

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Envolvimento de citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição na imunopatologia da pele de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas e densidades parasitárias cutâneas

por

Daniel Menezes Souza

Belo Horizonte

Agosto/2009

DISSERTAÇÃO MDIP-CPqRR	D.M. SOUZA	2009
------------------------	------------	------

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Envolvimento de citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição na imunopatologia da pele de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas e densidades parasitárias cutâneas

por

Daniel Menezes Souza

Dissertação apresentada com vistas à
obtenção do Título de Mestre em Ciências
na área de concentração Doenças
Infecciosas e Parasitárias.

Orientação: Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira

Co-orientação: Dr. Alexandre Barbosa Reis

Belo Horizonte

Agosto/2009

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

S819e Souza, Daniel Menezes
2009

Envolvimento de citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição na imunopatologia da pele de cães naturalmente infectados por Leishmania (Leishmania) chagasi, portadores de diferentes formas clínicas e densidades parasitárias cutâneas/Daniel Menezes Souza. – Belo Horizonte, 2009.

XXIII, 166: il, 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 169-189

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Leishmaniose Visceral/imunologia 2.
Leishmania/parasitologia 3. Cães/imunologia 4.
Cães/parasitologia. I. Título. II. Oliveira, Rodrigo Corrêa
(Orientação). III. Reis, Alexandre Barbosa (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Envolvimento de citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição na
imunopatologia da pele de cães naturalmente infectados por *Leishmania*
(*Leishmania*) *chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas e densidades
parasitárias cutâneas

por

Daniel Menezes Souza

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira (Presidente)

Prof. Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal

Prof. Dr. Oscar Bruna Romero

Suplente: Prof. Dra. Célia Maria Gontijo

Dissertação defendida e aprovada em: 17/08/2009

COLABORADORES

Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ) - Belo Horizonte/MG

Dr^a. Andréa Teixeira Carvalho - Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração

Dr. Olindo Assis Martins Filho - Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração

Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) - Ouro Preto/MG

Prof^a. Renata Guerra de Sá - Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular/NUPEB

Prof. Rodolfo Cordeiro Giunchetti - Laboratório de Imunopatologia/NUPEB

Doutoranda Juliana Vitoriano de Souza - Laboratório de Imunopatologia/NUPEB

APOIO

UFOP - Universidade Federal de Ouro Preto

CPqRR/FIOCRUZ/MG - Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz

SUPORTE FINANCEIRO

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal em Nível Superior

PRONEX 2007: FAPEMIG/CNPq

*Dedico esse trabalho aos meus pais
Afrânio e Eliana e aos meus irmãos Cleiton e Carla*

*“Só podemos entender as coisas
a partir da nossa própria perspectiva”*

Mark W. Baker

Agradecimentos

A Deus pela presença constante em minha vida, por me guiar e dar força para superar todos os obstáculos.

Aos meus queridos pais, Afrânio e Eliana, pelo incontestável apoio e incentivo na execução dessa etapa da minha vida. Saber que posso contar sempre com vocês torna mais fácil o meu caminho.

Aos meus irmãos Cleiton e Carla, por fazerem parte da minha vida, e mesmo distantes sempre me deram apoio durante essa etapa.

Ao Prof. Alexandre Barbosa Reis, por ter acolhido a mim no grupo de leishmaniose visceral canina da UFOP e pela confiança depositada no desenvolvimento desse projeto. Obrigado por ter acreditado em mim mesmo sem ter tido a experiência prévia de trabalharmos juntos no âmbito da pesquisa. Sinto-me privilegiado em ter sido orientado por um dos maiores pesquisadores no âmbito da LVC, que devido a sua competência e dedicação, construiu e consolidou um grupo de pesquisa com grande reconhecimento nacional e internacional. Seu exemplo de profissionalismo, competência e engajamento com o trabalho, motivam muitos a seguir a vida acadêmica. MUITO OBRIGADO.

A Prof^ª. Renata Guerra de Sá agradeço por ter aceitado o desafio de fazer parte desse trabalho e por me incluir como membro do LBBM/UFOP. Obrigado pelos ensinamentos em técnicas de biologia molecular, que sem dúvida, foram imprescindíveis para a padronização e obtenção dos resultados. Além disso, agradeço pela oportunidade de participar em diversos trabalhos no âmbito da biologia molecular de parasitos. Agradeço também pelos inúmeros momentos de descontração e conselhos ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira meu imenso agradecimento por ter me recebido no LICM e aceitado a orientação desse trabalho. Obrigado pelo incentivo para a execução desse projeto e por disponibilizar a estrutura do seu laboratório para execução desse trabalho, onde em parte foi desenvolvido. Agradeço pelo apoio e exemplo profissional.

Ao Prof. Rodolfo Cordeiro Giunchetti pela imensa contribuição na análise crítica dos resultados desse trabalho, além das inúmeras sugestões na elaboração do artigo e no desenvolvimento do trabalho escrito dessa dissertação. Agradeço pela amizade, disponibilidade e exemplo de profissionalismo e competência.

Ao GRANDE amigo Roenick, primeiramente por ter me acolhido inicialmente na sua república na minha volta para Ouro Preto. Agradeço também pelos ensinamentos em técnicas de Biologia Molecular e pela imensa contribuição na padronização e obtenção de grande parte dos resultados desse trabalho. Agradeço pela amizade, apoio e conselhos, além dos inúmeros momentos de descontração durante esse período, que sem dúvida foram essenciais para a conclusão desse trabalho.

Aos meus amigos Matheus Fernandes, Matheus Souza e José Eloy, com que sempre pude contar em todos os momentos que precisei durante a execução desse trabalho. Agradeço pelos inúmeros momentos agradáveis de descontração, pelo companheirismo. Além disso, sou grato pelos conselhos e ajuda em muitos momentos difíceis que passei durante o desenvolvimento desse trabalho. A amizade de vocês foi essencial para a conclusão dessa etapa em minha vida. **MUITO OBRIGADO** a vocês.

A Clari Lopes Gandra, secretária no LICM/CPqRR, meu imenso agradecimento pela disponibilidade e competência para solucionar todos os problemas burocráticos da rotina do laboratório. Além disso, por ser uma pessoa extremamente agradável de conviver, pelos conselhos, incentivos e ajuda em todos os momentos que precisei. **MUITO OBRIGADO**.

Aos amigos do LBBM/UFOP, Nilza, Natália, Roberta Verciano, Roberta D`angelo, Nayara (Loira), Bahiana, Gustavo, Leonardo, Letícia, Leandro G., Leandro, Leonardo, Karine, pela amizade, conselhos e agradáveis momentos dentro e fora do laboratório.

Aos amigos do LICM/CPqRR e LBDM/CPqRR: Ana Carolina Campi, Ana Thereza, Andréa Rizia, Fernanda, Helena, Jaqueline Fiúza, Jerusa, Juliana, Laís, Livia, Nilton, Paulinha, Pedro, Rafele, Ricardo, Roberta, pelo agradável convívio, amizade e momentos de descontração.

Aos amigos do LIMP Bruno, Paula, Juliana, Nádia, Henrique, Rodrigo, Kelly, Fernando,

Thaís, Flávia, Samuel, Wendel, Amanda, Sheler, pela amizade e agradável convivência.

Aos pesquisadores colaboradores desse trabalho, Dr^a. Andréa Teixeira Carvalho, Dr. Olindo Assis Martins Filho, pelas contribuições que deram na análise crítica e no amadurecimento dos resultados.

Ao meu Tio-avô Waldir, por ter me acolhido em sua casa logo após a minha entrada na pós-graduação. Agradeço pela exemplo de vida e sabedoria.

Ao professores do LBBM Elísio e Babá pela agradável convivência e “dicas” durante padronização da parte técnica.

As “meninas” de Ribeirão Preto, Enyara, Camila, Silvia, Luciana, e Carla pela acolhida, agradável convivência e amizade durante o período de treinamento na USP.

Aos amigos da pós-graduação Cristiane, Marco Pólo, Andressa, Helena, Ana, pela amizade e momentos agradáveis.

Ao amigo Luciano, pela amizade e agradável convivência, além da hospedagem em BH nas inúmeras vezes em que precisei durante a execução desse trabalho. MUITO OBRIGADO.

A funcionária do CPqRR Solange (portaria) pela presteza, dedicação e agradável convivência.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde, custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

Em especial gostaria de agradecer a Mariana, que apesar de ter entrado na minha vida na metade do desenvolvimento desse trabalho, teve uma participação fundamental para conseguir concluí-lo. Agradeço pela imensa ajuda em todas as minhas decisões, pelo carinho e amor, além do grande companheirismo sempre demonstrado por você. MUITO OBRIGADO, sua presença em minha vida é valiosa.

Sumário

Lista de figuras	XIII
Lista de tabelas	XVII
Lista de Abreviaturas	XVIII
Resumo	XX
Abstract	XXII
1 Introdução	24
2 Revisão Bibliográfica	29
2.1 Aspectos imunopatológicos da leishmaniose visceral canina	30
3 Objetivos	42
3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos	43
4 Materiais e Métodos	44
4.1 Animais, pré-seleção e manejo	45
4.1.1 <i>Diagnóstico sorológico e caracterização clínica dos cães</i>	45
4.1.2 <i>Procedimentos técnicos realizados para a necropsia dos cães</i>	47
4.2 Avaliação da expressão gênica por qRT-PCR	48
4.2.1 <i>Extração e purificação do RNA total das amostras de tecido</i>	48
4.2.2 <i>Quantificação e avaliação do grau de pureza do RNA total extraído</i>	50
4.2.3 <i>Integridade do RNA extraído</i>	50
4.2.4 <i>Transcrição reversa (síntese da 1ª fita de DNA complementar - cDNA)</i>	51
4.2.5 <i>Desenho dos iniciadores (primers)</i>	52
4.2.6 <i>Validação dos iniciadores</i>	53
4.2.7 <i>Avaliação dos amplicons gerados utilizando gel de agarose a 1,2%</i>	53
4.2.8 <i>Deteção dos níveis de citocinas, fatores de transcrição e quimiocinas por qRT-PCR</i>	56
4.2.9 <i>Avaliação da curva de dissociação dos iniciadores</i>	56
4.2.10 <i>Avaliação da curva de eficiência dos iniciadores</i>	59
4.3 Clonagem, sequenciamento e análise das sequências	61
4.3.1 <i>Purificação dos amplicons</i>	61
4.3.2 <i>Reação de ligação de produto de PCR ao plasmídeo p-GEM-T Easy Vector Systems</i>	61
4.3.3 <i>Preparação de células competentes (Escherichia coli – cepa DH5α)</i>	62
4.3.4 <i>Transformação bacteriana</i>	62
4.3.5 <i>Purificação dos plasmídeos recombinantes por lise alcalina</i>	63
4.3.6 <i>Sequenciamento e análise das sequências</i>	64
4.4 Análise da celularidade tecidual através da contagem diferencial de leucócitos nas amostras de pele	66
4.5 Análise estatística dos dados	67
5 Resultados	68
5.1 Capítulo I: Correlação entre formas clínicas da LVC e densidade parasitária na pele de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i>	70
5.1.1 <i>Correlação entre forma clínica da LVC e densidade parasitária na pele de cães naturalmente infectados por L. chagasi avaliado através do índice de parasitismo tecidual</i>	71

5.2 Capítulo II: Parâmetros imunológicos e histopatológicos no tecido cutâneo de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> e sua associação com estado clínico na leishmaniose visceral canina	72
5.2.1 Avaliação da expressão de citocinas Tipo I, II e imunoreguladoras em cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> e cães não infectados e sua correlação com o estado clínico da LVC	73
5.2.2 Avaliação da razão de citocinas de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> e cães não infectados e sua associação com o estado clínico da LVC.....	75
5.2.3 Avaliação da expressão dos fatores de transcrição T-bet, GATA-3 e FOXP3 na pele de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> e cães não infectados e sua correlação com o estado clínico da LVC	76
5.2.4 Avaliação da expressão de quimiocinas na pele de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> e cães não infectados e sua correlação com o estado clínico da LVC	78
5.2.5 Avaliação do perfil celular inflamatório na pele de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> e cães não infectados e sua correlação com o estado clínico da LVC	80
5.3 Capítulo III: Influência da densidade parasitária cutânea sobre parâmetros imunológicos e histopatológicos deste tecido em cães naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i> .	83
5.3.1 Avaliação da expressão de citocinas Tipo I, II e imunoreguladoras em cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> e cães não infectados e sua correlação com a densidade parasitária cutânea	84
5.3.2 Avaliação da razão de citocinas de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> e cães não infectados e sua associação com a densidade parasitária cutânea.....	86
5.3.3 Avaliação da expressão dos fatores de transcrição T-bet, GATA-3 e FOXP3 na pele de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> e cães não infectados e sua associação com a densidade parasitária cutânea.....	87
5.3.4 Avaliação da expressão de quimiocinas na pele de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> e cães não infectados e sua associação com a densidade parasitária cutânea	89
5.3.5 Avaliação do perfil celular inflamatório na pele de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> e cães não infectados e sua correlação com a densidade parasitária cutânea.....	91
5.4 Capítulo IV: Correlação entre a expressão de citocinas do Tipo I com citocinas do Tipo II e com citocinas imunoreguladoras em cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i>	93
5.4.1 Análise de correlação entre a expressão de citocinas Tipo I com citocinas do Tipo II e com citocinas imunoreguladoras em cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> .	94
5.5 Capítulo V: Correlação entre a expressão de quimiocinas e a celularidade tecidual em cães naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i>	96
5.5.1 Análise da correlação entre a expressão de quimiocinas e a celularidade tecidual em cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i>	97
5.6 Resumo dos resultados	98
5.6.1 Diagrama dos principais resultados encontrados nesse estudo.....	100
6 Discussão	101
7 Conclusão	126
8 Perspectivas	129
9 Anexos	131
9.1 Análise de correlação entre a expressão de citocinas e fatores de transcrição na pele de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i>	132
9.2 Análise de correlação entre a expressão de citocinas e quimiocinas na pele de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i>	133

9.3 Análise de correlação entre a expressão de citocinas e a celularidade tecidual na pele de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i>	134
9.4 Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo).....	135
9.4.1 “ <i>The role of cytokines and transcription factors in dermis of dogs naturally infected with L. chagasi with different parasite density</i> ”. XXIV Meeting of the Brazilian Society of Protozoology XXXV Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease, 2008, Águas de Lindóia.....	135
9.4.2 “ <i>Asymptomatic dogs naturally infected with L. chagasi present high expression of IFN-γ, TNF- A, IL-13 and GATA-3 in dermal compartment</i> ”. XXIV Meeting of the Brazilian Society of Protozoology XXXV Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease, 2008, Águas de Lindóia.	136
9.5 Artigo submetido para publicação.....	137
9.6 Outros trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)	168
10 Referências	169

Lista de figuras

- Figura 1:** Gel desnaturante de RNA total. Na figura é possível visualizar bandas íntegras referentes às subunidades ribossômicas 5S, 18S e 28S das amostras de RNA total extraídas de duas amostras de cães utilizados nesse estudo.....51
- Figura 2:** Análise dos produtos de PCR gerados a partir da reação de PCR em tempo real em gel de agarose a 1,2%. Na primeira canaleta da esquerda encontra-se o padrão de peso molecular sendo evidenciados os pesos de 100 e 600 pares de base (pb). Na figura está demonstrado também os produtos de PCR obtidos a partir dos primers referente aos seguintes genes: GAPDH (115pb), IL-12p40 (109pb), IFN- γ (113pb), TNF- α (94pb), IL-4 (123pb), IL-5 (106pb) e TGF- β 1 (134pb).....54
- Figura 3:** Curva de dissociação referente aos iniciadores GAPDH, IL-12p40, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10. No eixo x está representado a temperatura de dissociação do *amplicon* gerado pela reação de PCR e no eixo Y a derivada do valor de emissão de fluorescência.....57
- Figura 4:** Curva de dissociação referente aos iniciadores TGF- β 1, T-bet, GATA-3, FOXP3, CCL2, CCL4, CCL5 e CCL13. No eixo x está representado a temperatura de dissociação do *amplicon* gerado pela reação de PCR e no eixo Y a derivada do valor de emissão de fluorescência.....58
- Figura 5:** Curva de dissociação referente aos iniciadores CCL17, CCL21, CCL24 e CXCL8. No eixo x está representado a temperatura de dissociação do *amplicon* gerado pela reação de PCR e no eixo Y a derivada do valor de emissão de fluorescência.....59
- Figura 6:** *Plot* de amplificação referente à curva de eficiência do GAPDH utilizando diluição seriada de 10x de cDNA. Em X está demonstrado o valor dos ciclos de PCR e em Y os valor de ΔRn60
- Figura 7:** Curva padrão referente ao gene GAPDH utilizando diluição seriada de 10x de cDNA. Em X estão demonstrados os valores de Log da concentração de cDNA e em Y os valores de C_T correspondentes a cada diluição. A direita do gráfico estão representados os valores de *slope* e de coeficiente de linearidade.....60
- Figura 8:** Mapa do vetor p-GEM-T Easy Vector System. A seqüência representada mostra a região de clonagem, os sítios para enzimas de restrição, região codificadora para o gene de resistência e para β -galactosidase.....61
- Figura 9:** Densidades parasitárias determinadas pelos índices de parasitismo (IP) na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da doença. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimos, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. Cães assintomáticos=CA (■, n=10); cães oligossitomáticos=CO (■, n=10); cães sintomáticos=CS

(■,n=15). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representada pela letra a, correspondente ao grupo CA. As análises de correlação foram estabelecidas utilizando a correlação de Spearman e os valores de coeficiente linear (r) e p-value (p) estão demonstrados no canto superior esquerdo do gráfico.....71

Figura 10: Análise da expressão de RNAm de citocinas do Tipo I, II e imunoreguladoras na pele de cães não infectados e cães naturalmente infectados por *L. chagasi* portadores de diferentes formas clínicas. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimos, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. Cães não infectados=CNI (■,n=16); cães assintomáticos=CA (■,n=10); cães oligossitomáticos=CO (■,n=10); cães sintomáticos=CS (■,n=15). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a, b e c correspondente aos grupos CNI, CO e CS, respectivamente. As análises de correlação foram estabelecidas considerando todos os dados de animais infectados (CA, CO e CS) e os valores de coeficiente linear (r) e p-value (p) estão sendo demonstrados apenas nos gráficos onde foi encontrada correlação significativa.....74

Figura 11: Avaliação da celularidade na pele de cães não infectados e cães naturalmente infectados por *L. chagasi* portadores de diferentes formas clínicas. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimos, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. Cães não infectados=CNI (■,n=16); cães assintomáticos=CA (■,n=10); cães oligossitomáticos=CO (■,n=10); cães sintomáticos=CS (■,n=15). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a,b e c correspondentes aos grupos CNI, CA e CO, respectivamente. As análises de correlação foram estabelecidas utilizando apenas os grupos com animais infectados (CA, CO e CS) e os valores de coeficiente linear (r) e p-value (p) estão sendo demonstrados apenas nos gráficos onde foi encontrada correlação significativa.....77

Figura 12: Avaliação da expressão de RNAm de quimiocinas na pele de cães não infectados e cães naturalmente infectados por *L. chagasi* portadores de diferentes formas clínicas. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimos, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. Cães não infectados=CNI (■,n=16); cães assintomáticos=CA (■,n=10); cães oligossitomáticos=CO (■,n=10); cães sintomáticos=CS (■,n=15). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representada pela letra a correspondente ao grupo CNI. As análises de correlação foram estabelecidas utilizando apenas os grupos com animais infectados (CA, CO e CS) e os valores de coeficiente linear (r) e p-value (p) estão sendo demonstrados apenas nos gráficos onde foi encontrada correlação significativa.....79

