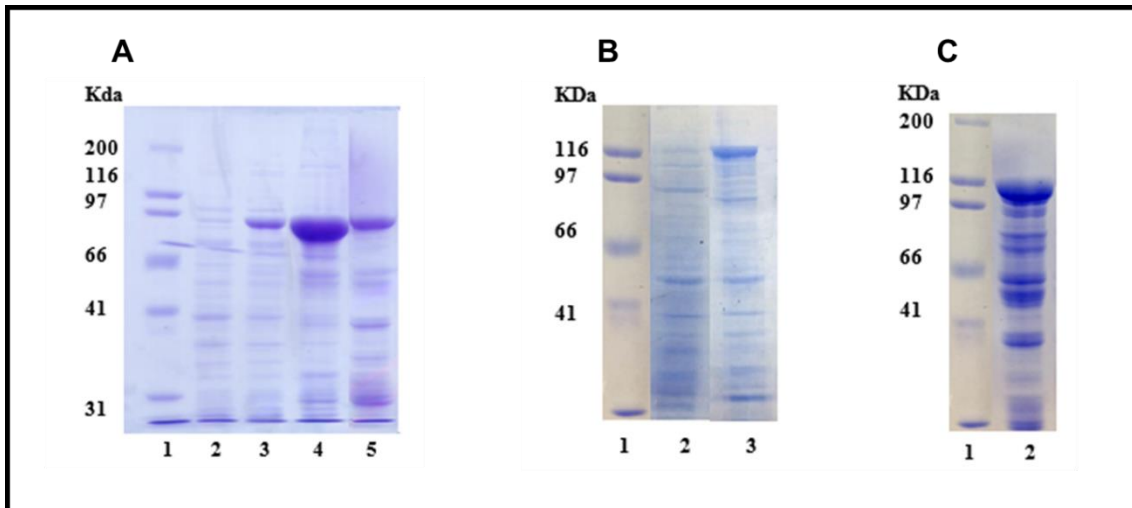
WORD HEALTH ORGANIZATION. **Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance**. 2017.

WORD HEALTH ORGANIZATION. **Epidemiological Report of the Americas**. 2017.

ZIBRI, L. *et al.* Use of an Interferon Gamma Release Assay (IGRA) to test T-cell responsiveness to soluble *Leishmania infantum* antigen in whole blood of dogs from endemic areas. **Veterinary Parasitology**, v. 246, p. 88–92, 2017.

## APÊNDICES

**Apêndice 1** Avaliação da proteína rLci2-NT-CT rLci2-NT-5R-CT por SDS-PAGE 10%.



A: rLci2-NT-CT, Raia 1. Marcador de peso molecular; Raia 2. BL21 (DE3) Códon Plus RP transformada com pRSET A sem inserto; Raia 3. BL21 (DE3) Códon Plus RP transformada com pRSET A com o inserto; Raia 4. Proteína na forma de corpúsculo de inclusão; Raia 5. Proteína purificada; B: rLci2NT-5R-CT expressada, Raia 1. Marcador de peso molecular; Raia 2. BL21 (DE3) Códon Plus RP transformada com pRSET A sem inserto; Raia 3. BL21 (DE3) Códon Plus RP transformada com pRSET A com o inserto; C: rLci2NT-5R-CT purificada, Raia 1. Marcador de peso molecular; Raia 2. rLci2-NT-5R-CT purificada.

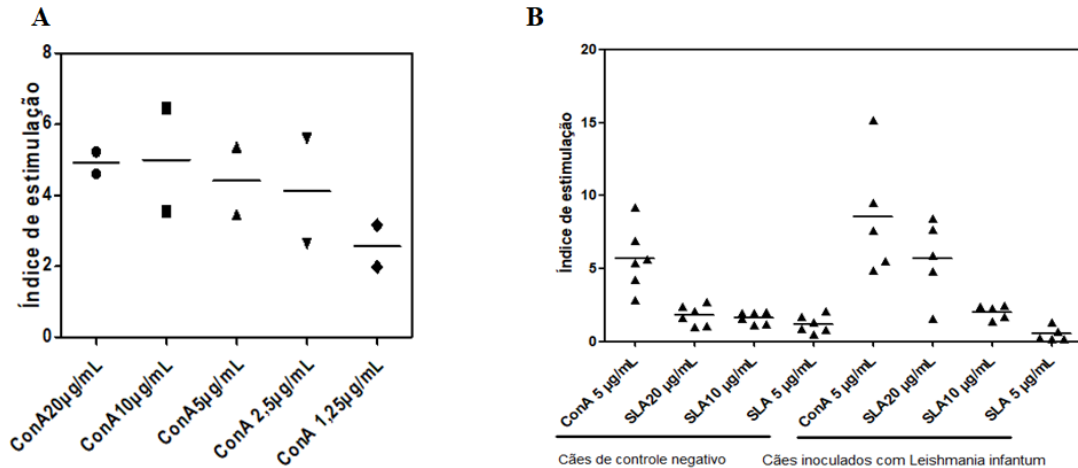
Uma avaliação das proteínas recombinantes purificadas foi realizada por *SDS PAGE a 10 %* e observou-se em ambas proteínas que havia uma banda maior com peso molecular correspondente ao tamanho das mesmas, mas haviam também bandas com pesos moleculares menores, provavelmente por degradação no processo de manipulação. Esse comportamento nas proteínas produzidas nesse trabalho, foi previamente observado por BAGUES, (2016) através de *western blot*, nessa avaliação essas proteínas com bandas menores também apresentavam cauda de histidina.