Figura 13: Avaliação da celularidade na pele de cães não infectados e cães naturalmente infectados por *L. chagasi* portadores de diferentes formas clínicas. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimos, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. Cães não infectados=CNI (■,n=16); cães assintomáticos=CA (■,n=10); cães oligossitomáticos=CO (■,n=10); cães sintomáticos=CS (■,n=15). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b correspondentes aos grupos CNI e CS, respectivamente. As análises de correlação foram estabelecidas utilizando apenas os grupos com animais infectados (CA, CO e CS) e os

valores de coeficiente linear (r) e p-value (p) estão sendo demonstrados apenas nos gráficos onde foi encontrada correlação significativa.....81

Figura 14: Fotomicrografias coradas por HE do infiltrado celular da pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. Está demonstrado o infiltrado celular dos seguintes grupos: CNI (A, B); CA e BP (C e D); CO e MP (E e F) e CS e AP (G e H). Estão sendo ilustradas fotomicroscopias com aumento de 10x (barra: 100 μ m), 40x (barra: 25 μ m).....82

Figura 15: Análise da expressão de RNAm de citocinas do Tipo I, II e imunoreguladoras na pele de cães não infectados e cães naturalmente infectados por *L. chagasi* portadores de diferentes densidades parasitárias na pele. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimos, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. Cães não infectados=CNI (■, $n=16$); cães c/ baixo parasitismo=BP (■, $n=12$); cães c/ médio parasitismo=MP (■, $n=11$); cães c/ alto parasitismo=AP (■, $n=12$). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras *a*, *b*, *c* e *d* correspondente aos grupos CNI, BP, MP e AP, respectivamente. As análises de correlação foram estabelecidas considerando todos os dados de animais infectados (BP, MP e AP) e os valores de coeficiente linear (r) e p-value (p) estão sendo demonstrados apenas nos gráficos onde foi encontrada correlação significativa.....85

Figura 16: Avaliação da celularidade na pele de cães não infectados e cães naturalmente infectados por *L. chagasi* portadores de diferentes densidades parasitárias na pele. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimos, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. Cães não infectados=CNI (■, $n=16$); cães c/ baixo parasitismo=BP (■, $n=12$); cães c/ médio parasitismo=MP (■, $n=11$); cães c/ alto parasitismo=AP (■, $n=12$). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pela letra *a* correspondente ao grupo CNI. As análises de correlação foram estabelecidas utilizando apenas os grupos com animais infectados (BP, MP e AP) e os valores de coeficiente linear (r) e p-value (p) estão sendo demonstrados apenas nos gráficos onde foi encontrada correlação significativa.....88

Figura 17: Avaliação da expressão de RNAm de quimiocinas na pele de cães não infectados e cães naturalmente infectados por *L. chagasi* portadores de diferentes densidades parasitárias na pele. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimos, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. Cães não infectados=CNI (■, $n=16$); cães c/ baixo parasitismo=BP (■, $n=12$); cães c/ médio parasitismo=MP (■, $n=11$); cães c/ alto parasitismo=AP (■, $n=12$). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representada pela letra *a* correspondente ao grupo CNI. As análises de correlação foram estabelecidas utilizando apenas os grupos com animais infectados (BP, MP e AP) e os valores de coeficiente linear (r) e p-value (p) estão sendo demonstrados apenas nos gráficos onde foi encontrada correlação significativa.....90

Figura 18: Avaliação da celularidade na pele de cães não infectados e cães naturalmente infectados por *L. chagasi* portadores de diferentes densidades parasitárias na pele. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimos, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. Cães não infectados=CNI (■, $n=16$); cães c/ baixo parasitismo=BP (■, $n=12$); cães c/ médio parasitismo=MP (■, $n=11$); cães c/ alto parasitismo=AP (■, $n=12$). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pela letra *a* correspondente ao grupo CNI. As

análises de correlação foram estabelecidas utilizando apenas os grupos com animais infectados (BP, MP e AP) e os valores de coeficiente linear (r) e p-value (p) estão sendo demonstrados apenas nos gráficos onde foi encontrada correlação significativa.....92

Figura 19: Análise da correlação da expressão de citocinas mistas na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. Os símbolos representam os valores pontuais dos cães com LVC. As análises de correlação foram estabelecidas utilizando apenas os grupos com animais infectados por *L. chagasi* e os valores do coeficiente linear (r) e p-value (p) estão demonstrados na parte superior dos gráficos. As linhas apresentadas sobre os gráficos ilustram as tendências das diferentes correlações.....95

Figura 20: Diagrama ilustrativo das principais alterações encontradas na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, de acordo com estado clínico e densidade parasitária cutânea. As alterações em destaque no quadro branco mostram as alterações encontradas em comum aos grupos CA, CO e CS com os grupos BP, MP e AP, respectivamente. As setas apontadas para baixo representam diminuição dos parâmetros, enquanto as setas apontadas para cima representam aumento dos parâmetros avaliados na pele dos cães infectados por *L. chagasi*.....100

Lista de tabelas

Tabela I: Número de animais por grupo apresentando determinado sinal clínico.....	47
Tabela II: Sequência de iniciadores <i>forward</i> e <i>reverse</i> referente aos genes avaliados, função, tamanho do <i>amplicon</i> gerado, número de acesso das sequências no Gene Bank, eficiência da reação de qPCR e R^2 dos primers utilizados, avaliado através de uma curva de eficiência.....	55
Tabela III: Análise das sequências de <i>amplicons</i> referente aos genes avaliados. Está sendo mostrado o número de acesso das sequências no Gene Bank, a identidade com as sequências no GenBank e o <i>E-value</i>	66
Tabela IV: Análise da razão de citocinas de acordo com estado clínico da LVC.....	75
Tabela V: Análise da razão de citocinas de acordo com densidade parasitária cutânea.....	86
Tabela VI: Análise de correlação entre a expressão de quimiocinas e a celularidade tecidual na pele de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> . As análises de correlação foram estabelecidas considerando todos os dados de animais infectados por <i>L. chagasi</i> e os valores de coeficiente linear (<i>r</i>) e p-value (<i>p</i>) estão demonstrados na tabela.....	97
Tabela VII: Análise de correlação entre a expressão de citocinas e fatores de transcrição na pele de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> . As análises de correlação foram estabelecidas utilizando todos os animais avaliados nesse estudo e os valores de coeficiente linear (<i>r</i>) e p-value (<i>p</i>) estão ilustrados.....	132
Tabela VIII: Análise de correlação entre a expressão de citocinas e quimiocinas na pele de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> . As análises de correlação foram estabelecidas considerando todos os dados de animais infectados por <i>L. chagasi</i> e os valores de coeficiente linear (<i>r</i>) e p-value (<i>p</i>) estão ilustrados.....	133
Tabela IX: Análise de correlação entre a expressão de citocinas e a celularidade tecidual na pele de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> . As análises de correlação foram estabelecidas considerando todos os dados de animais infectados por <i>L. chagasi</i> e os valores de coeficiente linear (<i>r</i>) e p-value (<i>p</i>) estão demonstrados na tabela.....	134

Lista de Abreviaturas

AP: Alto parasitismo

APCs: Células apresentadoras de antígeno

BP: Baixo parasitismo

Bp: Pares de bases

CA: Cães assintomáticos

C: γ -quimiocina

CC: β -quimiocina

CCZ: Centro de controle de zoonoses

cDNA: DNA complementar

CD: Grupo de diferenciação

CD4: Co-receptor para MHC de classe II. Expresso em subgrupos de timócitos, linfócitos T, monócitos e macrófagos.

CD8: Co-receptor para MHC de classe I. Expresso em subgrupos de timócitos e linfócitos T citotóxicos.

CD25: Marcador de ativação de leucócitos

CMSP: Células mononucleares do sangue periférico

CNI: Cães não infectados

CO: Cães oligossintomáticos

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CPqRR: Centro de Pesquisas René Rachou

CS: Cães sintomáticos

Ct: Ciclo do limiar de detecção

CX3C: δ -quimiocina

CXC: α -quimiocina

DEPC: Dietilpirocarbonato

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DNAg: Ácido desoxirribonucléico genômico

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

IFN- γ : Citocina interferon gama

Ig: Imunoglobulina

IL: Interleucina

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível
IPC: Índice de parasitismo cutâneo
KDa: Kilodalton
LDU: *Leishman Donovan Units*
LIT: *Liver Infusion Tryptose*
Log: Logarítimo
LVA: Leishmaniose Visceral Americana
LVC: Leishmaniose Visceral Canina
MHC: Complexo de histocompatibilidade principal
MP: Médio parasitismo
NO: Óxido nítrico
OMS: Organização Mundial da Saúde
PBH: Prefeitura de Belo Horizonte
PMNs: Células polimorfonucleares
PCR: Reação em cadeia da polimerase
RIFI: Reação de imunofluorescência indireta
RNAm: RNA mensageiro
Rpm: Rotações por minuto
SFM: Sistema fagocítico mononuclear
SLA: Antígeno solúvel de *Leishmania*
SRD: Sem raça definida
TGF- β : Fator de crescimento e transformação beta
Tm: Temperatura de fusão
TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa
T_{Reg}: Células T reguladoras (CD4⁺CD25^{HIGH})
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
XCL1: Linfotaxina

Resumo

A resposta imune na pele de cães infectados por *Leishmania chagasi* e sua associação com parasitismo tecidual e progressão clínica da leishmaniose visceral canina (LVC) é pouco compreendido e há poucos estudos disponíveis. Nesse trabalho, uma análise detalhada do perfil de citocinas (IFN- γ , IL-12p40, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13, IL-10 e TGF- β 1), fatores de transcrição (T-bet, GATA-3 e FOXP3) e quimiocinas (CCL2, CCL4, CCL5, CCL13, CCL17, CCL21, CCL24 e CXCL8), assim como, as células inflamatórias (neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, basófilos e linfócitos), foram realizados na pele de 35 cães naturalmente infectados usando PCR em tempo real juntamente com as determinações da densidade parasitária da pele e do estado clínico do LVC. Diante da complexa rede de interação citocinas/quimiocinas, de um modo geral, foi observado que vários biomarcadores evidenciados com o desenvolvimento do presente trabalho envolvidos na resistência apresentavam-se relacionados à forma assintomática e com baixo parasitismo, enquanto outros associados com suscetibilidade foram detectados simultaneamente em cães sintomáticos e com alto parasitismo cutâneo. Um perfil misto de citocina com altos níveis de expressão de IFN- γ , TNF- α , IL-5 e IL-13 foi determinado em cães assintomáticos. Adicionalmente, a manutenção da forma assintomática está intimamente envolvida com aumento da razão IFN- γ /IL-4 e com o controle do parasitismo dérmico que é caracterizado pelo aumento da razão IFN- γ /IL-10 e IL-12/IL-10, indicando que IFN- γ e IL-12 exercem um papel fundamental no equilíbrio da relação parasito/hospedeiro. Além disso, altos níveis de IL-10 e TGF- β 1, concomitante com a baixa expressão de IL-12, pode representar uma condição fundamental que permite a persistência da replicação do parasito na derme. Adicionalmente, os níveis dos fatores de transcrição GATA-3 e FOXP3 foram correlacionados com a doença assintomática. De forma interessante, cães oligossintomáticos parecem manifestar uma doença intermediária com determinadas tendências de padrão de resposta imune. Durante a passagem por essa forma clínica, ocorre um predomínio de citocinas moduladoras (IL-10 e TGF- β 1) na derme que explica o aumento progressivo da densidade parasitária observada nesses animais. Além disso, durante a passagem por esta forma oligossintomática os níveis de IL-13 decaem e em cães com médio parasitismo e passa a ocorrer uma migração preferencial de eosinófilos que estão intimamente relacionados ao aumento de CCL24. Com o avançar do parasitismo, forma-se um moderado infiltrado inflamatório decorrente da migração diferencial de macrófagos e linfócitos que é orquestrado

por citocinas do Tipo I (IL-12, TNF- α e IFN- γ) e fator de transcrição T-bet, presença marcante nesse microambiente. A forma grave da LVC é caracterizada pelo aparecimento de inúmeros sinais clínicos e por uma debilidade em controlar o parasitismo levando muitas vezes os cães ao óbito. Nesse contexto, a forma sintomática é marcada por uma queda de TNF- α e IL-13 associado a uma queda de expressão de GATA-3 e FOXP3 podendo explicar a inabilidade de macrófagos em controlar a infecção devido à perda da ação de TNF- α e IFN- γ , praticamente ausentes na pele. O intenso infiltrado inflamatório na derme é explicado por um perfil de citocinas Tipo I (TNF- α e IFN- γ) expressas concomitante com citocinas reguladoras (IL-10 e TGF- β) presentes nesse microambiente, reforçado por baixa expressão de IL-12 e IL-13. A visceralização do parasito leva a uma hipertrofia e hiperplasia de órgãos linfóides que pode estar sendo ocasionada pelo aumento dos níveis de CCL21 em animais com alto parasitismo cutâneo. Essa quimiocina é responsável pelo recrutamento de APCs presentes na pele e sua condução para os linfonodos no intuito de promover aumento da apresentação de antígenos parasitários aos linfócitos T, o que parece não ocorrer devido ao perfil de citocinas (Tipo II) e/ou reguladoras expressas por esses cães. Além do mais, as quimiocinas CCL2, CCL4 e CCL5 são responsáveis pelo orquestramento do fluxo celular de monócitos e plasmócitos para compor o intenso infiltrado inflamatório dérmico. Um avanço no conhecimento dos mecanismos que determinam a resposta imune protetora da infecção por *L. chagasi* nos cães permitirá o estabelecimento de uma estratégia racional para o desenvolvimento de vacinas e terapias imunológicas contra LVC.

Abstract

The immune response in the skin of dogs infected with *Leishmania chagasi* and its association with distinct levels of tissue parasitism and clinical progression of canine visceral leishmaniasis (CVL) are poorly understood and limited studies are available. In this work, a detailed analysis of the profiles of cytokines (IFN- γ , IL-12p40, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13, IL-10 e TGF- β 1), transcription factors (T-bet, GATA-3 and FOXP3) and chemokines (CCL2, CCL4, CCL5, CCL13, CCL17, CCL21, CCL24 and CXCL8), as well as, the inflammatory cells (neutrophils, eosinophils, macrophages, basophils and lymphocytes), were carried out in the dermis of 35 naturally infected dogs using Real-time PCR alongside determinations of skin parasite density and the clinical status of CVL. Given the complex network of interacting cytokines /chemokines, in general, it was observed that several biomarkers demonstrated with the development of this work involved in the resistance had to be related to the form asymptomatic and with low parasitism, while others associated with susceptibility were detected simultaneously in dogs with symptomatic and high parasitism skin. A mixed cytokine profile with high levels of expression of IFN- γ , TNF- α , IL-5 and IL-13 was determined in asymptomatic dogs. Additionally, the maintenance of the asymptomatic form is intimately involved with increase of the ratio IFN- γ /IL-4 and the control of skin parasitism that is characterized by increased of IL-12/IL-10 and IFN- γ /IL-10 ratio, indicating that IFN- γ and IL-12 play an essential role in the balance of the parasite/host. Moreover, high levels of IL-10 and TGF- β 1, concomitant with the low expression of IL-12, may represent a key condition that allows persistence of parasite replication in the dermis. Additionally, the levels of transcription factors GATA-3 and FOXP3 were correlated with the asymptomatic disease. Interestingly, dogs seem to express a disease oligosymptomatic intermediate with certain trends in the pattern of immune response. During the passage of this clinical form, there is a predominance of modulating cytokines (IL-10 and TGF- β 1) in the dermis, which explains the gradual increase in parasite density observed in these animals. Furthermore, during the passage through this form oligossintomática the levels of IL-13 and fell in dogs with moving average parasitism to occur a preferential migration of eosinophils that are closely related to the increase of CCL24. With the advance of parasitism, as was a moderate inflammatory infiltrate from the differential migration of macrophages and lymphocytes which is orchestrated by cytokines, Type I (IL-12, TNF- α and IFN- γ) and the transcription factor T-bet, significant presence in this microenvironment. A severe form of the LVC is characterized

by the appearance of numerous signs and a weakness in controlling parasitism often taking the dogs to death. In this context, the symptomatic form is marked by a decline of TNF- α and IL-13 associated with a decrease of expression of GATA-3 and FOXP3 may explain the inability of macrophages to control the infection due to loss of action of TNF- α and IFN- γ , virtually absent in the skin. The intense inflammatory infiltrate in the dermis is explained by a profile of Type I cytokines (TNF- α and IFN- γ) expressed concomitant regulatory cytokines (IL-10 and TGF- β 1) present in that microenvironment, enhanced by low expression of IL-12 and IL-13. The visceralization of the parasite leads to hypertrophy and hyperplasia of lymphoid organs that may be caused by increased levels of CCL21 in animals with a high skin parasitism. This chemokine is responsible for the recruitment of APCs in the skin and driving to the lymph nodes in order to promote increased of parasite presentation of antigens to T lymphocytes, which seems to occur due to the profile of cytokines (Type II) and/or regulatory expressed for these dogs. Additionally, the chemokines CCL2, CCL4 and CCL5 are responsible for orchestrated the flow cell of monocytes and plamocytes to compose the intense dermal inflammatory infiltrate. An advance in our knowledge of the mechanism that determines the protective immune response to *L. chagasi* infection in dogs will permit the establishment of a rational strategy for the development of vaccines and immunological therapies against CVL.

1 Introdução

As leishmanioses englobam um complexo grupo de doenças parasitárias caracterizado por uma diversidade de formas e manifestações clínicas, que se apresenta amplamente distribuída geograficamente e conta com a participação de diversos hospedeiros suscetíveis a infecção, como o homem e várias espécies de animais silvestres e domésticos (Desjeux 2004a). Portanto, do ponto de vista clínico, e considerando ainda a diversidade e complexidade biológica do parasito, dos vetores e dos hospedeiros vertebrados, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica as leishmanioses em quatro grandes grupos de acordo com o caráter espectral das manifestações clínicas apresentadas, como: cutânea, mucocutânea, cutâneo-difusa e visceral (OMS 2009). Em 1903, Ross descreveu o gênero *Leishmania*, o qual inclui os agentes etiológicos das leishmanioses como protozoários unicelulares, digenéticos e pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (Ross 1903, Levine et al. 1980, Lainson & Shaw 1987, Adl et al. 2005). Até o momento, já foram descritas mais de 20 espécies causadoras de leishmaniose e em torno de 30 espécies de flebotomíneos como prováveis vetores. Muitas formas são zoonóticas, onde humanos são acidentalmente infectados, mas nas formas antroponóticas, humanos são os únicos reservatórios do parasito (Desjeux 1996). Esses parasitos, quando estão presentes no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado, apresentam duas formas evolutivas distintas (promastigosta e paramastigota). No hospedeiro vertebrado, observam-se formas amastigotas ou aflageladas que residem no interior de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) (Grimaldi et al. 2001). A multiplicação dos parasitos, tanto no hospedeiro vertebrado quanto no invertebrado, ocorre por divisão binária (Bastien et al. 1992). A infecção no hospedeiro vertebrado ocorre no momento do repasto sanguíneo sobre a pele por fêmeas de flebotomíneos da família Phlebotomidae e gênero *Lutzomyia* no novo mundo ou *Phlebotomus* no velho mundo.

As leishmanioses encontram-se distribuídas em áreas endêmicas de 88 países, dentre os quais, 72 são classificados como países em desenvolvimento e 13 estão classificados como os países menos desenvolvidos do mundo (Desjeux 2004a,b). Estimativas indicam que cerca de 12 milhões de pessoas estejam infectadas por leishmanioses, com uma incidência anual de 1-1,5 milhões de casos de leishmaniose tegumentar (LT) e 500.000 casos de leishmaniose visceral (LV). A população em risco de contrair a doença é estimada em 350 milhões de pessoas em todo o mundo (Ashford et al. 1992, Ashford 1996, Desjeux 2001a,b, 2004a). Dentre os casos de LV, 90% ocorrem em zonas rurais e áreas suburbanas concentrando-se em cinco países - Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil. Atualmente, no Brasil, a LV está

registrada em 19 das 27 Unidades da Federação, com aproximadamente 1600 municípios apresentando transmissão autóctone (Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral 2006). As leishmanioses causam a perda de aproximadamente 2,4 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs), colocando essa patologia entre as dez doenças infecciosas de maior impacto para a saúde pública e como uma das principais doenças negligenciáveis presente em países em desenvolvimento (Desjeux 2004a, Hotez et al. 2004, Alvar et al. 2006). É importante ressaltar, que a forma clínica visceral, pode ser causada por três espécies de *Leishmania* que estão agrupadas no complexo denominado “*Donovani*”. A espécie *Leishmania (Leishmania) donovani* (Laveran & Mesnil 1903) e *L. (Leishmania) infatum* (Nicolle 1908), são responsáveis pelos casos de LV no velho mundo, atingindo partes do continente asiático, africano e europeu. No novo mundo, a doença acomete países da América Latina e é denominada leishmaniose visceral americana (LVA), tendo como agente etiológico o parasito da espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas 1937). Atualmente, foi sugerido por Maurício e colaboradores que devido às semelhanças nas características moleculares e bioquímicas entre as espécies *L. infatum* e *L. chagasi*, esses parasitos devem ser considerados como espécies sinônimas (Maurício et al. 1999, 2000).

Considerando a importância da LV, Magalhães et al. (1980) descreveram medidas de controle para o combate dessa doença, baseando-se em um tripé de ações, que envolve: (i) diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos, (ii) aspersão de inseticidas com efeito residual em domicílio e peridomicílio das habitações, com objetivo de controle vetorial, e (iii) eutanásia de cães infectados. Essa última medida é justificada pela ineficácia dos protocolos de tratamento e pela indisponibilidade até o momento, de uma vacina eficaz para ser empregada nesse hospedeiro pelo programa governamental de controle e profilaxia (Programa de Controle da Leishmaniose Visceral Canina – PCLV) do Ministério da Saúde/Brasil. A redução da população vetorial através do uso de inseticidas é uma medida fundamental para o controle da LV. Entretanto, a adoção dessa recomendação em áreas endêmicas, apresenta sérias dificuldades diante do alto custo e da dificuldade logística de aplicá-la em regiões de difícil acesso, fato esse que favorece a re-emergência, ou ainda, a manutenção dos casos de LV (Desjeux 2004a). Em relação ao controle do reservatório canino, o emprego dessa medida em áreas endêmicas mostrou ter impacto na redução dos casos humanos, porém esse efeito só pode ser observado com a manutenção dessa medida de forma sistemática e por longos períodos de forma ininterrupta através de uma rigorosa vigilância sanitária (Palatnik-de-Sousa et al. 2001). No entanto, a eliminação de cães soropositivos em áreas endêmicas é considerada

uma medida de alto custo e laboriosa, além de ser questionável pelos proprietários desses animais (Palatnik-de-Sousa et al. 2001). Esses aspectos ressaltam a necessidade de ampliar e intensificar estudos que investigam novos quimioterápicos e imunoprolifáticos para serem empregados no controle da leishmaniose visceral canina (LVC), possibilitando assim, o bloqueio da transmissão do parasito. Nesse sentido, algumas drogas e protocolos terapêuticos têm sido empregados no tratamento da LVC. No entanto, até o momento, não há qualquer esquema terapêutico capaz de promover a cura parasitológica do cão (Noli & Auxilia 2005, Ribeiro et al. 2008). Diante disso, o desenvolvimento de vacinas para LVC tem sido apontado como a principal estratégia para prevenir a infecção de cães, e conseqüentemente, reduzir a incidência dos casos humanos de LV em áreas endêmicas (Desjeux 2004a).

Considerando o exposto, torna-se necessário investir em estudos que busquem ampliar o entendimento da resposta imune e dos mecanismos envolvidos com o desenvolvimento de proteção/progressão da doença em cães naturalmente infectados. Atualmente, é inconcebível desenvolver e testar vacinas contra LVC em estudos de fase I, II e III, sem que haja um rigoroso protocolo de avaliação da resposta imune nos cães vacinados. Considerando esses aspectos, nosso grupo de pesquisa tem concentrado inúmeros esforços em estudar e avaliar diversos aspectos relacionados à imunopatologia da LVC considerando cães portadores de diferentes formas clínicas (assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos) (Reis et al. 2006a,b,c, Giunchetti et al. 2006, 2008a,c, Lage et al. 2007, Guerra et al. 2009, Reis et al. 2009) e que apresentam graus de parasitismo tecidual progressivos. Esses estudos têm fornecido novos biomarcadores de resistência e suscetibilidade a infecção, além de ter gerado informações relevantes a respeito da resposta imune manifestada na doença canina e fornecer novas ferramentas de análise da resposta imune em cães, tais como: imunofenotipagem por citometria de fluxo, imunohistoquímica anti-*Leishmania*, histopatologia, RT-PCR, dentre outras. Tais metodologias já foram incorporadas em diversos estudos posteriores que avaliaram diversas vacinas anti-LVC no modelo canino (Fujiwara et al. 2005, Giunchetti et al. 2007, 2008b, Araújo et al. 2008, 2009). Apesar dos inúmeros avanços técnicos científicos na área da imunologia veterinária no que diz respeito à análise da resposta imune no modelo canino, ainda é necessário somar esforços e maiores investimentos financeiros para ampliar e assegurar uma avaliação mais detalhada no intuito de fornecer subsídios para estudos que testam vacinas e/ou na área da terapêutica e de testes de drogas para LVC.

No intuito de ampliar a capacidade investigativa de aspectos da resposta imune no âmbito da leishmanioses visceral canina, o presente estudo propôs a utilização da técnica de

PCR em tempo real como instrumento mais preciso e rigoroso capaz de avaliar de forma quantitativa a expressão de citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição na pele de cães, considerando a carga parasitária e as diferentes formas clínicas da infecção.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Aspectos imunopatológicos da leishmaniose visceral canina

A leishmaniose visceral canina é uma doença sistêmica de curso crônico, e de forma semelhante ao que ocorre na LV humana, apresenta amplo espectro de manifestações clínicas que variam de um estado aparentemente saudável (assintomática), sem qualquer manifestação de sinais clínicos da doença, ou ainda apresentar um desenvolvimento intermediário como na forma oligossintomática onde sinais clínicos brandos passam a ocorrer, ou mesmo apresentar diversos sinais clássicos da doença sintomática, muitas vezes evoluindo para óbito (Mancianti et al. 1988, Koutinas et al. 1999, Reis 2001, Giunchetti et al. 2006, Reis et al. 2006a). Nesse sentido, de acordo com Mancianti et al. (1988) e Reis et al. (2006a), a LVC pode ser categorizada em três formas clínicas distintas: na forma clínica assintomática (CA), não se observa presença de sinais clínicos sugestivos da doença, e os animais são aparentemente saudáveis e ativos, enquanto na forma clínica oligossintomática (CO), os animais podem apresentar alguns dos sinais clínicos da LVC, como por exemplo, perda moderada de peso, ulcerações cutâneas leves que ocorrem frequentemente na ponta da orelha e em áreas periorbitais, alopecia localizada e algumas vezes opacificação da pelagem (Mancianti et al. 1988, Reis 2001, Giunchetti et al. 2006, Reis et al. 2006a, 2009). A forma clínica sintomática (CS) é caracterizada pela presença de mais de três sinais clínicos graves da LVC que se manifestam no decorrer da doença, como ulcerações cutâneas geralmente crostosas, onicogribose, dermatite furfurácea, ceratoconjuntivite, opacificação das córneas, paresia das patas posteriores, intensa perda de peso que às vezes evolui para anorexia e caquexia, podendo evoluir até um progressivo estado geral de prostração e óbito. De forma interessante, cerca de metade dos animais com LVC não desenvolve sinais clínicos e podem continuar nessa condição assintomática por longo período de tempo ou evoluir para as formas clínicas mais graves (Fisa et al. 1999, Reis 2001, Giunchetti et al. 2006, Reis et al. 2006a). Nosso grupo de pesquisa propôs uma revisão na classificação das formas clínicas da LVC, passando então a considerar duas formas clínicas assintomáticas: a forma clínica CA-I, que são cães assintomáticos soronegativos e PCR positivos, e a forma clínica CA-II, constituída de cães assintomáticos soropositivos e PCR positivos (Coura Vital et al. 2009). Essa nova classificação vem sendo amplamente estudada pelo nosso grupo de pesquisa no âmbito da imunopatologia da LVC no sentido de identificar biomarcadores de resistência e suscetibilidade à infecção por *L. chagasi* e melhor compreender aspectos relacionados ao desenvolvimento da imunopatogênese da LVC.

A avaliação da carga parasitária pelo índice “*Leishmania Donovan Units*” (LDU) é realizada através da contagem do número de amastigotas de *Leishmania* em 1000 células nucleadas (Stauber 1955, modificado por Reis 2001) tanto de esfregaços de tecidos corados pelo Giemsa, como pela imunohistoquímica anti-*Leishmania* (Tafuri et al. 2004, Giunchetti et al. 2006, 2008a,c). Atualmente, essa abordagem é considerada ferramenta fundamental para o estudo da densidade parasitária em diferentes tecidos na LVC (Tafuri et al. 2001, 2004, Sanchez et al. 2004, Reis et al. 2006a,b,c, Giunchetti et al. 2006, Lage et al. 2007, Giunchetti et al. 2008a,c, Guerra et al. 2009, Reis et al. 2009).

De fato, a categorização dos animais com LVC seja por forma clínica, ou por carga parasitária, tem sido considerada como uma importante estratégia para avaliar cães resistentes ou suscetíveis a infecção por *L. chagasi*, bem como em avaliações de eficácias de vacinas e testes de drogas (Reis et al. 2009). Nesse contexto, cães portadores da forma clínica assintomática, ou apresentando baixa carga parasitária são geralmente considerados mais resistentes à infecção. Por outro lado, animais sintomáticos que geralmente estão relacionados com elevados níveis de parasitismo tecidual, representariam cães com maior suscetibilidade e, portanto, uma apresentação clínico-laboratorial mais grave da doença (Tafuri et al. 2001, Sanchez et al. 2004, Tafuri et al. 2004, Giunchetti et al. 2006, Reis et al. 2006a,b,c, Lage et al. 2007, Giunchetti et al. 2008a,c, Alves et al. 2009, Guerra et al. 2009, Reis et al. 2009). Nesse sentido, utilizando a estratégia de categorizar os cães por forma clínica ou carga parasitária, diferentes estudos têm avaliado aspectos imunopatológicos da LVC buscando encontrar novos biomarcadores e associá-los a resistência ou suscetibilidade (Tafuri et al. 2001, Santos-Gomes et al. 2002, Dos-Santos et al. 2004, Sanchez et al. 2004, Tafuri et al. 2004, Chamizo et al. 2005, Strauss-Ayali et al. 2005, Giunchetti et al. 2006, Manna et al. 2006, Reis et al. 2006a,b,c, Corrêa et al. 2007, Lage et al. 2007, Lima et al. 2007, Strauss-Ayali et al. 2007, Carrilo et al. 2008, Giunchetti et al. 2008a,c, Sanchez-Robert et al. 2008, Alves et al. 2009, Guerra et al. 2009, Manna et al. 2009, Reis et al. 2009).

Um dos primeiros estudos com essa abordagem foi realizado por pesquisadores de nosso grupo, empregando-se a categorização dos animais com LVC de acordo com níveis de parasitismo, baseado nos valores de LDU obtidos em diferentes tecidos e classificados como baixo (BP), médio (MP) e alto parasitismo (AP) (Reis et al. 2006a,b,c). Essa estratégia permitiu identificar que animais assintomáticos apresentam em geral baixo parasitismo, enquanto animais sintomáticos normalmente apresentam altas densidades parasitárias em diferentes tecidos, como: pele, medula óssea, baço, fígado e linfonodo (Giunchetti et al. 2006,

Reis et al. 2006a,b,c, Giunchetti et al. 2008a,c). Além disso, observou-se que independentemente do estado clínico, o baço e a pele seriam os principais alvos do parasitismo (Reis et al. 2006a). Nesse sentido, demonstrou-se ainda que, densidades parasitárias na medula óssea e no baço, são importantes biomarcadores capazes de decodificar a forma clínica na LVC (Reis 2001, Reis et al. 2006a).

Os fatores relacionados à progressão da doença após a infecção têm sido avaliados por estudos epidemiológicos em populações caninas, onde fatores como estado nutricional, genética/raça e idade, têm sido apontados como parâmetros importantes capazes de influenciar na evolução do quadro clínico da LVC (Fisa et al. 1999, Solano-Gallego et al. 2000, Quinnell et al. 2003). Do ponto de vista laboratorial, cães naturalmente ou experimentalmente infectados por *L. chagasi/infantum*, apresentam alterações sistêmicas que refletem no perfil bioquímico e hematológico desses animais. Nesse sentido, anemia normocítica e normocrômica, associada à leucopenia em decorrência da linfopenia, eosinopenia e monocitopenia, tem sido frequentemente relatado como biomarcadores hematológicos de doença ativa em animais portadores da forma clínica sintomática ou em cães com alta densidade parasitária medular na LVC (Reis et al. 2006a, Guerra et al. 2009). Tais biomarcadores, geralmente encontram-se associados ao aumento dos níveis de proteínas totais séricas, ocasionado principalmente pela intensa resposta imune humoral desenvolvida por esses animais (Marzochi et al. 1985, Reis et al. 2006a). Além disso, aumento dos níveis de proteína total acompanhado por hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, conduzem a diminuição da relação albumina/globulina sérica nesses animais (Cardoso et al. 1998, Reis et al. 2006a, Giunchetti et al 2008c).

Os níveis de isotípos de imunoglobulinas (Ig) na infecção natural e experimental por *L. chagasi/infantum*, vem sendo estudados por vários autores nos últimos anos (Solano-Gallego et al. 2001, Quinnell et al. 2003, Reis et al. 2006b). Esses trabalhos evidenciaram que o perfil de imunoglobulinas apresenta-se como um importante biomarcador para monitoramento do prognóstico do estado clínico e da densidade parasitária tecidual (Reis et al. 2006b), geralmente associado a piora do quadro clínico e ao aumento da replicação de formas amastigotas em órgãos linfóides. Assim, seja na infecção experimental ou natural, o acionamento da resposta humoral, refletida pela elevação nos níveis de classes e subclasses de Ig(s) é frequentemente associado à progressão clínica da doença, e o estabelecimento de imunidade efetiva anti-LVC parece ser dependente da imunidade celular específica (Cabral et al. 1992, Pinelli et al. 1994, Reis et al. 2006a). A avaliação dos níveis das subclasses IgG1 e

IgG2, tem sido indicado como marcador evolução de clínica mais importante do que a avaliação dos níveis de IgG total isoladamente (Deplazes et al. 1995). Correlação direta entre os níveis das subclasses de IgG1 anti-*Leishmania* e o aparecimento dos sinais clínicos, foi inicialmente demonstrado em cães infectados por *L. infantum*, enquanto altos níveis de IgG2 estariam associados com infecção assintomática (Nieto et al. 1999). De forma contrária, Leandro et al. (2001) relataram níveis aumentados de IgG2 em CS na infecção experimental e natural da LVC. Em acordo com esse estudo, Reis et al. (2006b) relataram aumento dos níveis de IgG1 associado a forma clínica assintomática e a baixa carga parasitária tecidual, enquanto forma clínica sintomática seria caracterizada por apresentar alta carga parasitária e níveis elevados de IgG, IgG2, IgM, IgA e IgE anti-*Leishmania*. Diante dos resultados controversos que têm sido frequentemente documentados na literatura em relação a análise do perfil de isotipos de Ig anti-*Leishmania*, Day (2007) propõe que ainda não pode ser estabelecido um padrão de perfil isotípico de classes e subclasses de IgG (IgG1 ou IgG2) anti-*Leishmania* que possa ser empregado para identificar resistência e/ou suscetibilidade a LVC. Esse autor argumenta que a natureza policlonal dos anticorpos anti-IgG1 e anti-IgG2 caninos atualmente disponíveis para comercialização, seria a principal causa para os divergentes resultados relatados na literatura (Day 2007).

De forma interessante, quando animais com LVC são classificados de acordo com a forma clínica ou carga parasitária, é possível identificar um padrão distinto de resposta e correlacionar com diferentes biomarcadores de progressão da doença. Nesse sentido, a avaliação de parâmetros hematológicos em cães portadores de LV categorizados por carga parasitária na medula óssea, revelou anemia grave em animais com alta carga parasitária e na forma sintomática devido a diminuição de hemácias, da concentração de hemoglobina e da taxa de hematócrito (Reis et al. 2006c). O quadro leucocitário avaliado nesse estudo evidenciou redução da população de linfócitos, eosinófilos e monócitos no grupo com alta carga parasitária na medula óssea (Reis et al. 2006c). Guerra et al. (2009) ao avaliar parâmetros hematológicos na LVC, demonstraram a ocorrência de correlação positiva entre anemia e níveis elevados de parasitismo esplênico. Além disso, de forma semelhante ao descrito por Reis et al (2006c), Guerra et al. (2009) observaram redução na população de eosinófilos e monócitos no grupo de cães com alta densidade parasitária esplênica. Esse achado está de acordo com a diminuição do número absoluto de células CD14⁺ circulantes (monócitos) observado nesse grupo (Guerra et al. 2009). De acordo com Reis et al. (2006a,c), a diminuição dos valores de monócitos circulantes em cães sintomáticos e com alta carga

parasitária na LVC indica que ocorre recrutamento preferencial dessas células para os tecidos linfóides alvos do parasitismo que acarretam em aumento dos processos inflamatórios nesses órgãos que implicará em hiperplasia e hipertrofia dos mesmos, onde também podem exercer importante papel na apresentação de antígenos de *Leishmania*. Clinicamente, esses eventos são traduzidos por esplenomegalia, hepatomegalia e linfadenopatia generalizada (Reis et al. 2009). Esses estudos reforçaram que a categorização de animais portadores de LVC por forma clínica ou por densidade parasitária tecidual, são fundamentais para avaliar com precisão o perfil hematológico, que mostrou ter relação direta com o prognóstico da doença.

No intuito de compreender a gênese da hepatomegalia na LVC, a avaliação histológica do fígado de cães sintomáticos revelou alterações inflamatórias intensas e que estão diretamente associadas ao aumento da carga parasitária tecidual. Nesse sentido, Giunchetti (2004) e Giunchetti et al. (2008c) observaram que cães sintomáticos apresentam inflamação portal e intensa congestão, além de hipertrofia e hiperplasia de células de Küpffer, granulomas intralobulares e maior intensidade na inflamação da cápsula. Além disso, foi sugerido por esses autores que existe associação direta entre as alterações bioquímicas observadas nesse grupo, como diminuição da concentração de albumina sérica e aumento da concentração de globulina plasmática com alterações histológicas no fígado, progressão das formas clínicas da LVC e intensidade de parasitismo hepático (Giunchetti et al. 2008c). Esses dados corroboram com os resultados obtidos por Reis et al. (2006a) ao avaliar outros compartimentos como, baço, pele e medula óssea. Em um estudo conduzido por Sanchez et al. (2004), foi relatado que em cães assintomáticos o granuloma hepático apresenta-se maduro e bem organizado, com células de Küpffer distribuídas na parte central e um infiltrado de linfócitos ao redor. Por outro lado, cães sintomáticos apresentaram granulomas desorganizados com células de Küpffer dispersas e um infiltrado difuso de células mononucleares. A dificuldade dos cães sintomáticos em elaborar uma reação inflamatória granulomatosa bem organizada parece refletir uma debilidade na ativação e migração celular para o foco inflamatório, que é considerada fundamental para o controle do parasitismo tecidual.