**Apêndice 2 Mensuração de endotoxinas nos antígenos de *L. infantum***

<b>Antígeno</b>	<b>Quantidade de LPS/alíquota de proteína</b>	<b>Quantidade de ng de LPS por alíquota de proteína</b>
rLci2-NT-CT	0.02 EU/10 µg	0,002 ng de LPS
rLci2-NT-5R-CT	0.024 EU/10 µg	0,0024 ng de LPS
SLA	0.15 EU/20 µg	0,015 ng de LPS

Mensuração realizada utilizando Kit LAL (Charles Rhiver) seguindo as recomendações do fabricante. Valor de referência: 0,5 EU/mL que corresponde a 0,05 ng de LPS/mL (MAGALHÃES *et al.* 2007).

### Apêndice 3 Avaliação de dose-resposta ao mitógeno concanavalina A e ao antígeno solúvel de *Leishmania infantum* para utilizar no ensaio QuantiFERON modificado



Os gráficos acima representam a avaliação dose-resposta ao mitógeno e ao SLA para isso o ensaio de linfoproliferação de PBMC foi realizado. A: avaliação do mitógeno concanavalina A em dois cães de controle negativo. B: avaliação dose-resposta ao antígeno em seis cães de controle negativo e cinco cães inoculados via dérmica experimentalmente com *L. infantum*.

Para a avaliação das concentrações de Con A e SLA a serem utilizadas no ensaio QuantiFERON modificado, o ensaio de linfoproliferação de PBMC com marcação de Brometo de uridina foi realizado. Na avaliação de Con A foram utilizados dois cães controle negativo provenientes do canil do IGM, às concentrações utilizadas foram 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL e 20 µg/mL. Observou-se que Con A, estimulou bem a proliferação em todas as concentrações testadas, principalmente nas concentrações 5 µg/mL, 10 µg/mL e 20 µg/mL, assim, para utilizar menos o estoque e obter a mesma qualidade de resultados, a concentração definida foi de 5 µg/mL.

Para avaliar a dose-resposta ao SLA, foram utilizadas as concentrações de 5 µg/mL, 10 µg/mL e 20 µg/mL. Para este ensaio foram utilizadas amostras de PBMC de cinco cães infectados experimentalmente por *Leishmania infantum* (controle positivo do ensaio) e de seis cães saudáveis (controle negativo). A Concanavalina A também foi avaliada neste ensaio com a concentração escolhida no ensaio anterior.

Foi possível observar que o SLA estimulou resposta linfoproliferativa nos cães experimentalmente infectados quando utilizada a concentração 20 µg/mL, quanto às outras concentrações não houve grande estimulação. Quanto a resposta linfoproliferativa com o



mitógeno, ocorreu fortemente tanto nos cães infectados experimentalmente quanto nos cães do grupo de controle negativo.

**Apêndice 4 Caracterização individual do primeiro grupo de cães de área endêmica para leishmaniose visceral Camaçari, Bahia.**

Grupo	Cao #	Sexo	Raça	Escore clinico	Cultura	PCR	Titulo médio de anticorpos anti- <i>Leishmani</i> <i>a</i>	DTH (mm)	DTH resultado
SMI	RNA 011	F	Mestiço	5	Negativo	Negativo	1.630	0	Negativo
SMI	RUR 309	M	Mestiço	3	Negativo	Negativo	1.406	0	Negativo
SMI	RNA 006	M	Puro	3	Negativo	Negativo	1.327	0	Negativo
SMI	RNA 007	M	Puro	2	Negativo	Negativo	1.834	0	Negativo
SMI	RNA 009	F	Mestiço	0	Negativo	Negativo	1.435	0	Negativo
BEC	RUR 300	F	Mestiço	3	Negativo	Negativo	2.106	0	Negativo
BEC	RUR 301	F	Puro	3	Negativo	Negativo	3.182	0	Negativo
BEC	RUR 302	F	Mestiço	3	Negativo	Negativo	4.706	0	Negativo
BEC	RUR 319	F	Puro	3	Negativo	Negativo	2.429	4,5	Negativo
BEC	RUR 307	M	Mestiço	2	Negativo	Negativo	5.221	7	Positivo
BEC	RUR 313	M	Puro	2	Negativo	Negativo	6.551	0	Negativo
BEC	RUR 317	F	Mestiço	2	Negativo	Negativo	2.815	0	Negativo
BEC	RUR 318	F	Puro	2	Negativo	Negativo	2.664	9,5	Positivo
BEC	RNA 001	F	Puro	2	Negativo	Negativo	2.311	17	Positivo
BEC	RNA 002	F	Mestiço	1	Negativo	Negativo	1.286	9,5	Positivo
BEC	RUR 310	F	Mestiço	0	Negativo	Negativo	2.275	0	Negativo
BEC	RUR 314	F	Mestiço	0	Negativo	Positivo	4.157	15	Positivo
AEC	RUR 305	M	Mestiço	7	Negativo	Negativo	6.462	9	Positivo
AEC	RUR 316	M	Mestiço	6	Negativo	Negativo	3.870	4,5	Negativo
AEC	RNA 003	F	Mestiço	6	Negativo	Negativo	3.433	0	Negativo
AEC	RNA 012	M	Mestiço	6	Positivo	Positivo	2.475	0	Negativo