Da mesma forma, ainda não é bem compreendido os fatores responsáveis pela gênese da esplenomegalia observada na LVC. Por esse motivo, alguns grupos de pesquisas têm concentrado esforços para investigar os aspectos imunopatológicos do baço empregando-se análises morfológicas e imunofenotípicas (Giunchetti 2004, Alexandre-Pires et al. 2006, Lima et al. 2007, Reis et al. 2009). A esplenomegalia tem sido associada principalmente ao aumento da celularidade representada por macrófagos e por mudanças na estrutura

microvascular com abundantes veias e vênulas na polpa vermelha (Alexandre-Pires et al. 2006). Reis et al. (2009) relataram a presença de hiperplasia e hipertrofia na polpa vermelha de animais infectados, caracterizado por infiltrado de células mononucleares constituído principalmente por plasmócitos. Em relação à polpa branca, a substituição da população de linfócitos por macrófagos, denominado de depleção da polpa branca, tem sido descrito como um achado frequente da LVC (Giunchetti 2004). No estudo desenvolvido por Lima et al. (2007), a expressão de CR3 foi aumentada no baço de animais sintomáticos em relação a animais assintomáticos e correlação entre carga parasitária e expressão de CR3 foi observada em cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, sugerindo que esta integrina pode ser um importante receptor associado a sobrevivência do parasito nesse compartimento e podendo também servir como bom marcador de suscetibilidade a infecção.

Além do baço, que elabora e amplifica a resposta imune de forma sistêmica, outro compartimento linfóide importante que tem sido alvo de estudos na LVC são os linfonodos. Os linfonodos geralmente respondem de acordo com o estímulo da região que drenam a linfa nos processos infecciosos. Na LVC, linfadenopatia generalizada tem sido frequentemente relatada, sendo evidente principalmente nos linfonodos poplíteos e cervicais onde é observado pela apalpação clínica (Lima et al. 2004). A linfadenopatia observada nesses animais está associada ao aumento no número e tamanho dos folículos linfóides e marcante hipertrofia e hiperplasia de macrófagos medulares (Lima et al. 2004). Em um recente trabalho desenvolvido por pesquisadores de nosso grupo, foi observada intensa hipertrofia/hiperplasia das zonas cortical e medular de linfonodos poplíteos, caracterizada como as principais alterações histológicas em cães assintomáticos. Por outro lado, a forma clínica sintomática exibe perfil histológico com pronunciada atrofia da zona cortical, que foi associado à debilidade funcional do sistema imune observado nesse grupo clínico (Giunchetti et al. 2008a). Além disso, alterações imunofenotípicas do linfonodo poplíteo foram observadas nos cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. Dentre as alterações mais marcantes destacam-se: aumento de linfócitos T CD5⁺, refletido pelo aumento da subpopulação de linfócitos T CD8⁺, diminuição dos níveis de células B CD21⁺, além de aumento da expressão de MHC-II em linfócitos (Giunchetti et al. 2008a). Esses resultados parecem indicar um padrão particular da resposta imune compartimentalizada do linfonodo, com alterações imunofenotípicas distintas daquelas observadas no sangue periférico (Pinelli et al. 1995, Bourdoiseau et al. 1997, Reis et al. 2006c, Guerra et al. 2009). Em relação à carga parasitária avaliada nesse compartimento, Lima et al. (2004) e Giunchetti et al. (2008a) relataram que o parasitismo do

linfonodo não pode ser diretamente relacionado a intensidade dos sinais clínicos observados na LVC. Além disso, Giunchetti et al. (2008a) encontraram forte correlação positiva entre os níveis de parasitismo nesse compartimento com os níveis de parasitismo do compartimento dérmico.

Buscando ampliar a compreensão da imunopatologia na LVC, tem sido empregada a técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo como uma poderosa ferramenta para se avaliar o perfil imuno-hematológico de leucócitos do sangue periférico ou de diferentes compartimentos linfóides, seja no contexto *ex vivo* ou *in vitro*. Bourdoiseau et al. (1997), relataram que cães naturalmente infectados por *L. infatum*, independente da forma clínica, apresentam redução de ambas as subpopulações de linfócitos T circulantes CD4⁺ e CD8⁺. O estudo do perfil imunofenotípico de leucócitos circulantes do sangue periférico de cães classificados em diferentes formas clínicas, vem sendo investigado por diversos autores (Sanchez et al. 2004, Reis et al. 2006c, Giunchetti et al. 2008c, Guerra et al. 2009), entretanto, existem poucos estudos associando essas alterações em cães categorizados pela densidade parasitária tecidual. Nesse sentido, Reis et al. (2006c) observaram que a baixa frequência de células B CD21⁺ e monócitos CD14⁺ circulantes são importantes biomarcadores celulares capazes de decodificar as formas clínicas mais graves da LVC. Além disso, esses autores observaram que níveis aumentados de células B CD21⁺ e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ estão presentes na forma clínica assintomática. Esses resultados foram marcantes na literatura, pois a partir daí foi possível evidenciar esses fenótipos celulares como biomarcadores celulares de resistência na LVC, atualmente empregados em estudos de testes de drogas e vacinas por diversos autores (Reis et al. 2006c, 2009).

Mais recentemente, Guerra et al. (2009) associaram alterações fenotípicas com parasitismo tecidual no baço e pele, e esses autores estabeleceram que a alta frequência de linfócitos T CD8⁺ circulantes está diretamente relacionada ao baixo parasitismo esplênico. Além disso, esses autores identificaram que há correlação negativa entre linfócitos T CD5⁺ e TCD8⁺ com densidade parasitária cutânea (Guerra et al. 2009). Nesse sentido, é consenso na literatura atual que linfócitos T CD8⁺ atuam de fato como principal população celular relacionada à resistência na LVC, seja quando os animais são classificados de acordo com a forma clínica ou por carga parasitária (Pinelli et al. 1995, Bourdoiseau et al. 1997, Sanchez et al. 2004, Reis et al. 2006c, Giunchetti et al. 2008c, Guerra et al. 2009).

A análise de aspectos histopatológicos em diferentes compartimentos linfóides de cães portadores de manifestações clínicas (assintomática, oligossintomática e sintomática) na

infecção por *L. chagasi*, tem sido usada como uma estratégia científica para ampliar a compreensão da história natural da LVC (Reis et al. 2009). Nesse contexto, Giunchetti et al. (2006) avaliaram aspectos imunopatológicos na pele de cães portadores de diferentes formas clínicas da LVC. Nesse estudo ficou evidenciada correlação positiva entre linfócitos T CD4⁺ circulantes e a intensidade da reação inflamatória dérmica, sugerindo possível ativação e migração dessa população de linfócitos para o compartimento cutâneo que se encontra intensamente parasitado. Nesse mesmo estudo, observou-se ainda que, a forma clínica sintomática apresenta as menores contagens de monócitos CD14⁺ circulantes, além de ser o grupo com maior intensidade inflamatória dérmica e alta densidade de parasitismo cutâneo. Diante dessas observações, pela primeira vez foi demonstrado que a inflamação crônica da derme e o parasitismo cutâneo estão diretamente relacionados à progressão clínica da LVC (Giunchetti et al. 2006). Solano-Gallego et al. (2004) observaram que em cães portadores de LV há um padrão inflamatório sugestivo de dermatite folicular, enquanto Dos-Santos et al. (2004), demonstraram que o infiltrado inflamatório é o achado histológico mais comum na pele de cães, independente do estado clínico observado, e que o parasitismo cutâneo está sempre associado com inflamação. Esse mesmo estudo demonstrou que há correlação entre parasitismo, que variou de moderado a denso, com padrão inflamatório granulomatoso e difuso, além de observar que animais sintomáticos apresentaram intenso infiltrado inflamatório difuso e alta carga parasitária (Dos-Santos et al. 2004). De forma interessante, foi estabelecido que o infiltrado celular presente na derme superficial e profunda nos cães infectados, era constituído principalmente de plasmócitos, com pequeno número de macrófagos e linfócitos (Giunchetti et al. 2006).

Considerando a natureza das diferentes manifestações clínicas da leishmaniose visceral e os poucos modelos experimentais capazes de fornecer subsídio no conhecimento científico dessa doença, nos últimos anos intensificou-se o emprego do cão como modelo experimental para estudo da LV, seja para o estabelecimento da história natural, seja para estudos de testes terapêuticos e vacinais. Assim, alguns grupos de pesquisa têm focado a atenção em estudos da resposta imune na LVC. Dessa forma, um dos focos mais investigado na atualidade é o padrão de citocinas apresentado por cães naturalmente e/ou experimentalmente infectados por *L. chagasi/infantum*, no intuito de compreender melhor a história natural da LVC e os mecanismos de resistência/suscetibilidade a infecção. Entretanto, o entendimento do perfil da expressão de citocinas na LVC é extremamente complexo devido ao fato dessa doença apresentar um amplo espectro de formas clínicas que leva a processos

imunopatológicos distintos e a parasitismos teciduais com características peculiares na infecção experimental e natural por *Leishmania sp.*. Nesse sentido, estudos prévios têm investigado a expressão de citocinas em diversos compartimentos teciduais como, pele, baço, medula óssea e linfonodo, bem como em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) durante a infecção por *L. chagasi/infantum*. Um dos estudos pioneiros abordando o perfil de citocinas na LVC, foi conduzido por Pinelli et al. (1994, 1995) que empregaram estratégias metodológicas indiretas, tais como, o uso de anticorpos monoclonais humanos e murinos por ELISA ou métodos biológicos de citotoxicidade para avaliação de IFN- γ . Esses autores propuseram que a infecção assintomática na LVC estaria relacionada a um perfil de imunidade protetora contra *L. infantum* semelhante à resposta do Tipo I observada em modelos murinos tipo BALBc e C3Hmice infectados por *L. major* (Mosmann et al. 1986). Posteriormente, esses mesmos autores demonstraram que linfócitos T CD8⁺ desempenham importante papel na imunidade protetora da LVC causada por *L. infantum*, uma vez que essas células são capazes de montar resposta do Tipo I através da produção de IFN- γ , além de desempenharem atividade citotóxica potencial devido a sua habilidade de lisar macrófagos infectados por esse parasito (Pinelli et al. 1997). Foi observado ainda por Pinelli et al. (1994, 1995), que CMSP de cães assintomáticos estimuladas *in vitro* com o antígeno solúvel do parasito, são capazes de produzir elevados níveis de IL-2 e IFN- γ quando comparado às células de cães sintomáticos. Esses resultados sugerem que a suscetibilidade de cães à infecção está associada à inabilidade de montar resposta imune do Tipo I e que essas citocinas poderiam ser utilizadas ainda como biomarcadores da progressão da doença.

Mais recentemente, foi desmistificado também no modelo canino essa imagem polarizada da resposta imune inicialmente proposta nos estudos de Pinelli e colaboradores (Pinelli et al. 1994, 1995), e com isso, um entendimento mais abrangente passa a ser compreendido da história natural da doença no que diz respeito aos processos imunopatológicos e aos mecanismos relacionados a resistência/suscetibilidade a doença. Trabalhos recentes demonstraram que em cães naturalmente infectados por *L. chagasi/infantum*, a expressão de IFN- γ observada na medula óssea ou no baço foi similar entre as formas clínicas polares (assintomática e sintomática) (Quinnell et al. 2001, Corrêa et al. 2007, Lage et al. 2007). De forma interessante, um predomínio tanto de IFN- γ como de IL-4 foi evidente em CMSP de animais assintomáticos quando estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) (Chamizo et al. 2005). Ao avaliar a expressão de citocinas em esplenócitos, Lage et al. (2007) sugeriram que a LVC é marcada por um equilíbrio na

produção de citocinas do Tipo I e do Tipo II, mas com predominante acúmulo de níveis de IL-10 a medida que ocorre progressão da carga parasitária ou das manifestações clínicas da doença no cão, sugerindo o papel modulador da IL-10 nesse contexto, visto que ocorre aumento da expressão de IFN- γ por esplenócitos associado ao aumento da carga parasitária do baço (Lage et al. 2007).

Strauss-Ayali et al. (2005), demonstraram em CMSP de cães com LV naturalmente ou experimentalmente infectados por *L. infantum* a habilidade da IL-12 em induzir o aumento da produção de IFN- γ , reforçando a importância dessas citocinas na manutenção de uma forma assintomática na LVC. Além disso, ficou documentado que IL-10 tem a capacidade de inibir a proliferação de CMSP e a produção de IFN- γ em cães experimentalmente infectados por *L. infantum*, confirmando assim a hipótese levantada por Lage et al. (2007). Em um recente estudo realizado por esse mesmo autor avaliando a resposta imune esplênica, foi demonstrado que animais infectados por *L. infantum*, independente da evolução clínica, apresentam aumento nos níveis de mediadores associados à resposta do Tipo I como, IFN- γ , quimiocinas IP-10 e RANTES, além do fator de transcrição T-bet (Strauss-Ayali et al. 2007). Além disso, ficou demonstrado também que os níveis de IL-4 encontram-se aumentados na fase inicial da infecção experimental, enquanto os níveis de IL-5 foram elevados apenas no estágio tardio. Interessantemente, não foi observada diferença nos níveis das citocinas reguladoras IL-10 e TGF- β durante a infecção experimental. No entanto, esse estudo também indicou que ambas as respostas do Tipo I e II ocorrem no baço durante a LVC, como já observado por Lage et al. (2007) na infecção natural por *L. chagasi*, sugerindo que uma elevação inicial dos níveis de IL-4 pode ter um papel na persistência dos parasitos na presença de altos níveis de IFN- γ (Strauss-Ayali et al. 2007).

Na leishmaniose canina, tem sido estabelecido também aumento da expressão das citocinas IL-4, IFN- γ e TNF- α nas lesões de pele de cães naturalmente infectados em comparação a animais controle (Brachelente et al. 2005). Nesse trabalho, observou-se que a expressão desse conjunto de citocinas (IL-4, IL-13 e TNF- α) encontra-se levemente aumentada nas biópsias de pele. Além disso, foi observado um infiltrado celular predominantemente do tipo plasmocitário, enquanto a expressão de IFN- γ foi moderadamente aumentada quando linfócitos eram predominantes. Esses autores sugerem que o aumento da expressão de IL-4 está associado com a gravidade dos sinais clínicos e a alta carga parasitária nas lesões de pele (Brachelente et al. 2005). Em um recente estudo longitudinal investigando

o perfil de citocinas em CMSP, foi observado no grupo de animais experimentalmente infectados por *L. infantum* que não desenvolveram sinais clínicos da doença durante os quatro primeiros meses após a infecção, baixa expressão de IL-4 e IL-13 na fase inicial da infecção (Sanchez-Robert et al. 2008). Entretanto, animais que apresentaram altos níveis de IL-4 e IL-13 na fase inicial da infecção, desenvolveram sinais clínicos da LVC e apresentaram altos níveis de parasitismo tecidual. Além disso, foi também verificada expressão aumentada de IFN- γ associada a altas densidades parasitárias e estado clínico avançado (sintomático) nesses animais (Sanchez-Robert et al. 2008). No estudo desenvolvido por Corrêa et al. (2007), avaliou-se de forma quantitativa a produção de IFN- γ , TGF- β e IL-10 em sobrenadantes de extratos de baço e fígado de cães assintomáticos e sintomáticos, e foi observado altos níveis de IL-10 em ambos os grupos de cães. Além disso, observaram-se níveis elevados de TGF- β no grupo de cães assintomáticos, enquanto IFN- γ apresentou-se em níveis semelhantes entre os grupos assintomáticos e sintomáticos, porém em concentrações significativamente inferiores as de IL-10 e TGF- β (Corrêa et al. 2007). Alves et al. (2009) ao avaliarem a expressão de citocinas nos linfonodos de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, observaram que baixa carga parasitária nesse compartimento está correlacionada a forma clínica assintomática da LVC e a expressão aumentada de IFN- γ e TNF- α . Além disso, nesse estudo foi demonstrado que a expressão aumentada de IL-10 e TGF- β determina o aumento da carga parasitária e da progressão da doença.

Diante da importância do cão como reservatório do parasito em regiões endêmicas para LV humana, em decorrência principalmente do intenso parasitismo cutâneo que ocorre nesses animais que são fontes potenciais para flebotomíneos e considerando ainda o grande número de casos de LVC nessas áreas principalmente assintomáticos (Abranches et al. 1991, Reis et al. 2006a), o entendimento do perfil imune é de fundamental importância para o estabelecimento de biomarcadores que determinariam a resistência/suscetibilidade a infecção por *Leishmania chagasi*. Além disso, a identificação desses biomarcadores consiste em importantes pré-requisitos para uma análise mais acurada da resposta imune para ser empregada em estudos de novas estratégias imunoproláticas ou quimioterápica anti-LVC. Adicionalmente, baseado na similaridade entre os sinais clínicos observados na LV humana e canina, assim como, na evolução da história natural da doença, o estudo da LVC tem sido indicado como alternativa para o entendimento da patogênese da doença humana (Sanchez et al. 2004, Reis et al. 2006a). Nesse contexto, o presente trabalho buscou investigar aspectos

imunopatológicos no compartimento dérmico de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, utilizando como principal estratégia para determinar o perfil de resistência e/ou suscetibilidade à infecção, a categorização dos cães procedentes de área endêmica (Belo Horizonte, Minas Gerais), naturalmente infectados por *L. chagasi*, tanto pela forma clínica como pela densidade parasitária cutânea. Para isso, foi avaliado a expressão de um amplo repertório de citocinas (IFN- γ , IL-12p40, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13, IL-10 e TGF- β 1), fatores de transcrição (T-bet, GATA-3 e FOXP3) e quimiocinas (CCL2, CCL4, CCL5, CCL13, CCL17, CCL21, CXCL8 e CCL24), assim como, as alterações histológicas apresentadas nesse compartimento através da celularidade tecidual e do infiltrado inflamatório cutâneo.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Estudar o envolvimento de citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição nos processos imunopatológicos da pele de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da leishmaniose visceral canina e diferentes graus de parasitismo no compartimento cutâneo.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar em cães não infectados e cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, categorizados de acordo com a forma clínica e carga parasitária na pele, os seguintes parâmetros:

- 1 - Os níveis da expressão de RNAm de citocinas (IFN- γ , IL-12p40, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13, IL-10 e TGF- β 1), fatores de transcrição (T-bet, GATA-3 e FOXP3) e quimiocinas (CCL2, CCL4, CCL5, CCL13, CCL17, CCL21, CXCL8 e CCL24) no compartimento cutâneo;
- 2 - A influência da progressão clínica e do grau de parasitismo cutâneo sobre os níveis da expressão de RNAm de citocinas, fatores de transcrição e quimiocinas no compartimento cutâneo;
- 3 - O perfil celular inflamatório da pele;
- 4 - A correlação entre os níveis de expressão de citocinas Tipo I, tanto com os níveis de expressão de citocinas do Tipo II quanto com os níveis de expressão de citocinas imunoreguladoras;
- 5 - A correlação entre os níveis de expressão de citocinas tanto com os níveis de expressão de fatores de transcrição quanto com os níveis de expressão de quimiocinas;
- 6 - A correlação entre os níveis de expressão de citocinas e de quimiocinas com o infiltrado celular da pele.

4 Materiais e Métodos

4.1 Animais, pré-seleção e manejo

Os animais utilizados neste estudo são decorrentes do trabalho desenvolvido por Reis (2001), em que foram selecionados cães não infectados e cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da infecção, de ambos os sexos, com idade variando entre 2 a 6 anos, sem raça definida (SRD), criados e mantidos no canil de experimentação do Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia (ICB-UFMG) ou cedidos pelo Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte (CCZ/PBH/MG).

Antes da chegada dos animais, as celas foram submetidas ao “vazio sanitário” que consistiu na desinfecção das mesmas através de lavagens com solução de hipoclorito a 1%. As celas foram mantidas sob inspeções periódicas do ambiente externo e submetidas à borrifação com piretróide (k-othrine[®], Bayer CropScience Brasil, RJ, Brasil) trimestralmente para evitar a presença de flebotomíneos e ectoparasitos. Os animais foram submetidos à coleta de fezes para o diagnóstico de infecções por protozoários ou helmintos intestinais e em seguida, receberam tratamento anti-helmíntico de largo espectro (Endal Plus[®], Schering-Plough Saúde Animal, SP, Brasil) composto de febantel, palmoato de pirantel e praziquantel, além de banho com inseticida de ação ectoparasitária (Butox[®], Laboratório Químico S/A). Posteriormente, foram identificados em fichas conforme suas características físicas (sexo, tamanho, cor, pelagem, etc.), numerados e mantidos em quarentena. Durante esse período, os cães foram vistoriados diariamente e examinados semanalmente. Quinze dias após a quarentena, foi realizado novo exame coproparasitológico para certificação da eficácia do tratamento anti-helmíntico, bem como, análise ectoscópica para avaliar a eficiência da ação do inseticida. Os cães foram mantidos no canil do ICB/UFMG com água potável e ração balanceada (Kinus[®], Braswey S/A, SP, Brasil), fornecida “*ad libitum*”.

4.1.1 Diagnóstico sorológico e caracterização clínica dos cães

O diagnóstico sorológico foi realizado utilizando soro dos cães através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) segundo Camargo (1964), empregando conjugado específico anti-IgG de cão (Biomanguinhos, Fiocruz, RJ, Brasil). Foram utilizadas formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/1960/BH6) mantidas em crescimento logarítmico em meio LIT. Animais com títulos de IgG superiores à 1:40, foram considerados

positivos para LVC. As reações foram realizadas imediatamente após a entrada dos cães no canil e antes de ser realizada a necropsia.

Os cães utilizados nesse estudo foram subdivididos em 4 grupos experimentais: grupo controle, consistindo de animais não infectados que foram denominados pela sigla CNI ($n=16$) e 3 grupos clínicos da LVC, denominados assintomático, oligossintomático e sintomático. Essa classificação foi realizada de acordo com o número de sinais clínicos da infecção depois de concluída a quarentena, conforme Mancianti et al. (1988). A classificação está descrita abaixo seguida de uma tabela demonstrando o número de animais: **Grupo 1 - Cães não infectados (CNI):** 16 cães sadios nascidos, criados e mantidos no canil do Laboratório de Leishmanioses, Departamento de Parasitologia, ICB-UFMG ou provenientes do CCZ/PBH/MG, com exames sorológicos e parasitológicos negativos nos órgãos pele, baço, fígado, medula óssea e linfonodo poplíteo; **Grupo 2 - Cães assintomáticos (CA):** 10 cães com sorologia positiva pela RIFI, com exames parasitológicos positivos que não apresentaram sinais sugestivos da infecção por *L. chagasi* ao exame clínico; **Grupo 3 - Cães oligossintomáticos (CO):** 10 cães com sorologia positiva pela RIFI, com exames parasitológicos positivos, apresentando no máximo até três sinais clínicos da doença, como: opacificação da pelagem, alopecia localizada e emagrecimento moderado; **Grupo 4 - Cães sintomáticos (CS):** 15 cães com sorologia positiva pela RIFI, com exames parasitológicos positivos e com mais de três sinais clínicos da doença, tais como, pelagem opaca, emagrecimento acentuado, onicogribose, lesões cutâneas, apatia, ceratoconjuntivite. A Tabela I, apresentada a seguir, mostra os sinais clínicos observados nos animais utilizados nesse estudo, demonstrando o número de animais e o percentual por grupo para cada sinal clínico observado.

Tabela I: Número de animais por grupo apresentando determinado sinal clínico

Sinais Clínicos	Grupos Clínicos		
	CA <i>n</i> =10	CO <i>n</i> =10	CS <i>n</i> =15
Pelagem Opaca	NO	2	10
Alopecia	NO	4	11
Dermatite Furfurácea	NO	NO	4
Opacificação das Córneas	NO	1	2
Edema das Patas	NO	NO	1
Úlceras	NO	7	14
Paresia das Patas	NO	NO	1
Ceratoconjutivite	NO	2	4
Emagrecimento	NO	2	12
Onigocribose	NO	5	13

As observações clínicas estão expressas em número de cães que apresentaram os sinais clínicos por grupo. NO (não observado); *n*=número de cães em cada grupo.

4.1.2 Procedimentos técnicos realizados para a necropsia dos cães

A eutanásia dos cães foi realizada conforme as recomendações do Colégio Brasileiro de Animais de Experimentação (COBEA) e em concordância com a Lei n°. 6.638, de 8 de maio de 1979, que estabelece normas práticas didático-científicas da vivisseção de animais. Os procedimentos foram iniciados com a aplicação de anestesia geral com tiopental sódico (Thiopentax[®], SP, Brasil) e após constatação da morte, iniciavam-se os trabalhos de necropsia. Posteriormente, foi então retirado um fragmento da pele da ponta da orelha para avaliação da densidade parasitária por aposição em lâminas, extração de RNA para avaliação da expressão gênica (acondicionado em gelo e posteriormente em freezer -80°C) e análise histopatológica (acondicionado em formol tamponado, pH 7,2 a 10%).

O diagnóstico parasitológico e a densidade parasitária na pele foi determinada utilizando fragmentos de tecidos submetidos a esfregaços por aposição em lâminas corados por Giemsa. Através da utilização de microscópio óptico, foi realizada a contagem do número de formas amastigotas na pele em 1000 células nucleadas, com o objetivo de estabelecer a intensidade do parasitismo cutâneo através do índice denominado de LDU (*Leishmania Donovan Units*; Stauber 1955, modificado por Reis 2001). Através dos resultados de intensidade parasitária, os cães foram categorizados em três grupos utilizando a análise por tercís. A metodologia estatística de tercís consiste na divisão por três do número total de cães incluídos nos grupos de animais infectados. Dessa forma, o primeiro grupo infectado possui um terço dos cães com os menores índices de parasitismo, o segundo grupo é alocado com o

segundo terço de cães com os índices medianos, e no último terço, permanecem os cães com os índices mais altos de parasitismo na pele, como descrito a seguir: **Grupo 1 - Cães não infectados (CNI):** 16 cães saudáveis nascidos, criados e mantidos no canil do Laboratório de Leishmanioses, Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG ou provenientes do CCZ/PBH/MG, com exames sorológicos e parasitológicos negativos; **Grupo 2 - Cães com baixo parasitismo (BP):** 12 cães com sorologia positiva para *L. chagasi*, apresentando contagem de LDU na pele de 1 a 10 formas amastigotas de *Leishmania*/1000 células nucleadas; **Grupo 3 - Cães com médio parasitismo (MP):** 11 cães com sorologia positiva para *L. chagasi*, apresentando contagem de LDU na pele de 11 a 250 formas amastigotas de *Leishmania*/1000 células nucleadas; **Grupo 4 - Cães com alto parasitismo (AP):** 12 cães com sorologia positiva para *L. chagasi*, apresentando contagem de LDU na pele maior ou igual a 251 formas amastigotas de *Leishmania*/1000 células nucleadas.

4.2 Avaliação da expressão gênica por qRT-PCR

4.2.1 Extração e purificação do RNA total das amostras de tecido

As amostras de biópsias de pele coletadas dos 51 cães utilizados nesse estudo foram divididas em dois fragmentos. Um fragmento foi armazenado após o procedimento de necropsia em tubos do tipo “*ependorf*” RNase-free embebidos em *Tissue Tek*, em freezer a temperatura de -80°C até o momento da extração do RNA. O segundo fragmento foi acondicionado em formol tamponado (pH 7,2) a 10% e incluído em parafina e cortada em micrótomo na espessura de aproximadamente cinco micrometros e posteriormente corada pelo método da Hematoxilina & Eosina (HE).

Na etapa de extração do RNA total, foram utilizadas quantidades de tecidos com o peso estimado entre 20-40 mg. As amostras após serem retiradas do freezer -80 °C, foram imediatamente imersas em 1 mL de TRIzol[®] Reagent (Invitrogen São Paulo, SP, Brasil) contido dentro de um vessel de 15 mL e macerada utilizando pistilo de vidro com ranhuras em um homogeneizador de tecidos POTTER S (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Alemanha) até total dissolução do tecido. Todos os instrumentos utilizados no processo de maceração foram lavados com água tratada com Dietil-Pirocarbonato (DEPC) e posteriormente limpos com gaze embebida com um removedor de nucleases (RNAses) RNaseAway (Invitrogen São Paulo). Posteriormente, o homogeneizado foi transferido para

tubos do tipo “*ependorf*” de 1,5 mL e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteínas. Foram então adicionados 0,2 mL de clorofórmio (Sigma, St. Louis, MO, USA) para cada 1,0 mL de TRIzol nos tubos contendo o homogeneizado e em seguida foram fechados e agitados vigorosamente por 15 segundos e incubados por 2-3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 12 minutos a 12.000 x g em microcentrífuga (Centrífuga 5418, Eppendorf, Hamburg, Alemanha) a temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL, seguido da adição de volume equivalente de etanol 95% v/v (preparado com água tratada com DEPC) e homogeneizado suavemente invertendo o tubo por três vezes para precipitação do RNA total.

Para purificação do RNA total contido na amostra, utilizou-se o kit de extração de RNA total (SV total RNA Isolation System - Promega, Madison, WI, USA) com algumas adaptações descritas a seguir. O RNA obtido como descrito acima, foi transferido para um “*spin basket*” acoplado a um tubo coletor de 2 mL e centrifugado a 12.000 x g por 1,5 minutos em microcentrífuga. O líquido residual no tubo coletor foi descartado após as seguintes centrifugações. Foram então adicionados 600 µL de solução de lavagem (*SV RNA Wash Solution*) e em seguida centrifugado a 12.000 x g por 1,5 minutos. As amostras de RNA foram tratadas com DNase para assegurar a ausência de contaminação por DNAg. Para isso, foi preparado um mix contendo 40 µL de “*yellow core buffer*”, 5,0 µL MnCl₂ 0,09M e 5 µL de DNase e aplicado sobre a membrana do spin e incubado por 30 minutos a temperatura de 20-25°C. Posteriormente, foi adicionado 200 µL de “*SV DNase Stop Solution*” para inibição da atividade enzimática da DNase. O tubo foi então centrifugado a 12.000 x g por 1,5 minutos e o líquido contido no tubo coletor descartado. Foi adicionado então 600 µL de solução de lavagem (*SV RNA Wash Solution*) e centrifugado por 12.000 x g por 1,5 minutos. Adicionou-se então, 250 µL de solução de lavagem (*SV RNA Wash Solution*) seguido de centrifugação a 14.000 x g por 2,5 minutos. Posteriormente, o *spin* foi transferido para um tubo de eluição e adicionou-se 100 µL de água livre de nuclease seguindo centrifugação a 12.000 x g por 1,5 minutos. Em seguida, as amostras foram armazenadas imediatamente a -80°C até o momento do uso.

4.2.2 Quantificação e avaliação do grau de pureza do RNA total extraído

As amostras de RNA extraídas foram dosadas no equipamento Biophotometer® (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) utilizando 1 µL de RNA diluídos em 59 µL de água tratada com DEPC (diluição de 60x) e o grau de pureza em relação à presença de proteínas, foi avaliado utilizando a relação dos valores de absorvância obtidos a 260 e 280 nm. O grau de contaminação por fenol foi avaliado pela absorvância a 320 nm. As amostras que apresentaram absorvância 260/280 nm acima de 1,8 foram consideradas com um grau de pureza satisfatório.

4.2.3 Integridade do RNA extraído

A separação eletroforética das amostras de RNA total foi realizada em gel de agarose em condições desnaturantes e específicas para RNA, seguindo o seguinte protocolo: em um primeiro frasco (frasco 1), 0,6 g de agarose foi fundida em 40 mL de água (tratada com DEPC) utilizando microondas convencional para aquecimento; em um segundo frasco (frasco 2), foi adicionado 12,8 mL de água (tratada com DEPC), 6 mL de tampão MOPS 10X e 1,2 mL de formaldeído (Sigma). Quando a temperatura do frasco 1 atingiu em torno de 45° (palpável), esse foi adicionado ao frasco 2. Após a homogeneização, a solução foi vertida sobre o aparato de eletroforese com pente apropriado e aguardado aproximadamente 40 minutos para completa solidificação. Paralelamente, foi preparado o tampão de amostra contendo 93,75 µL de formamida (Sigma), 13,75 µL de formaldeído, 18,75 µL de MOPS 10X, 21 µL de água (tratada com DEPC), 0,25 µL de azul de bromofenol (100 mg/mL) e 0,25 µL de brometo de etídio (Sigma). Foi utilizado 5 µg das amostras de RNA para 10 µL de tampão de amostra e incubado por 5 minutos a 65°C (desnaturação do RNA) seguido de banho de gelo por três minutos. Posteriormente, as amostras foram aplicadas no gel e corridas a 70 V em tampão MOPS 1X. Todo material foi previamente autoclavado e limpo com clorofórmio e a cuba era exclusiva para RNA, evitando contaminação por RNAses que poderiam comprometer a integridade do RNA durante o processo de separação eletroforética.

As amostras consideradas adequadas para avaliação dos níveis de transcritos de RNAm foram as que apresentavam bandas íntegras referentes as subunidades 26S, 18S e 5S do RNA ribossomal. O gel desnaturante referente às amostras de RNA utilizado nesse estudo está mostrado na Figura 1.

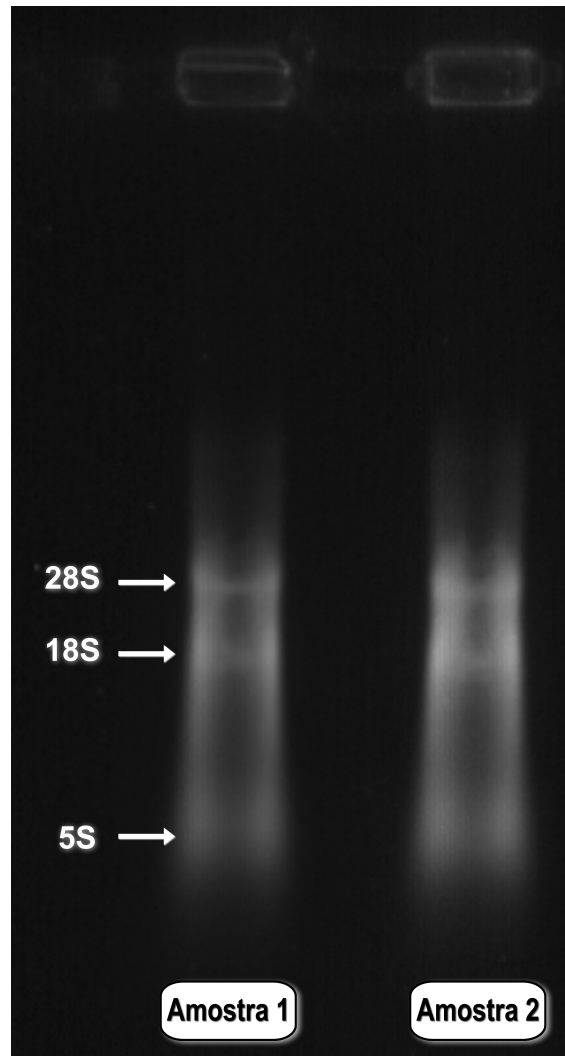


Figura 1: Gel desnaturante de RNA total. Na figura é possível visualizar bandas íntegras referentes às subunidades ribossômicas 5S, 18S e 28S das amostras de RNA total extraídas de duas amostras de cães utilizados neste estudo.

4.2.4 Transcrição reversa (síntese da 1ª fita de DNA complementar - cDNA)

Previamente a síntese da 1ª fita de cDNA, as amostras de RNA foram avaliadas quanto à presença de contaminação por DNAG após o tratamento com DNase. Nessa etapa, foi realizado PCR convencional utilizando-se 2 µL do RNA extraído e GAPDH como gene padrão. A ausência de banda específica após a amplificação, visualizada através de gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio, foi utilizada como indicativo da ausência de DNAG nas amostras de RNA total.

A primeira fita de cDNA, foi sintetizada utilizando o kit “*High Capacity cDNA Reverse Transcription kit*” (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Para isso, adicionou-se em um tubo de 0,2 mL com tampa redonda (“*domed cap*”), 1 µg de RNA total presente em um volume final máximo de 10 µL. Posteriormente, foi adicionado 10 µL do mix de transcrição reversa em cada tubo de 0,2 mL contendo RNA, e posteriormente, os tubos foram colocados no termociclador Veriti™ Thermal Cycler (PE Applied Biosystems) nas seguintes condições: 1 ciclo de 10 minutos a 25°C, 1 ciclo de 120 minutos a 37°C, 1 ciclo de 15 segundos a 85°C e 1 ciclo de 5 minutos a 10°C, consecutivamente. Após o término da etapa anterior, os tubos foram retirados do termociclador e armazenados a temperatura de -20°C até o momento da amplificação da etapa de PCR em tempo real.

4.2.5 Desenho dos iniciadores (primers)

Os iniciadores foram desenhados utilizando o software Gene Runner (versão 3.05, 1994). As sequências de nucleotídeos referentes aos genes avaliados nesse estudo foram obtidas do GenBank (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>) utilizando sequências completas de CDs, e quando não disponível, foram utilizadas as sequências parciais encontradas. Para os genes que apresentavam variações de transcritos, foi realizado um alinhamento das sequências para identificar regiões em comum entre os transcritos, e a partir dessas, foram desenhados os respectivos primers.

Os critérios utilizados para selecionar os iniciadores foram os seguintes:

- 1) Conteúdo de C+G entre 50-60%;
- 2) Tamanho de 18-22 bases;
- 3) Temperatura de fusão (T_m) entre 58-60°C;
- 4) Evitou-se utilizar iniciadores com mais de quatro bases em sequência de C e/ou G, e com mais do que 2 C ou G nas cinco últimas bases da extremidade 3’;
- 5) Variação do tamanho dos *amplicons* de 50 a 150 pares de bases (bp);
- 6) Sequências que estavam entre junções de exons e introns;
- 7) Não ocorrer homologia com outras sequências presentes no genoma canino (*Canis familiaris*) e/ou no genoma de *Leishmania infantum*.

Os iniciadores utilizados nesse estudo estão descritos na tabela II, assim como a sequência de nucleotídeos, a função, o número de acesso ao GeneBank (NCBI) e o tamanho dos *amplicons*.

4.2.6 Validação dos iniciadores

Para avaliar se os iniciadores utilizados eram específicos para os genes descritos na Tabela II, foi realizado PCR utilizando o reagente SYBR GREEN PCR Máster Mix (PE Applied Biosystems) nas condições de termociclagem de 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 60°C por 1 min e 95°C por 15 segundos, utilizando o termociclador Veriti™ Thermal Cycler. Para isso, foi utilizado 4 µL da 1ª fita de cDNA de cão (diluído 5X), 1 µL dos iniciadores *forward* e *reverse* de cada gene (1 µM) e 5 µL de SYBR GREEN PCR Máster Mix para cada reação de PCR.