AEC	RUR 304	F	Mestiço	5	Negativo	Negativo	586	3,5	Negativo
AEC	RUR 306	F	Mestiço	5	Negativo	Negativo	2.699	Não fez	Não fez
AEC	RUR 308	F	Mestiço	5	Negativo	Negativo	633	7	Positivo
AEC	RUR 315	F	Mestiço	5	Negativo	Negativo	832	6	Positivo
AEC	RNA 005	M	Mestiço	5	Negativo	Negativo	732	0	Negativo
AEC	RNA 008	M	Mestiço	5	Negativo	Negativo	703	6,5	Positivo
AEC	RUR 303	F	Mestiço	4	Negativo	Negativo	3.700	0	Negativo
AEC	RNA 004	M	Mestiço	4	Negativo	Negativo	2.973	6	Positivo

Sexo: Fêmea (F) e Macho (M), escore clínico: Os critérios utilizados para identificar como infectados por *Leishmania infantum* foram, cultura, ou qPCR, ou ELISA. 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. SMI: cães sem marcador de infecção; BSC: cães com baixo escore clínico; e ASC: cães com alto escore clínico.

**Apêndice 5 Caracterização individual do segundo grupo de cães de área endêmica para leishmaniose visceral Camaçari, Bahia.**

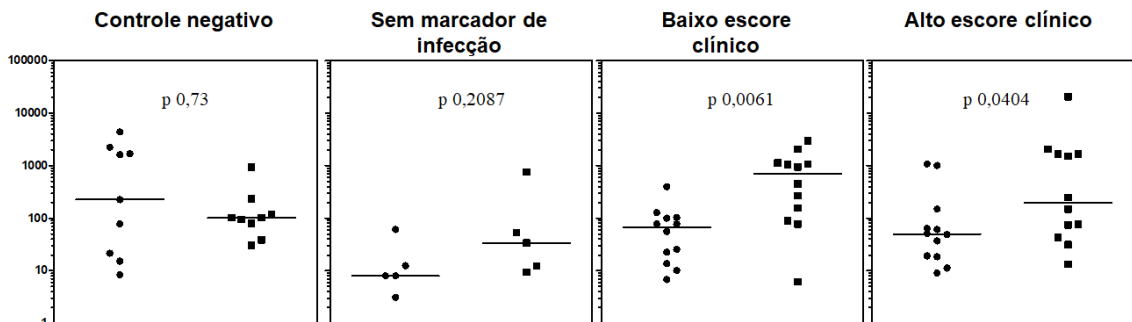
Grupo	Cão #	Escore clínico final	Escore clínico médio	Média de escores acomp.	Última Cultura	Culturas positivas em acomp. N	Última PCR	PCR positivos em acomp. N	Título médio de anticorpos anti- <i>Leishmania</i>	DTH (mm)	DTH resultado
BEC	RUR 025	1	0	0,8	Positivo	1	Positivo	2	6.383	9	Positivo
BEC	RUR 052	0	1	0,1	Negativo	0	Positivo	2	4.710	0	Negativo
BEC	RUR 065	0	1	1,3	Negativo	1	Positivo	2	11.197	10.5	Positivo
BEC	RUR 115	2	1	1,5	Negativo	0	Negativo	1	4.786	0	Negativo
BEC	RUR 243	0	1	0,1	Negativo	1	Negativo	1	7.375	7	Positivo
BEC	RUR 311	0	1	0,8	Negativo	0	Negativo	1	5.827	0	Negativo
BEC	RUR 312	1	1	1,6	Não fez	0	Positivo	2	4.701	9.5	Positivo
BEC	RUR 343	3	3	1,3	Positivo	2	Positivo	1	5.676	Não fez	Não fez
BEC	RUR 431	2	4	2,5	Negativo	0	Negativo	2	5.099	12	Positivo
BEC	RUR 481	0	0	0,8	Negativo	0	Negativo	2	2.429	0	Negativo
BEC	RUR 331	1	2	1,6	Negativo	0	Negativo	2	5.034	0	Negativo
BEC	RUR 353	2	6	3,5	Negativo	1	Positivo	4	7.915	7	Positivo
BEC	RUR 274	2	4	4,6	Negativo	2	Positivo	2	2.467	6.5	Positivo
BEC	RUR 329	1	11	6,1	Contaminada	1	Positivo	1	2.010	5	Positivo
BEC	RUR 453	2	8	4	Negativo	0	Negativo	2	3.526	0	Negativo
BEC	RUR 476	2	4	3,6	Negativo	0	Negativo	1	1.827	0	Negativo
ASC	RUR 002	11	3	4,4	Negativo	3	Positivo	5	1.419	0	Negativo
ASC	RUR 022	6	3	3,3	Negativo	0	Positivo	2	890	Não fez	Não fez
ASC	RUR 037	5	2	2,1	Negativo	0	Positivo	3	1.892	0	Negativo
ASC	RUR 063	6	6	5,6	Negativo	2	Negativo	1	2.434	0	Negativo
ASC	RUR 067	4	3	5,1	Negativo	3	Positivo	3	5.099	0	Negativo
ASC	RUR 094	9	8	5,8	Negativo	2	Positivo	4	1.693	0	Negativo
ASC	RUR 184	4	3	3,8	Negativo	0	Positivo	2	2.805	6	Positivo
ASC	RUR 354	4	2	3	Negativo	3	Positivo	4	1.893	0	Negativo
ASC	RUR 398	12	12	9,5	Negativo	2	Negativo	2	1.525	0	Negativo
ASC	RUR 403	7	6	5,1	Negativo	3	Positivo	4	3.579	0	Negativo
ASC	RUR 446	8	6	5,2	Contaminada	4	Negativo	2	9.895	Não fez	Não fez