4.2.7 Avaliação dos amplicons gerados utilizando gel de agarose a 1,2%

Os produtos de PCR obtidos a partir da reação de PCR em tempo real utilizando os primers desse estudo foram aplicados em gel de agarose a 1,2%, a fim de confirmar a ausência de amplificações inespecíficas, evidenciado pela presença de uma banda única com peso molecular esperado para os amplicons gerados a partir desses primers. Na Figura 2 estão demonstrados os produtos de PCR de alguns genes avaliados no presente estudo.

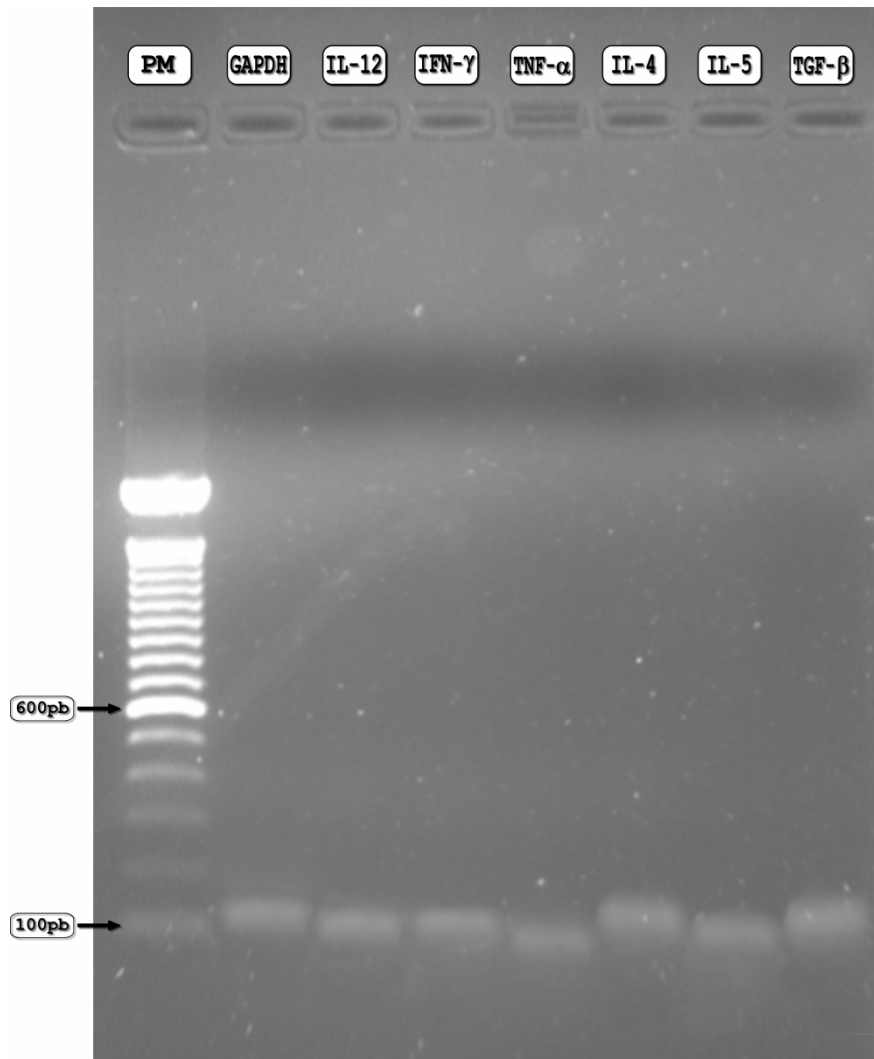


Figura 2: Análise dos produtos de PCR gerados a partir da reação de PCR em tempo real em gel de agarose a 1,2%. Na primeira canaleta da esquerda encontra-se o padrão de peso molecular sendo evidenciados os pesos de 100 e 600 pares de base (pb). Na figura estão demonstrados também os produtos de PCR obtidos a partir dos iniciadores referente aos seguintes genes: GAPDH (115pb), IL-12p40 (109pb), IFN- γ (113pb), TNF- α (94pb), IL-4 (123pb), IL-5 (106pb) e TGF- β 1 (134pb).

Tabela II: Sequência de iniciadores *forward* e *reverse* referente aos genes avaliados, função, tamanho do *amplicon* gerado, número de acesso das sequências no Gene Bank, eficiência da reação de qPCR e R² dos primers utilizados, avaliado através de uma curva de eficiência.

Gene	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Função	Tamanho do <i>amplicon</i> (bp)	Número de acesso GeneBank	Eficiência da reação (%)	R ²
GAPDH						
F	TTCCACGGCACAGTCAAG	Constitutivo	115	AB038240	99,1	0,996
R	ACTCAGCACACCAGCATCAC					
IL-12p40						
F	CAGCAGAGAGGGTCAGAGTGG	Citocina Tipo I	109	U49100	96,5	0,989
R	ACGACCTCGATGGGTAGGC					
IFN- γ						
F	TCAACCCCTTCTCGCCACT	Citocina Tipo I	113	AF126247	95,4	0,967
R	GCTGCCTACTTGGTCCCTGA					
TNF- α						
F	CGTCCATTCTTGCCCAAAC	Citocina Tipo I	94	DQ923808	97,2	0,983
R	AGCCCTGAGCCCTTAATTC					
IL-4						
F	CACCTCCCAACTGATTCCAA	Citocina Tipo II	123	AF239917	96,9	0,991
R	CTCGCTGTGAGGATGTCAA					
IL-5						
F	GCCTATGTTTCTGCCTTTGC	Citocina Tipo II	106	AF331919	95,3	0,979
R	GGTCCCATCGCCTATCA					
IL-13						
F	CCTCCTCAGAGCAAAGTG	Citocina Tipo II	148	AF244915	96,7	0,973
R	CCCAGCACAAACAAAGAC					
IL-10						
F	AGAACCACGACCCAGACATC	Citocina Imunoreguladora	129	U33843	97,1	0,993
R	CCACCGCCTTGCTTTATTC					
TGF- β 1						
F	AGGATCTGGGCTGGAAGTG	Citocina Imunoreguladora	134	L34956	95,1	0,981
R	CGGGTTGTGCTGGTTGTA					
T-bet						
F	GCTTCCAACACACACATC	Fator de Transcrição T _H 1	80	XM_548164	96,0	0,977
R	TGAGTGATCTCCGCATTC					
GATA3						
F	ATGACACGCTGGAGGACTTC	Fator de Transcrição T _H 2	106	XM_844060	98,5	0,969
R	TGGCTGGAGTGGCTGAAA					
FOXP3						
F	AAACAGCACATTCCCAGAGTTC	Fator de Transcrição T _{Reg}	102	XM_548996	95,1	0,981
R	AGGATGGCCAGCGGATCAG					
CCL2						
F	CCTGCTGCTATACTCA	Quimiocina MCP-1	91	U29653	96,3	0,979
R	GCTTCTTTGGGACACTTG					
CCL4						
F	TCCTACTGCCTGCTGCTT	Quimiocina MIP-1 β	76	AB183194	95,9	0,981
R	GCTGGTCTCAAAGTAATCTGC					
CCL5						
F	TTCTACACCAGCAGCAAG	Quimiocina RANTES	136	AB098562	98,7	0,991
R	TTCTACACCAGCAGCAAG					
CCL13						
F	CCCTATTCCTTGCTGCTT	Quimiocina MCP-4	84	AB162849	97,6	0,987
R	AGTGGCTGCTGGTGATTC					
CCL17						
F	TCCAAGGCAAGTCCATCT	Quimiocina TARC	128	AB054642	95,4	0,967
R	GAGGTCTCCAAATGATCCA					
CCL21						
F	AGTCTGGCAAGAAGGGAAAG	Quimiocina SLC	60	AB164433	96,7	0,972
R	GGGTCTGTGGCTGTTTCAAGT					
CCL24						
F	CCTAAGGCAGGAGTGGTCTT	Quimiocina Eotaxina-2	149	AB162851.1	95,3	0,968
R	AGGGCTTTGGTGTCTATTG					
CXCL8						
F	ACACTCCACACCTTTCCAT	Quimiocina IL-8	116	AF048717	98,7	0,977
R	GGCACACCTCATTTCATTG					

4.2.8 Detecção dos níveis de citocinas, fatores de transcrição e quimiocinas por qRT-PCR

O ensaio para avaliar a expressão gênica nas amostras de pele de cão, foi realizado utilizando 1 µL dos iniciadores na concentração de 100 nM, 5 µL de SYBR™ Green, 4 µL de cDNA diluído 5x com água livre de DNase, perfazendo um volume final de 10 µL de reação. O ensaio foi realizado em triplicata para todos os genes, com o constitutivo presente na mesma placa que os genes avaliados. Os valores de *baseline* e *threshold* utilizados, foram ajustados para 3-15 ciclos referente à *baseline* e de 0,2 para *threshold*. Os resultados foram expressos pelo método $2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{\text{Gene alvo}} - Ct_{\text{GAPDH}})}$. Em relação à expressão de citocinas, os valores obtidos pelo método $2^{-\Delta Ct}$ foi multiplicado por 100. Os valores de expressão dos fatores de transcrição e das quimiocinas obtido pelo método $2^{-\Delta Ct}$, foi multiplicado por 10^{13} e aplicado logaritmo, obtendo-se então números inteiros e positivos, o que torna melhor a visualização dos resultados, e conseqüentemente, facilita a análise crítica dos mesmos.

4.2.9 Avaliação da curva de dissociação dos iniciadores

A curva de dissociação dos iniciadores foi realizada no intuito de averiguar a ocorrência de possíveis amplificações inespecíficas. Ao final dos 40 ciclos de PCR realizados para amplificação gênica é adicionada uma etapa na qual a temperatura aumenta gradualmente de 60°C á 95°C, mantendo-se por 15s em cada temperatura, durante o qual é feita a leitura da emissão de fluorescência. Na medida em que os produtos gerados por PCR desnaturam com o aumento da temperatura, o sinal fluorescente emitido pelo SYBR™ Green é reduzido. O gráfico resultante permite verificar se há um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação devido a diferenças de T_m entre produtos de PCR com diferente número e composição de bases de cada *amplicon*.

As curvas de dissociação referentes aos genes avaliados estão mostradas abaixo nas Figuras 3,4 e 5.

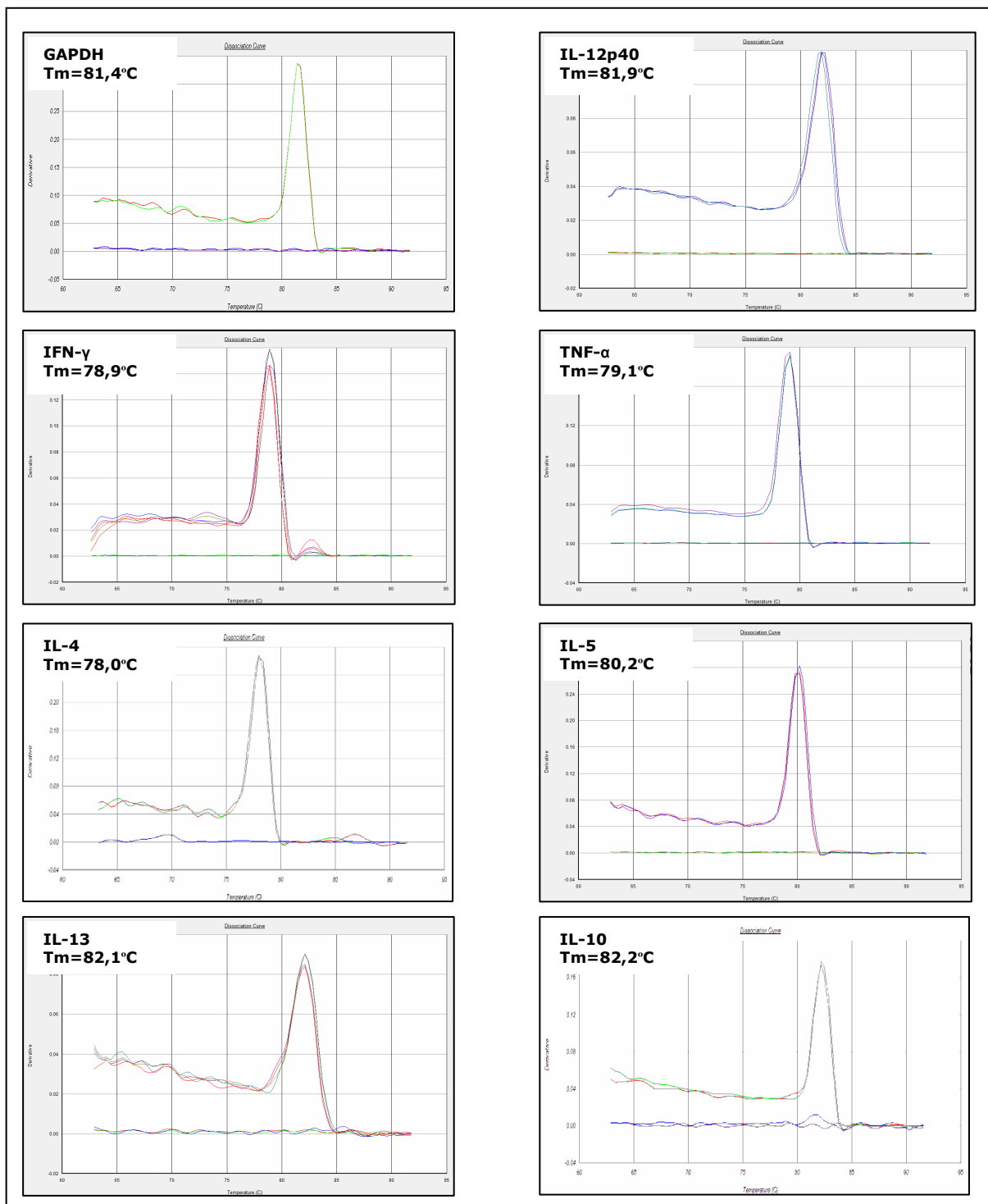


Figura 3: Curva de dissociação referente aos iniciadores GAPDH, IL-12p40, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10. No eixo x está representado a temperatura de dissociação do *amplicon* gerada pela reação de PCR e no eixo Y a derivada do valor de emissão de fluorescência.

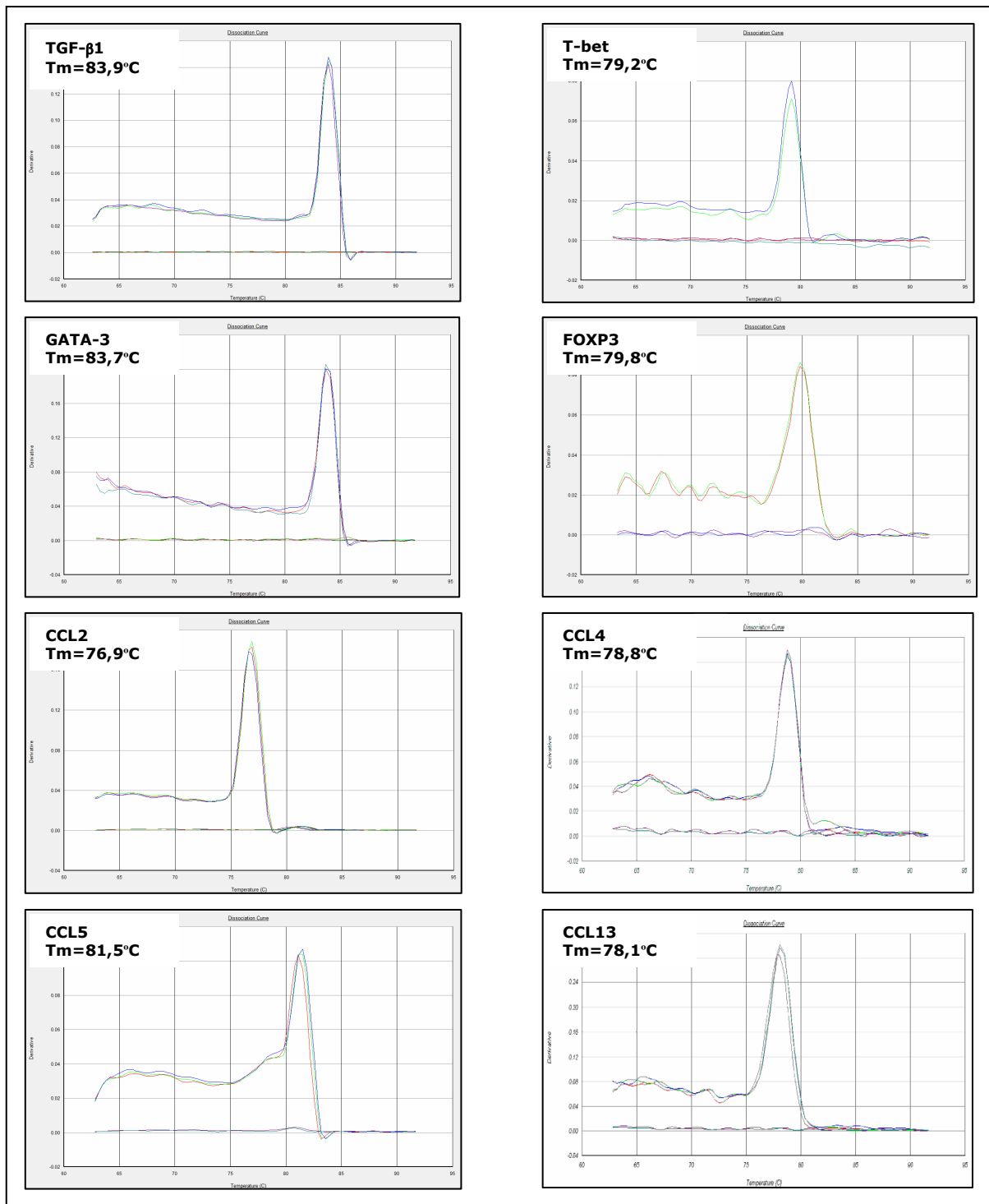


Figura 4: Curva de dissociação referente aos iniciadores TGF-β1, T-bet, GATA-3, FOXP3, CCL2, CCL4, CCL5 e CCL13. No eixo x está representado a temperatura de dissociação do *amplicon* gerada pela reação de PCR e no eixo Y a derivada do valor de emissão de fluorescência.

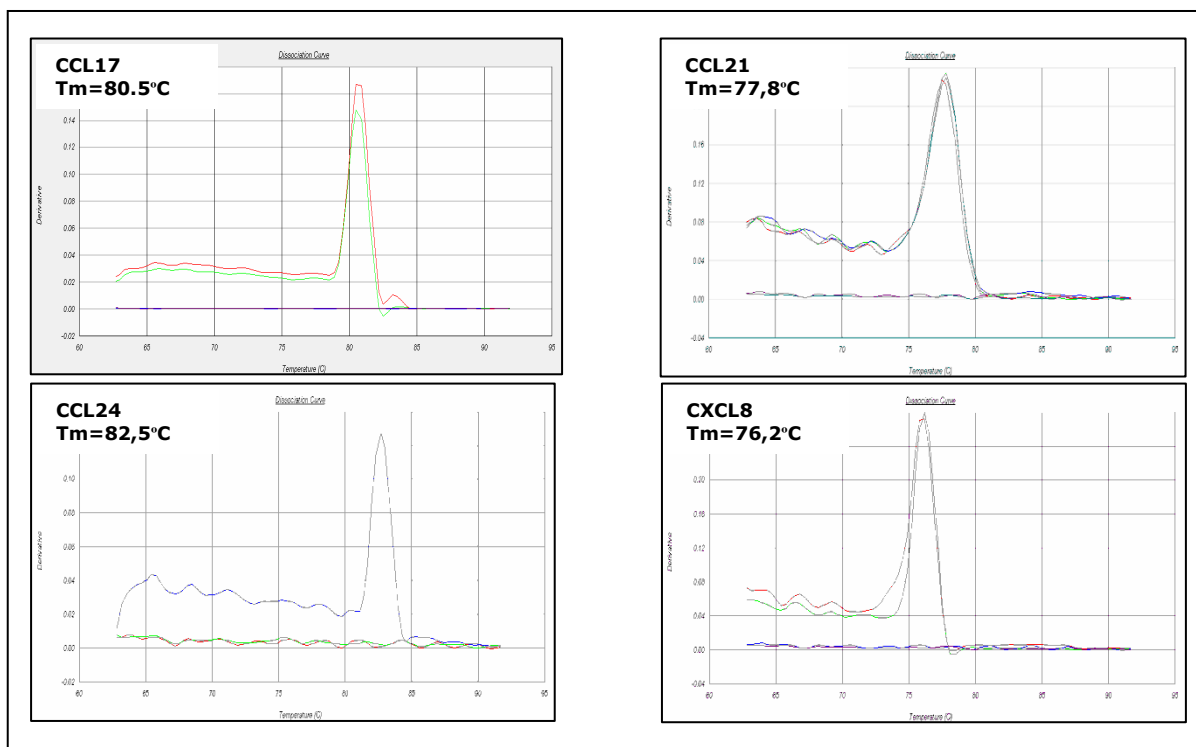


Figura 5: Curva de dissociação referente aos iniciadores CCL17, CCL21, CCL24 e CXCL8. No eixo x está representado a temperatura de dissociação do *amplicon* gerada pela reação de PCR e no eixo Y a derivada do valor de emissão de fluorescência.

4.2.10 Avaliação da curva de eficiência dos iniciadores

Para avaliar a eficiência da reação de PCR para os diversos iniciadores utilizados nesse trabalho, foram construídas curvas padrão utilizando diluições seriadas de 10x de uma amostra de cDNA de pele de cão. O ensaio foi realizado em duplicata e a concentração dos iniciadores foi de 100 nM. Os valores foram plotados em um gráfico onde o eixo X apresentava o Log das concentrações de cDNA e o eixo Y, o valor de C_T para cada diluição. Os primers foram considerados adequados para avaliar expressão gênica pelo sistema SYBRTM Green, quando apresentavam eficiência de reação acima de 95% que é determinado pelo *slope* da curva aplicado na seguinte formula: $\text{Eficiência} = [10^{(-1/\text{slope})} - 1] \times 100$. Os valores de *baseline* e *threshold* para os primers utilizados foram ajustados para 3-15 ciclos referente à *baseline* e de 0,2 para *threshold*. Segue abaixo como exemplo, os *plot* de amplificação e a curva de eficiência referente ao gene GAPDH demonstrado nas figuras 6 e 7. As eficiências de reação dos primers utilizados, bem como, seus respectivos coeficientes de linearidade estão demonstradas na Tabela II.



Figura 6: Plot de amplificação referente à curva de eficiência do GAPDH utilizando diluição seriada de 10x de cDNA. Em X está demonstrado o valor dos ciclos de PCR e em Y os valor de ΔRn .

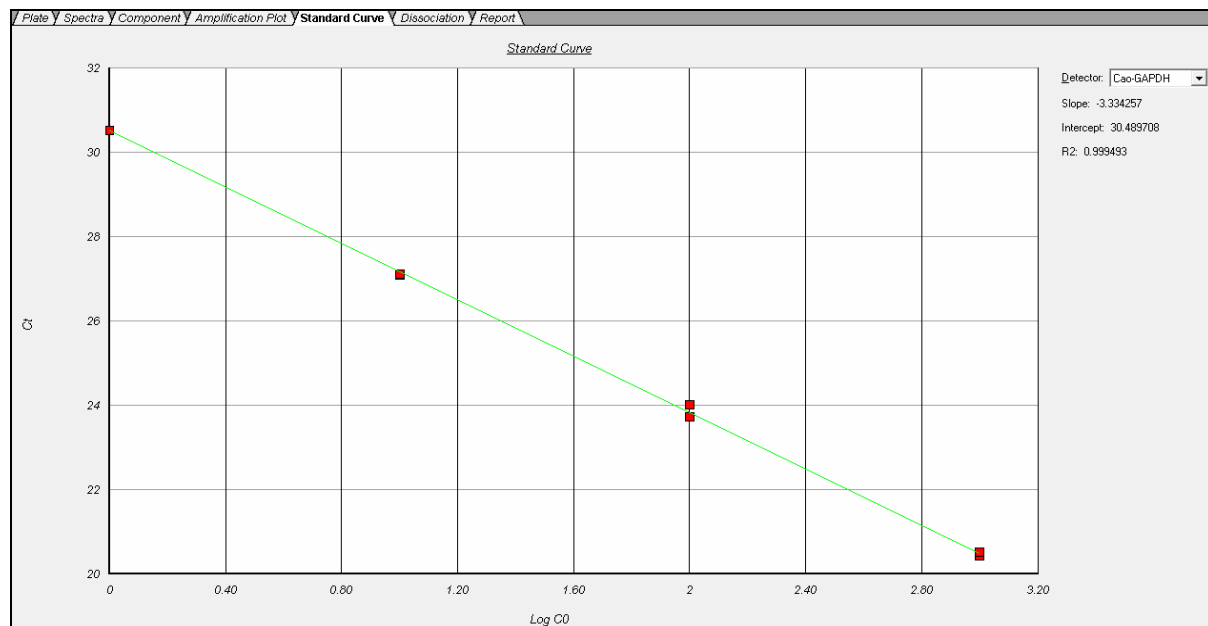


Figura 7: Curva padrão referente ao gene GAPDH utilizando diluição seriada de 10x de cDNA. Em X estão demonstrados os valores de Log da concentração de cDNA e em Y os valores de C_T correspondentes a cada diluição. A direita do gráfico estão representados os valores de *slope* e de coeficiente de linearidade.

4.3 Clonagem, sequenciamento e análise das sequências

4.3.1 Purificação dos amplicons

Os produtos de PCR obtidos no item 4.2.6 foram purificados para posteriormente serem inseridos em um vetor plasmidial com objetivo de realizar a clonagem gênica. Nesta etapa, o produto da reação foi transferido para um tubo de 1,5 mL e adicionado o equivalente a 1/10 do volume da reação de acetato de sódio (3 M, pH 7,0) e 2,5X de etanol absoluto. Após homogeneização foi incubado a -20°C por 30 minutos seguido de centrifugação a $14000 \times g$ por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e posteriormente adicionado $500 \mu\text{L}$ de etanol 70%, gelado, e centrifugado $14000 \times g$ por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram abertos em um fluxo laminar a temperatura ambiente até completa secagem e posteriormente ressuspendido em água livre de nucleases.

4.3.2 Reação de ligação de produto de PCR ao plasmídeo p-GEM-T Easy Vector Systems

Esse procedimento consiste na introdução de um produto de PCR em um plasmídeo. Para isso, utilizou-se o vetor “p-GEM-T Easy Vector Systems” (Promega, Madison, WI, USA). O plasmídeo utilizado contém uma 3`-T terminal em ambas as fitas de DNA plasmidial no qual se liga a 3`-A do *amplicon* introduzida pela Taq polimerase durante a reação de PCR. Esse plasmídeo contém um gene de resistência a ampicilina e um gene para β -galactosidase além de sítios de restrição para enzimas de corte. O mapa do vetor utilizado está descrito na Figura 8.

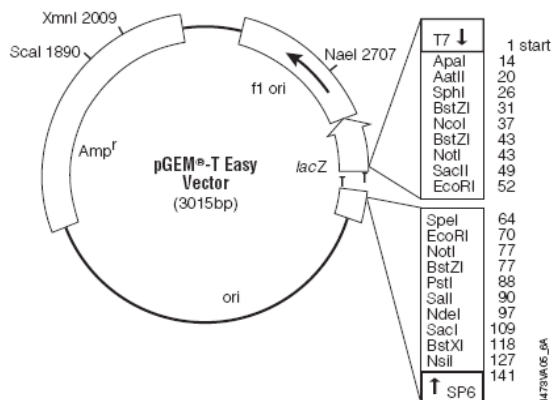


Figura 8: Mapa do vetor p-GEM-T Easy Vector System. A sequência representada mostra a região de clonagem, os sítios para enzimas de restrição, região codificadora para o gene de resistência e para β -galactosidase

Para cada reação de ligação, foi preparado um mix contendo 5 μL de “2X Rapid Ligation Buffer”, 1 μL de “p-GEM-T Easy Vector” e 1 μL de “T4 DNA Ligase” e adicionado em um tubo de 0,2 mL contendo 3 μL de produto de PCR purificado. Após ser homogeneizado o tubo foi incubado a temperatura de 4°C por 16 horas para ocorrer à reação de ligação e posteriormente armazenado em geladeira até o momento de uso na etapa de transformação.

4.3.3 Preparação de células competentes (*Escherichia coli* – cepa DH5 α)

Células de *E. coli* (cepa DH5 α) previamente estocadas a -80°C foram semeadas em meio LB-Ágar e incubadas à temperatura de 37°C *overnight*. Posteriormente, foi retirado uma colônia isolada de bactéria e inoculada em 5 mL de meio LB-caldo e incubado sob agitação em *shaker* a 37°C a 200 rpm *overnight*. Foram adicionados 250 μL desta cultura em 25 mL de meio LB-caldo e incubado em *shaker* a 37°C sob agitação a 200 rpm até atingir uma densidade óptica entre 0,3-0,5 á 600 nm, considerada ótima para obtenção de células em fase log. Foi retirado 250 μL desta cultura e incubado em 25 mL de meio SOB suplementado 250 μL MgSO₄ (1 M) e MgCl₂ (1 M) a 37°C sob agitação a 200 rpm. Em seguida, a cultura foi incubada em banho de gelo por 30 minutos e posteriormente centrifugado a 3000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 10 mL de tampão PIPES e novamente centrifugado a 3000 x g a 4°C por 10 minutos. Essa etapa foi repetida seguida de banho de gelo por 30 minutos e centrifugado a 2000 x g a 4°C por 10 minutos. O *pellet* foi ressuspensionado em 1,2 mL de tampão PIPES e estocado em alíquotas de 200 μL á -80°C até a etapa de transformação.

4.3.4 Transformação bacteriana

Em tubos de 1,5 mL foram utilizadas para cada 5 μL de produto de ligação, 50 μL de células competentes previamente armazenadas a -80°C. Em seguida, os tubos foram incubados em banho de gelo por 30 minutos seguido por banho maria a 42°C por 2 minutos e novamente incubados em banho de gelo por 2 minutos. Foi então adicionado 900 μL de meio LB-caldo e incubados por 90 minutos a 37°C em *shaker* a 200 rpm. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm, por 5 minutos e em seguida o sobrenadante foi descartado restando um *pellet* de aproximadamente 100 μL . Foram então preparadas placas de petri

contendo meio LB-Ágar adicionado de ampicilina, IPTG e X-gal. Nessas placas foram então adicionados os *pellet* restantes nos tubos de 1,5 mL e distribuídos uniformemente pela placa utilizando uma alça de Drigalski. As placas foram então incubadas *overnight* a 37°C e a visualização de colônias isoladas brancas indicaram células recombinantes que apresentaram o plasmídeo com o produto de PCR inserido.

4.3.5 Purificação dos plasmídeos recombinantes por lise alcalina

Foi selecionada uma colônia bacteriana que apresentava coloração branca e incubada em tubo falcon de 15 mL contendo 5 mL de meio LB-caldo com ampicilina a 37°C *overnight* sob agitação a 200 rpm. Posteriormente, foi retirado 1,5 mL dessa cultura e centrifugado a 14000 rpm por 3 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e então adicionado 1,5 mL de meio LB-caldo e novamente centrifugado a 14000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi então novamente descartado e o *pellet* restante foi resuspenso em 100 µL de uma solução contendo glicose (50 mM), EDTA (10 mM), solução de Tris-HCl (25 mM, pH 8,0) e em adição, 20 µL de RNase 20 mg/mL. Após 5 minutos de incubação em banho de gelo, foi adicionado 200 µL de uma solução contendo NaCl (0,2 M) e SDS 1% e homogeneizado por inversão. Posteriormente, os tubos foram incubados em banho de gelo por 5 minutos e em seguida adicionado 150 µL de solução de acetato de potássio (3 M, pH 4,8, gelado) e homogeneizado por inversão. Os tubos foram então incubados por 5 minutos em banho de gelo e após esta etapa foram centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi então transferido para um novo tubo e adicionado 500 µL de isopropanol. Os tubos foram incubados por 15 segundos a temperatura de -20°C e posteriormente centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado 1 mL de etanol 70% e em seguida centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, os tubos foram deixados em fluxo laminar com a tampa aberta para completa secagem do *pellet* e em seguida ressuspenso em 50 µL de água livre de nucleases e armazenado a temperatura de -20°C. As amostras de plasmídeos purificados foram avaliadas em gel de agarose á 0,8%.

4.3.6 Sequenciamento e análise das sequências

Os produtos de PCR clonados no vetor *pGEM[®]-T Easy Vector* foram sequenciados utilizando o equipamento *ABI 3100 Automated Sequencer* (PE Applied Biosystems) e o Kit *Dye Terminator* segundo recomendações do fabricante. A análise das sequências utilizadas nesse estudo está descrita na Tabela III, e segue abaixo um exemplo das etapas feitas para análise do *amplicon* gerado pelos primers referente ao gene GAPDH.

Resultado do sequenciamento do amplicon referente ao gene GAPDH clonado no vetor p-GEM-T Easy Vector Systems, sequência Forward

Forward: 5`-TTCCACGGCACAGTCAAG-3`

Reverse: 3`-GTGATGCTGGTGCTGAGT-5`

```
GCCTATAGATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGC
AGGCGGCCGCGAATTCAGTACTAGTGATTTTCCACGGCACAGTCAAGGCTGAGAACGGGAAACTT
GTCATCAACGGGAAGTCCATCTCCATCTTCCAGGAGCGAGATCCCGCCAACATCAAATGGGG
TGATGCTGGTGCTGAGTAATCGAATTCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGT
CGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCTGTTTTACAACGTC
GTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTTCGCC
AGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAA
TGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAG
CGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTC
TCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGA
TTTAGTGCTTTACGGCACCTCN
```

Alinhamento utilizando a ferramenta BLAST

```
>gb|DQ403060.1| Canis familiaris glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
(GAPDH)mRNA, partial cds
Length=672
```

```
GENE ID: 403755 GAPDH | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
[Canis lupus familiaris] (10 or fewer PubMed links)
```

```
Score = 213 bits (115), Expect = 1e-52
Identities = 115/115 (100%), Gaps = 0/115 (0%)
Strand=Plus/Plus
```

```
Query 1      TTCCACGGCACAGTCAAGGCTGAGAACGGGAAACTTGTTCATCAACGGGAAGTCCATCTCC 60
|||||
Sbjct 85      TTCCACGGCACAGTCAAGGCTGAGAACGGGAAACTTGTTCATCAACGGGAAGTCCATCTCC 144

Query 61      ATCTTCCAGGAGCGAGATCCCGCCAACATCAAATGGGGTGATGCTGGTGCTGAGT 115
|||||
Sbjct 145     ATCTTCCAGGAGCGAGATCCCGCCAACATCAAATGGGGTGATGCTGGTGCTGAGT 199
```


Resultado do sequenciamento do amplicon referente ao gene GAPDH clonado no vetor p-GEM-T Easy Vector Systems, sequência Reverse.

Forward – 3`-CTTGACTGTGCCGTGGAA-5`

Reverse – 5`-ACTCAGCACCAGCATCAC-3`

Alinhamento utilizando a ferramenta BLAST

GGNNCNGANGTCTCCCGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTACTCAGCACC
 AGCATCACCCCATTTGATGTTGGCGGGATCTCGCTCCTGGAAGATGGAGATGGACTTCCCGT
 TGATGACAAGTTTCCCGTTCTCAGCCTTGACTGTGCCGTGGAAAATCACTAGTGAATTCGCG
 GCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATT
 CTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTG
 TTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTG
 CCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGA
 AACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTAT
 TGGGCGCTCTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAG
 CGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGA
 AAGAACATGTGNGCA

>gb|DQ403060.1| Canis familiaris glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)mRNA, partial cds
 Length=672

GENE ID: 403755 GAPDH | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
 [Canis lupus familiaris] (10 or fewer PubMed links)

Score = 213 bits (115), Expect = 1e-52
 Identities = 115/115 (100%), Gaps = 0/115 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 1 ACTCAGCACCAGCATCACCCCATTTGATGTTGGCGGGATCTCGCTCCTGGAAGATGGAGA 60
      |||
Sbjct 199 ACTCAGCACCAGCATCACCCCATTTGATGTTGGCGGGATCTCGCTCCTGGAAGATGGAGA
140

Query 61 TGGACTTCCCGTTGATGACAAGTTTCCCGTTCTCAGCCTTGACTGTGCCGTGGAA 115
      |||
Sbjct 139 TGGACTTCCCGTTGATGACAAGTTTCCCGTTCTCAGCCTTGACTGTGCCGTGGAA 85
    