Sexo: Fêmea (F) e Macho (M), escore clínico: Os critérios utilizados para identificar como infectados por *Leishmania infantum* foram, cultura, ou qPCR, ou ELISA. Soma de escore dos sinais clínicos avaliados: estado

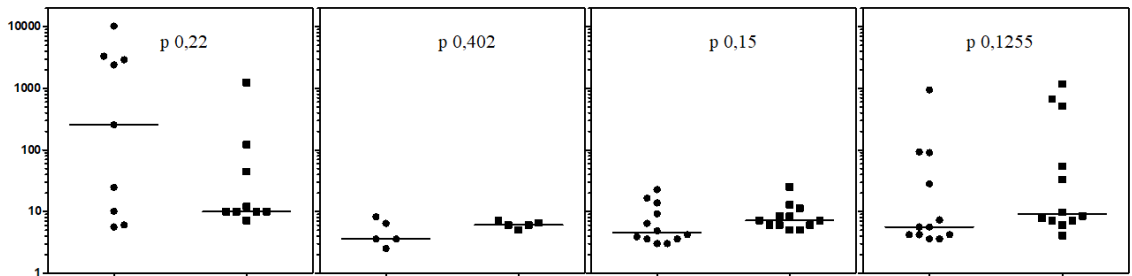
nutricional, mucosas, onicogrifose, volume baço, linfonodos, dermatite periocular, crosta em orelhas, úlcera em orelhas, despigmentação no focinho, hiperqueratose no focinho, alopecia geral e dermatite furfurácea geral. SMI: cães sem marcador de infecção; BSC: cães com baixo escore clínico; e ASC: cães com alto escore clínico. N: número de resultados positivos durante acompanhamento.

**Apêndice 6 Avaliação da produção de TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-6 por células de sangue estimulado pelo mitógeno concanavalina A de cães do primeiro grupo de área endêmica para leishmaniose visceral**

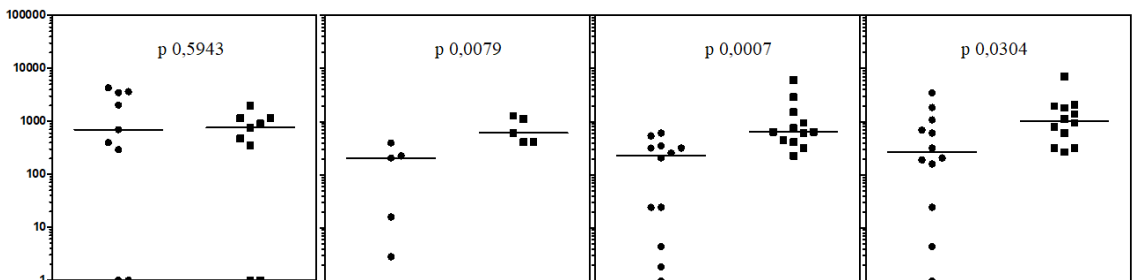
**A**



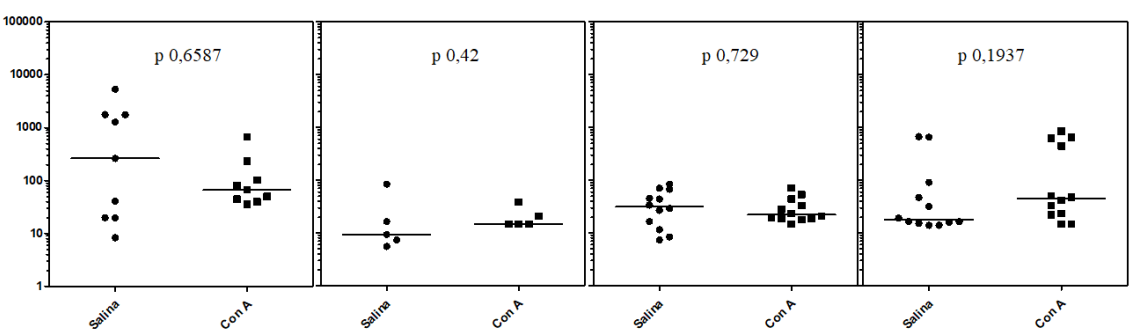
**B**



**C**



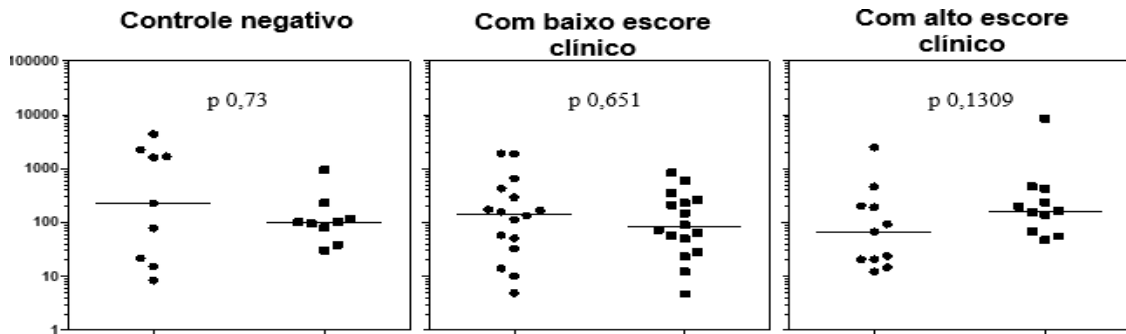
**D**



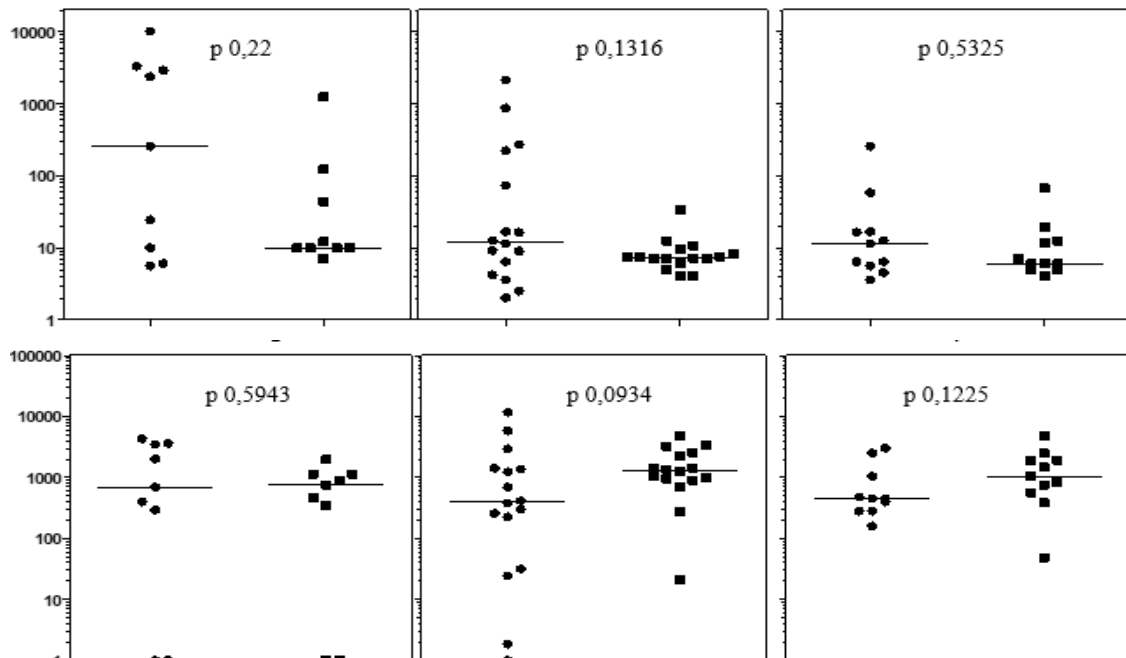
Avaliação do mitógeno concanavalina A a 5 µg/mL comparando com salina (controle negativo do ensaio) em sangue cultivado por 24h. O plasma foi coletado e o ensaio Milliplex (Merck) foi realizado para dosar citocinas. Os valores apresentados são brutos. A: TNF- $\alpha$ ; B: IL-2; C: IL-10; e D: IL-6. A produção de citocinas foi avaliada estatisticamente através do teste não paramétrico de Mann Whitney.

**Apêndice 7 Avaliação da produção de TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-6 por células de sangue estimulado pelo mitógeno concanavalina A de cães do segundo grupo de área endêmica para leishmaniose visceral.**

**A**



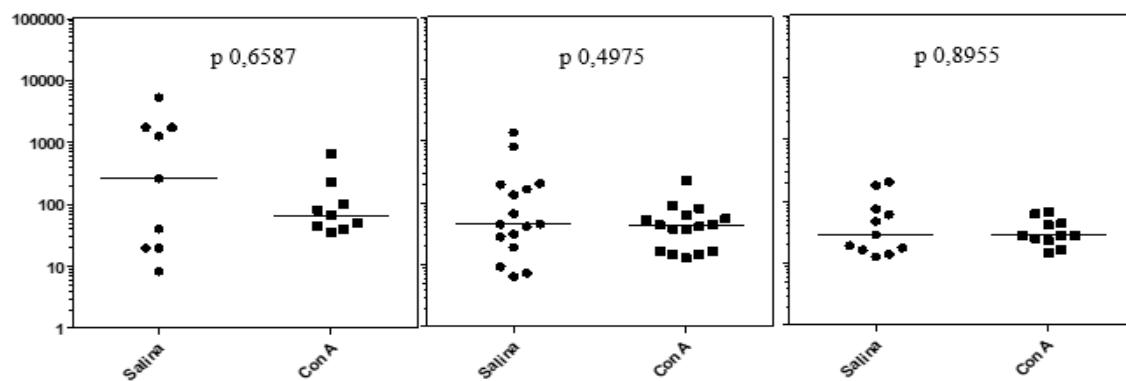
**B**



**C**

**D**

Avaliação do mitógeno concanavalina A a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  comparando com salina (controle negativo do ensaio) em sangue cultivado por 24h. O plasma foi coletado e o ensaio Milliplex (Merck) foi realizado para dosar citocinas.



Os valores apresentados são brutos. A: TNF- $\alpha$ ; B: IL-2; C: IL-10; e D: IL-6. A produção de citocinas foi avaliada estatisticamente através do teste não paramétrico de Mann Whitney.

**Apêndice 8 Valores de mediana e percentil da produção de TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-6 do primeiro grupo de cães de área endêmica para LV**

		SLA	rLci2-NT-CT	rLci2-NT-5R-CT
Grupo de cães	N	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>		
Controle negativo	9	53,46 (0 - 293,4)	0 (0 - 11,79)	0 (0 - 377,1)
Sem marcador de infecção	5	377,7 (93,74 - 980,1)	1.392 (576,9 – 6.328)	1.904 (775,4 – 4.291)
Com baixo escore clínico (escore <4)	12	12,3 (0 - 102,1)	2.217 (979,3 – 6.048)	1.165 (896,4 – 3.371)
Com alto escore clínico (escore $\geq$ 4)	12	101,3 (0 - 403,1)	2.755 (876,3 – 5.611)	2.101 (705,8 – 3.850)
Total	38	77,38 (18,09 – 308,6)	1.805 (348 - 2621)	1.535 (291,3 - 2.052)
<b>IL-2</b>				
Controle negativo	9	0 (0 – 3.015)	0 (0 - 0)	0 (0 - 10,67)
Sem marcador de infecção	5	0 (0 - 0)	0 (0 - 15,57)	0 (0 - 0)
Com baixo escore clínico (escore <4)	12	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)
Com alto escore clínico (escore $\geq$ 4)	12	0 (0 - 83,22)	0 (0 - 27,47)	0 (0 - 113)
Total	38	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)
<b>IL-10</b>				
Controle negativo	9	287,3 (133,8 - 657)	0 (0 - 82,44)	0 (0 - 969)
Sem marcador de infecção	5	1.237 (494,2 – 2.251)	2.268 (1.124 – 10.164)	6.110 (1.752 – 6.570)
Com baixo escore clínico (escore <4)	12	13,05 (0 - 450,5)	2.876 (1.634 – 4.329)	2.851 (1.869 – 5.210)
Com alto escore clínico (escore $\geq$ 4)	12	0 (0 - 854,5)	1.583 (211 – 4.058)	1.175 (0 – 3.024)
Total	38	150,2 (3,26 – 999,6)	1.926 (395,8 – 2.724)	2.013 (293,8- 5.295)
<b>IL-6</b>				

Controle negativo	9	40,86 (0 - 222)	0 (0 - 15,98)	52,38 (0 - 158,9)
Sem marcador de infecção	5	98,64 (36,18 - 198,7)	620,4 (127,6 - 720,1)	450,8 (170,3 - 679,9)
Com baixo escore clínico (escore <4)	12	0 (0 - 47,96)	1.068 (558,2 - 1.697)	4.46,1 (391,2 - 1.060)
Com alto escore clínico (escore ≥4)	12	0 (0 - 253,3)	1.029 (609,4 - 1.835)	697 (540,6 - 1.167)
Total	38	20,43 (0 - 84,20)	824,7 (155,1 - 1.058)	448,5 (150,8- 635,5)

Valores em pg/mL(estímulo subtraído por salina), apresentados em mediana (25 % percentil - 75 % percentil) Os critérios utilizados para identificar como infectados por *Leishmania infantum* foram, cultura, ou qPCR, ou ELISA. O escore clínico avaliado foi utilizado para classificação como cães sem sinais clínicos ou cães com sinais clínicos para LV Os cães então classificados, foram correlacionados com o resultado do ensaio milliplex para identificar o perfil de citocinas presente em cada grupo.



**Apêndice 9 Valores de mediana e percentil da produção de TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-6 do primeiro grupo de cães em cães positivos e negativos para o teste de hipersensibilidade tardia.**

		SLA	rLci2-NT-CT	rLci2-NT-5R-CT
<b>Teste de DTH</b>	<b>N</b>	<b>TNF<math>\alpha</math></b>		
Positivo	10	6,93 (0 - 94,61)	1.757 (611,7 – 3.012)	806,2 (270,4 – 1.524)
Negativo	19	16,56 (0 -60,39)	452,7 (203,8 – 1.499)	360,2 (258,1 - 838,5)
Total	29	16,56 (0 -77,27)	716,14 (715 – 1.992)	408,6 (271,4 – 1.164)
<b>IL-2</b>				
Positivo	10	0 (0 - 3,45)	0 (0 - 4,40)	0 (0 - 6,75)
Negativo	19	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)
Total	29	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)
<b>IL-10</b>				
Positivo	10	0 (0 - 33,83)	1.270 (491,1 – 2.185)	1.005 (626,8 – 1.538)
Negativo	19	75,93 (0 - 822,9)	506,6 (100,1 - 957,7)	403,9 (0 - 941)
Total	29	0 (0 - 180)	619,2 (237,7 – 1.440)	709,3 (42,26 – 1.047)
<b>IL-6</b>				
Positivo	10	0 (0 - 62,33)	506,6 (337 - 799,4)	303,2 (169,2 - 594,7)
Negativo	19	0 (0 - 30,78)	246,1 (135,1 - 437,9)	160,5 (86,16 -257,7)
Total	29	0 (0 - 42,21)	310,9 (189,5 - 560)	199,7 (131,9 - 371,9)

Valores em pg/mL(estímulo subtraído por salina), apresentados em mediana (25 % percentil - 75 % percentil) Os critérios utilizados para identificar como infectados por *Leishmania infantum* foram, cultura, ou qPCR, ou ELISA. Avaliação dos animais quanto ao resultado de DTH. O critério utilizado foi Reação de Hipersensibilidade Tardia (DTH) positivo ou negativo. Estes foram correlacionados com o resultado do ensaio milliplex para avaliar o perfil de citocinas presente em cada grupo

**Apêndice 10 Valores de mediana e percentil da produção de TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-6 do segundo grupo de cães de área endêmica para leishmaniose visceral**

Grupo	N	SLA	rLci2-NT-CT	rLci2-NT-5R-CT	KMP-11
		<b>TNF-<math>\alpha</math></b>			
Controle negativo	9	53,46 (0 - 293,4)	0 (0 - 11,79)	0 (0 - 377,1)	2.160 (344,7 – 5.743)
Com baixo escore clínico	10	1.756 (1.021 – 2.445)	228,7 (47,66 – 575,9)	601,2 (315,8 – 1.441)	8.967 (4.119 – 18.006)
Com alto escore clínico	8	1.513 (32,31 – 5.052)	68,67 (0 – 297,5)	92,79 (0 – 648,8)	8.838 (4.348 – 26.160)
Total	36	1.081 (157,2- 2.385)	62,69 (0 – 267,7)	334 (27,7 – 741,6)	6.144 (2.979 – 13.484)
<b>IL-2</b>					
Controle negativo	9	0 (0 - 3015)	0 (0 - 0)	0 (0 - 10,67)	13,5 (0 - 1048)
Com baixo escore clínico	10	0 (0 - 0)	0 (0 – 26,69)	0 (0 0 25,92)	0 (0 - 0)
Com alto escore clínico	8	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 – 23,13)
Total	36	0 (0 - 0)	0 (0 – 18,99)	0 (0 – 13,86)	0 (0 – 0)
<b>IL-10</b>					
Controle negativo	9	287,3 (133,8 - 657)	0 (0 - 82,44)	0 (0 - 969)	10385 (4628 - 16416)
Com baixo escore clínico	10	6.258 (2.719 – 24.306)	1.602 (247 – 4.492)	1.741 (611,9 – 11.046)	20.876 (11.713 – 33.490)
Com alto escore clínico	8	2.522 (0 – 14.967)	72,9 (0 – 512,7)	203,1 (0 – 3.134)	28.014 (6.219 – 46.260)
Total	36	2.615 (320 – 13.928)	181,6 (0 – 2.770)	785,7 (0 - 3.660)	19.285 (7.975 – 33.280)
<b>IL-6</b>					
Controle negativo	9	40,86 (0 - 222)	0 (0 - 15,98)	52,38 (0 - 158,9)	1.182 (30,38 – 1.609)
Com baixo escore clínico	10	392,2 (205,9 – 692,5)	106,2 (48,94 – 247,4)	261,1 (75,47 -412,9)	1.066 (753,2 – 1.907)
Com alto escore clínico	8	226,4 (0 – 600,9)	74,7 (0 - 237)	161,7 (31,59 - 495,8)	1.459 (647,3 – 2.040)
Total	36	262,5 (39,85- 485,9)	67,28 (0 – 206,3)	158,3 (36,38 – 357,8)	1.146 (668,3 – 1.759)

Valores em pg/mL(estímulo subtraído por salina), apresentados em mediana (25 % percentil - 75 % percentil) Os critérios utilizados para identificar como infectados por *Leishmania infantum* foram, cultura, ou qPCR, ou ELISA. Estes cães foram acompanhados durante dois anos. O histórico dos escores clínicos avaliados durante o acompanhamento foi utilizado para classificação como resistentes ou susceptíveis. Os cães então classificados, foram correlacionados com o resultado do ensaio milliplex para identificar o perfil de citocinas presente em cada grupo.

**Apêndice 11 Valores de mediana e percentil da produção de TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-6 de cães positivos e negativos para o teste de hipersensibilidade tardia no segundo grupo.**

		SLA	rLci2-NT-CT	rLci2-NT-5R-CT	KMP11
<b>Teste de DTH</b>	<b>N</b>	<b>IL-2</b>			
Positivo	9	0 (0 - 20,3)	0 (0 - 0)	0 (0 - 10,2)	0 (0 - 0)
Negativo	18	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)
Total	27	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)
		<b>IL-6</b>			
Positivo	9	114 (68 - 69)	31,23 (0 - 60,05)	51,63 (25,2 - 110,4)	416,8 (195,1 - 596,1)
Negativo	18	104,4 (25,61 - 254,6)	34,7 (10,15 - 79,3)	105,6 (15,68 - 165,5)	353 (246,5 - 684,5)
Total	27	114 (61,92 - 200,3)	31,74 (0 - 78,99)	82,02 (20,91 - 140,6)	370,1 (247,4 - 679,9)
		<b>IL-10</b>			
Positivo	9	1.917 (455,7 - 7.169)	943,5 (135,6 - 1.737)	672 (232,6 - 6.819)	6.628 (2.984 - 11.270)
Negativo	18	1.581 (706,9 - 7.561)	55,67 (0 - 456,7)	161,6 (0 - 1.296)	7.118 (3.041 - 14.730)
Total	27	1629 (534,6 - 7291)	109,6 (0 - 1.001)	355,1 (0 - 1.350)	7.007 (3.291 - 12.561)
		<b>TNF-<math>\alpha</math></b>			
Positivo	9	636,2 (354 - 779,9)	79,47 (7,06 - 301,8)	257,5 (111 - 470,1)	2.415 (1.217 - 3.865)
Negativo	18	467,7 (206,8 - 1640)	29,18 (11,16 - 91,73)	113,4 (22,01 - 256,1)	3.251 (1.510 - 9.446)
Total	27	534,8 (309 - 904,9)	33,45 (14,13 - 101,8)	129,5 (30,93 - 375,5)	2.949 (1.449 - 6.574)

Valores em pg/mL(estímulo subtraído por salina), apresentados em mediana (25 % percentil - 75 % percentil) Os critérios utilizados para identificar como infectados por *Leishmania infantum* foram, cultura, ou qPCR, ou ELISA. Avaliação dos animais quanto ao resultado de DTH. O critério utilizado foi Reação de Hipersensibilidade Tardia (DTH) positivo ou negativo. Estes foram correlacionados com o resultado do ensaio milliplex para avaliar o perfil de citocinas presente em cada grupo.

## Apêndice 12 Ficha clínica de avaliação dos cães de área endêmica para leishmaniose visceral

**Data do Exame \***

Now

**Iniciais do Veterinário \***

**Numero de Identificação do Animal \***

**Nome do Animal \***

**Sexo \***

Macho  
 Fêmea

**Raça \***

Mestiço  
 Puro

**Se puro, que raça \***

**Pelagem \***

Curta  
 Média  
 Longa

**Porte \***

Toy 0-3 kg, Pequeno 4-10kg, Médio 11-20kg, Grande 21-40kg, Gigante >40kg

Toy  
 Pequeno  
 Médio  
 Grande  
 Gigante

**Idade Estimada \***

Idoso >7 anos, Adulto 5-7 anos, Adulto Jovem 3-4 anos, Jovem 1-2 anos, Filhote 0-1 ano

Idoso  
 Adulto  
 Adulto Jovem  
 Jovem  
 Filhote

**Comprimento (em cm) \***

Medir desde a nuca até a inserção da cauda

**Altura (em cm) \***

Medir desde o chão até o topo da paleta

**Estado Nutricional \***

Normal ou obeso (0)  
 Magro (1)  
 Caquético (2)

**Coloração de Mucosas \***

- Normal (0)
- Anêmica (1)

**Onicogribose \***

- Ausente (0)
- Discreto Aumento (1)
- Aumento Expressivo (2)

**Volume do Baço \***

- Não Palpável (0)
- Palpável (1)

**Linfonodos \***

- Normais (0)
- Aumentados, Um ou dois do mesmo par (1)
- Aumentados, dois de pares diferentes (2)

**Dermatite Periorcular \***

- Ausente (0)
- Ao redor de um olho (1)
- Dois olhos (2)

**Crosta em ponta de orelha \***

- Ausente (0)
- Apenas em uma orelha (1)
- Nas duas orelhas (2)

**Ulcera na orelha \***

- Ausente (0)
- Apenas em uma orelha (1)
- Nas duas orelhas (2)

**Despigmentação no focinho \***

- Ausente (0)
- Presente em menos de 1/3 da ponta do focinho (1)
- Presente em mais de 1/3 da ponta do focinho (2)

**Hiperqueratose no focinho \***

- Ausente (0)
- Presente em menos de 1/3 da ponta do focinho (1)
- Presente em mais de 1/3 da ponta do focinho (2)

**Lesão no focinho \***

- Ausente (0)
- Crosta (1)
- Úlcera (2)

**Alopecia \***

- Ausente (0)
- Presente de forma focal em algumas regiões (1)
- Disseminada – mais que 1/3 do corpo do animal (2)

**Dermatite furfurácea \***

- Ausente (0)
- Presente de forma focal em algumas regiões (1)
- Disseminada – mais que 1/3 do corpo do animal (2)

**Presença de carrapatos \***

- Sim
- Não

**Presença de Pulgas \***

- Sim
- Não

**Resultado DPP \***

- Positivo fraco
- Positivo
- Negativo

**Observações**