```

Tabela III: Análise das sequências de *amplicons* referente aos genes avaliados. Está sendo mostrado o número de acesso das sequências no Gene Bank, a identidade com as sequências no GenBank e o E-value

Gene	Acesso	Identidade	E-value
GAPDH	AB038240	115/115	1e-52
IL-12p40	U49100	109/109	2e-49
IFN- γ	AF126247	113/113	2e-51
TNF- α	DQ923808	94/94	4e-41
IL-4	AF239917	123/123	5e-57
IL-5	AF331919	106/106	1e-47
IL-13	AF244915	148/148	8e-71
IL-10	U33843	129/129	2e-60
TGF- β 1	L34956	134/134	4e-63
T-bet	XM_548164	80/80	2e-33
GATA-3	XM_844060	106/106	1e-47
FOXP3	XM_548996	102/102	1e-37
CCL2	U29653	91/91	2e-39
CCL4	AB183194	76/76	3e-31
CCL5	AB098562	136/136	3e-64
CCL13	AB162849	84/84	1e-35
CCL17	AB054642	128/128	8e-60
CCL21	AB164433	60/60	2e-22
CCL24	AB162851.1	149/149	2e-71
CXCL8	AF048717	116/116	3e-53

4.4 Análise da celularidade tecidual através da contagem diferencial de leucócitos nas amostras de pele

Foi realizada avaliação histológica das amostras de pele coletadas dos animais utilizando o método de coloração hematoxilina-eosina (HE). Para identificar quais tipos celulares predominavam no infiltrado inflamatório presente nas secções dos tecidos avaliados, foi realizada uma contagem diferencial das células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos, macrófagos, eosinófilos e basófilos). A contagem foi realizada a partir da leitura no microscópio óptico Olympus Optical Co. (Tokyo, Japão – modelo CH3RF100), empregando-se aumento de 10x, 20x e 40x e avaliando 30 campos aleatórios e os resultados foram expressos em percentagem. As imagens foram capturadas utilizando a micro câmera Leica DM5000B (Leica Microsystems-Switzerland Ltd., Heerbrugg, Suíça) e o *software* “Leica Application Suite” (versão 2.4.0 R1).

4.5 Análise estatística dos dados

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do *software* GraphPad Prism 5.00 (Prism Software, Irvine, CA, USA). A normalidade dos dados foi demonstrada pelo teste Kolmogorov-Smirnoff. Dependendo da natureza dos dados em relação à normalidade, foram empregadas diferentes estratégias de análise: a análise de variância (ANOVA) foi empregada para dados de natureza paramétrica seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey e para os dados de natureza não-paramétrica foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido da comparação entre os pares de tratamento utilizando o teste de Mann-Whitney e aplicando a correção de Bonferroni, a fim de evitar a inflação de erro global dos testes. Com o objetivo de investigar associações entre os parâmetros avaliados com estado clínico e densidade parasitária cutânea, foram realizadas análises de correlação utilizando o teste de correlação de Spearman ou Pearson, de acordo com a natureza dos dados em relação à normalidade. Os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi menor do que 0,05 ($p < 0,05$). As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos encontram-se representadas pelas letras a , b , c e d correspondente aos grupos CNI, CA e BP, CO e MP e CS e AP, respectivamente.

5 Resultados

Apresentação dos resultados

O presente trabalho traz como resultados um conjunto de dados relevantes para o entendimento dos eventos imunopatológicos no compartimento dérmico durante a infecção natural de cães por *L. chagasi*. O desenvolvimento de formas clínicas da LVC, bem como, densidade parasitária dérmica, encontram-se intimamente relacionados com o repertório de citocinas, fatores de transcrição, quimiocinas e o perfil celular inflamatório da pele. Adicionalmente, o estabelecimento de análises de correlações entre citocinas serão fundamentais para ampliar nosso entendimento a respeito da função desses mediadores e de sua rede de interação no sistema imune canino durante a infecção natural por *L. chagasi*.

Diante disso, para facilitar o entendimento dos dados gerados no presente estudo, os resultados foram organizados e descritos em cinco capítulos. No primeiro capítulo, será mostrado a análise de correlação entre as formas clínicas da LVC e a densidade parasitária na pele. No capítulo II, encontra-se apresentados os resultados da avaliação da expressão de citocinas, fatores de transcrição e quimiocinas, bem como da celularidade dérmica do infiltrado inflamatório nas diferentes formas clínicas da LVC. Ainda no capítulo II encontra-se a análise de correlação entre esses parâmetros com progressão clínica da doença. No terceiro capítulo, foi realizado um estudo semelhante ao capítulo II, onde também foram avaliados os mesmos parâmetros (citocinas, quimiocinas, fatores de transcrição e celularidade do infiltrado inflamatório) em relação aos diferentes graus de densidades parasitárias na pele. Nesse mesmo capítulo, foi também estabelecida uma análise de correlação entre esses parâmetros imunológicos com o parasitismo tecidual. No capítulo IV, foi realizada uma análise de correlação entre a expressão de citocinas do Tipo I e do Tipo II, bem como, entre citocinas do Tipo I e imunoreguladoras (IL-10 e TGF- β 1). Essas correlações foram importantes para evidenciar a ocorrência de um padrão misto de resposta imune na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, independente do estado clínico e da densidade parasitária apresentada por esses animais. No quinto e último capítulo, buscou-se evidenciar ocorrências de associações entre expressão de quimiocinas e a celularidade diferencial observada no infiltrado inflamatório tecidual.

*5.1 Capítulo I: Correlação entre formas clínicas da LVC e
densidade parasitária na pele de cães naturalmente infectados
por Leishmania chagasi*

5.1.1 Correlação entre forma clínica da LVC e densidade parasitária na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* avaliado através do índice de parasitismo tecidual

Na análise da relação entre as densidades parasitárias determinadas pelo índice de parasitismo tecidual ou “*Leishman Donovan Units*” e as diferentes formas clínicas da LVC, foi possível observar a ocorrência de correlação positiva entre a densidade parasitária na pele ($r=0,4409/p=0,0080$) com o aumento das alterações clínicas da doença, medida pela evolução do quadro clínico entre as formas clínicas assintomática, oligossintomática e sintomática. Além disso, a densidade parasitária apresentou-se aumentada ($p<0,05$) na pele de cães sintomáticos em comparação aos cães assintomáticos (Figura 9).

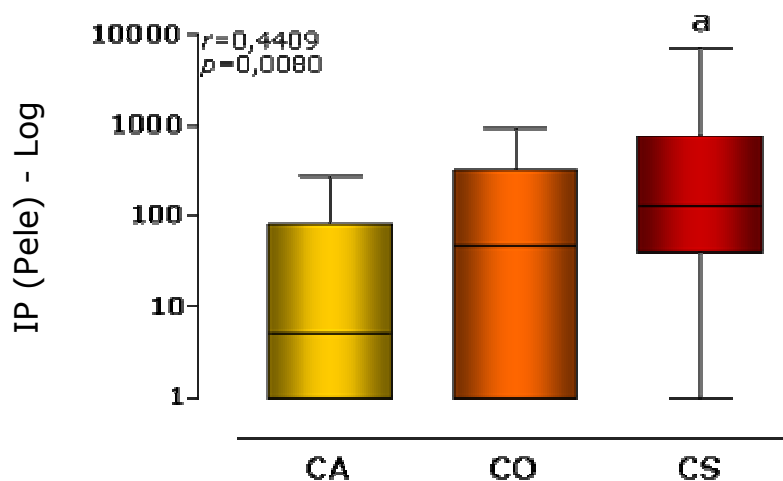


Figura 9: Densidades parasitárias determinadas pelo índice de parasitismo (IP) na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da doença. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimos, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. Cães assintomáticos=CA (■, $n=10$); cães oligossintomáticos=CO (■, $n=10$); cães sintomáticos=CS (■, $n=15$). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pela letra a, correspondente ao grupo CA. As análises de correlação foram estabelecidas utilizando a correlação de Spearman e os valores de coeficiente linear (r) e p-value (p) estão demonstrados no canto superior esquerdo do gráfico.

*5.2 Capítulo II: Parâmetros imunológicos e histopatológicos
no tecido cutâneo de cães naturalmente infectados por
Leishmania chagasi e sua associação com estado clínico na
leishmaniose visceral canina*

5.2.1 Avaliação da expressão de citocinas Tipo I, II e imunoreguladoras em cães naturalmente infectados por *L. chagasi* e cães não infectados e sua correlação com o estado clínico da LVC

Os dados de expressão das citocinas do Tipo I (IFN- γ , IL-12p40 e TNF- α), Tipo II (IL-4, IL-5 e IL-13) e imunoreguladoras (IL-10 e TGF- β 1) de acordo com estado clínico da LVC, estão apresentados na Figura 10 de forma comparativa entre os grupos clínicos e o grupo controle.

A análise da expressão de citocinas do Tipo I revelou aumento ($p < 0,05$) da expressão de IFN- γ em CA e CO em relação ao grupo CNI. Além disso, foi observado que TNF- α apresentou-se aumentado ($p < 0,05$) em CA quando comparado com os grupos CNI e CS. Através de análises de correlação, observou-se menor expressão dessas citocinas (IFN- γ e TNF- α) com o aumento do número de sinais clínicos da doença (IFN- γ , $r = -0,3988/p = 0,0263$ e TNF- α , $r = -0,5496/p = 0,0020$), o que está associado a um pior prognóstico na LVC.

Interessantemente, os dados do presente trabalho revelaram aumento ($p < 0,05$) dos níveis da citocina do Tipo II IL-5 no grupo CA em relação ao CNI. Adicionalmente, observou-se aumento ($p < 0,05$) dos níveis de IL-13 no grupo CA em relação aos demais grupos, associado a correlação negativa desse mediador com a evolução clínica da doença ($r = -0,6879/p < 0,0001$). A análise do perfil de citocinas imunoreguladoras revelou que o grupo CO exibiu níveis elevados ($p < 0,05$) de IL-10 quando comparado aos grupos CNI e CS. Em relação à expressão de TGF- β 1, observou-se níveis aumentados ($p < 0,05$) dessa citocina no grupo CO em relação ao grupo CNI.

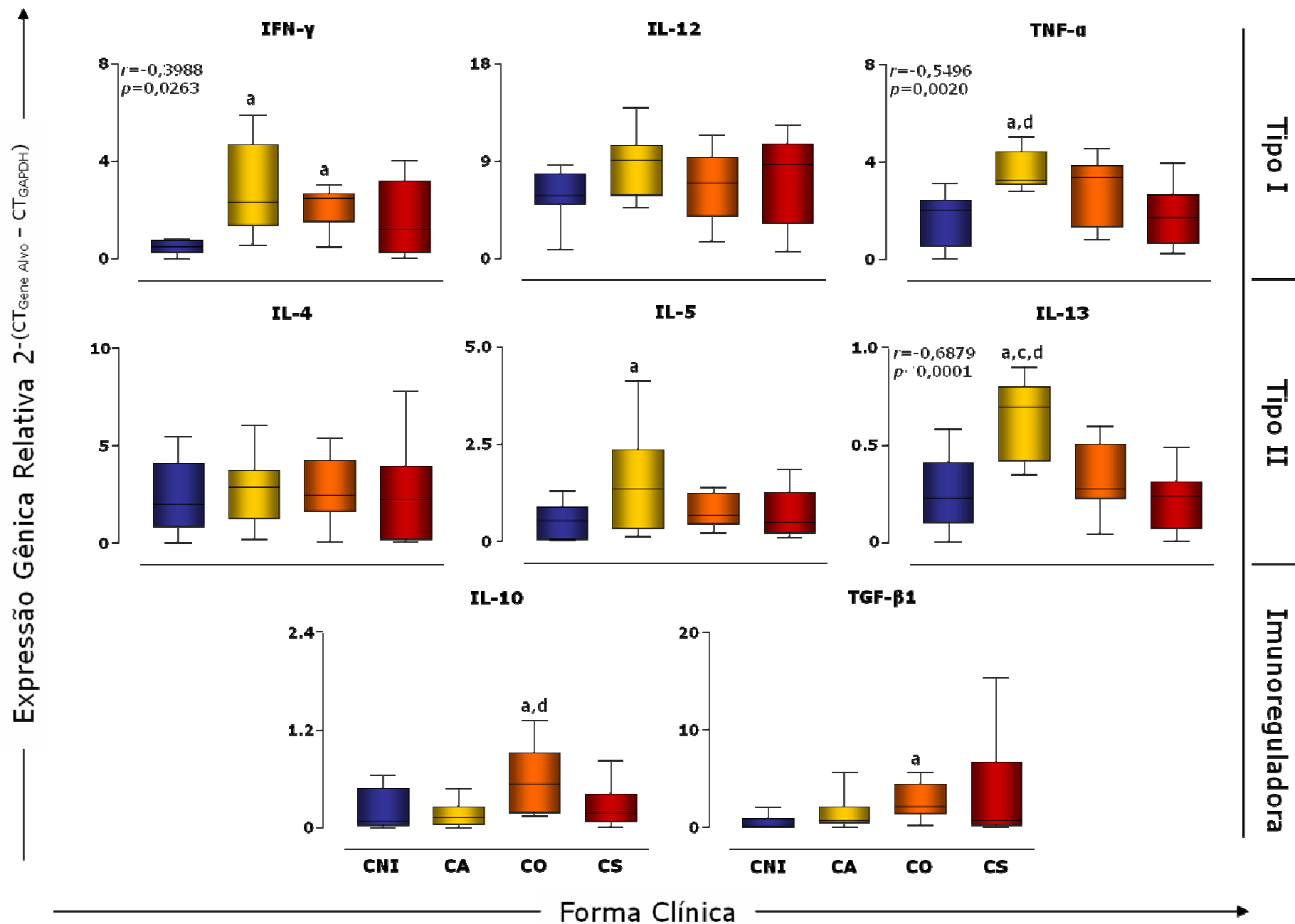


Figura 10: Análise da expressão de RNAm de citocinas do Tipo I, II e imunoreguladoras na pele de cães não infectados e cães naturalmente infectados por *L. chagasi* portadores de diferentes formas clínicas. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimos, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. Cães não infectados=CNI (■, $n=16$); cães assintomáticos=CA (■, $n=10$); cães oligossintomáticos=CO (■, $n=10$); cães sintomáticos=CS (■, $n=15$). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras *a*, *c* e *d* correspondente aos grupos CNI, CO e CS, respectivamente. As análises de correlação foram estabelecidas considerando todos os dados de animais infectados (CA, CO e CS) e os valores de coeficiente linear (r) e p-value (p) estão sendo demonstrados apenas nos gráficos onde foi encontrada correlação significativa. 74

5.2.2 Avaliação da razão de citocinas de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* e cães não infectados e sua associação com o estado clínico da LVC

A avaliação da razão de citocinas IFN- γ /IL-4, IFN- γ /IL-10, IFN- γ /TGF- β 1 e IL-12/IL-10 foi avaliada na pele de cães portadores de LV e os resultados encontram-se apresentados de forma comparativa entre grupos clínicos e o grupo controle (Tabela IV).

A análise dos dados revelou aumento ($p < 0,05$) da razão IFN- γ /IL-4 nos grupos CA e CO quando comparado ao grupo CNI. Em relação às razões IFN- γ /IL-10, IFN- γ /TGF- β 1 e IL-12/IL-10, não foram observadas diferenças entre os grupos avaliados nesse estudo de acordo com estado clínico da LVC.

Tabela IV: Análise da razão de citocinas de acordo com estado clínico da LVC

Razão	CNI	Formas Clínicas		
		CA	CO	CS
IFN- γ /IL-4	0,32 \pm 0,15	0,77 \pm 0,50 ^a	0,80 \pm 0,43 ^a	0,53 \pm 0,32
IFN- γ /IL-10	9,68 \pm 18,69	2145 \pm 6739	73,65 \pm 212	1334 \pm 3607
IFN- γ /TGF- β 1	16,53 \pm 35,39	8,57 \pm 17,25	6,64 \pm 5,21	4,87 \pm 8,04
IL-12/IL-10	178,3 \pm 447,6	78,14 \pm 95,25	25,36 \pm 32,39	67,27 \pm 90,87

As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras *a* correspondente ao grupo CNI.

5.2.3 Avaliação da expressão dos fatores de transcrição T-bet, GATA-3 e FOXP3 na pele de cães naturalmente infectados por L. chagasi e cães não infectados e sua correlação com o estado clínico da LVC

A expressão dos fatores de transcrição T-bet, GATA-3 e FOXP3 foi avaliada na pele de cães portadores de LV e os resultados encontram-se apresentados de forma comparativa entre os grupos clínicos e o grupo controle (Figura 11).

A análise dos dados revelou expressão aumentada de T-bet em CO e CS quando comparado ao grupo CNI ($p < 0,05$), entretanto não foi observada correlação com evolução clínica. Na avaliação da expressão de GATA-3 e FOXP3, foi encontrada diminuição na expressão desses fatores de transcrição no grupo CS quando comparado aos grupos CA e CO ($p < 0,05$). Além disso, nas análises de correlação com evolução clínica, foi observada correlação negativa entre a expressão de GATA-3 e FOXP3 ($r = -0,6654/p < 0,0001$; $r = -0,3810/p = 0,0239$, respectivamente).

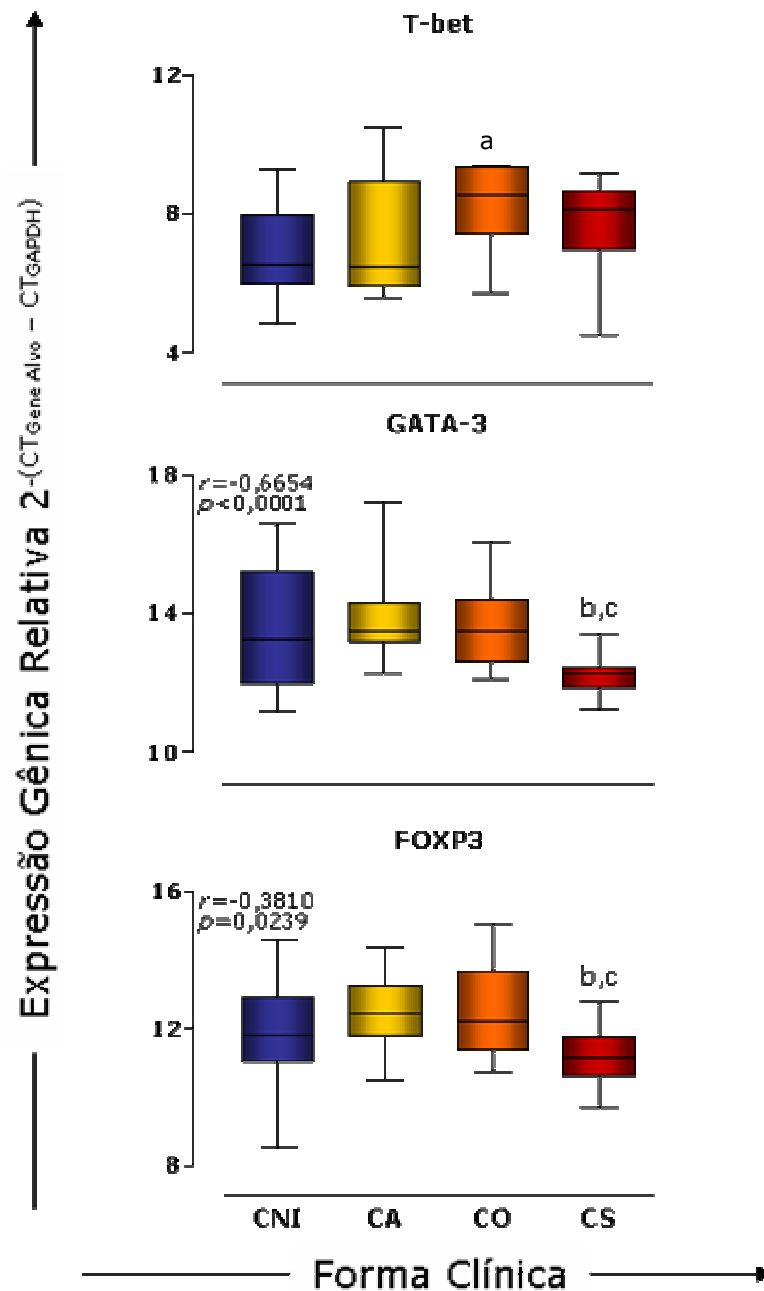


Figura 11: Avaliação da celularidade na pele de cães não infectados e cães naturalmente infectados por *L. chagasi* portadores de diferentes formas clínicas. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimos, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. Cães não infectados=CNI (■, $n=16$); cães assintomáticos=CA (■, $n=10$); cães oligossintomáticos=CO (■, $n=10$); cães sintomáticos=CS (■, $n=15$). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras *a*, *b* e *c* correspondentes aos grupos CNI, CA e CO, respectivamente. As análises de correlação foram estabelecidas utilizando apenas os grupos com animais infectados (CA, CO e CS) e os valores de coeficiente linear (r) e p -value (p) estão sendo demonstrados apenas nos gráficos onde foi encontrada correlação significativa.

5.2.4 Avaliação da expressão de quimiocinas na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* e cães não infectados e sua correlação com o estado clínico da LVC

No presente estudo, foram selecionadas oito quimiocinas (CCL2, CCL4, CCL5, CCL13, CCL17, CCL21, CCL24 e CXCL8) pertencentes a diferentes famílias e associadas à regulação da migração de diversos tipos celulares. Os resultados relacionados à avaliação da expressão dessas quimiocinas, bem como, a associação dessas com formas clínicas da LVC estão apresentados na Figura 12 comparativamente entre todos os grupos de cães infectados e o grupo controle.

A expressão de CCL2 apresentou-se aumentada ($p < 0,05$) no grupo CS em relação ao grupo CNI. A quimiocina CCL4, apresentou-se com elevada ($p < 0,05$) expressão nos grupos CA e CS em relação ao grupo CNI. CCL5 apresentou-se aumentada nos grupos CO e CS em relação ao grupo CNI ($p < 0,05$). As demais quimiocinas não apresentaram diferenças significativas na expressão entre os grupos estudados. Além disso, não foi detectada nenhuma correlação entre níveis de expressão das quimiocinas avaliadas em relação à evolução clínica da doença.

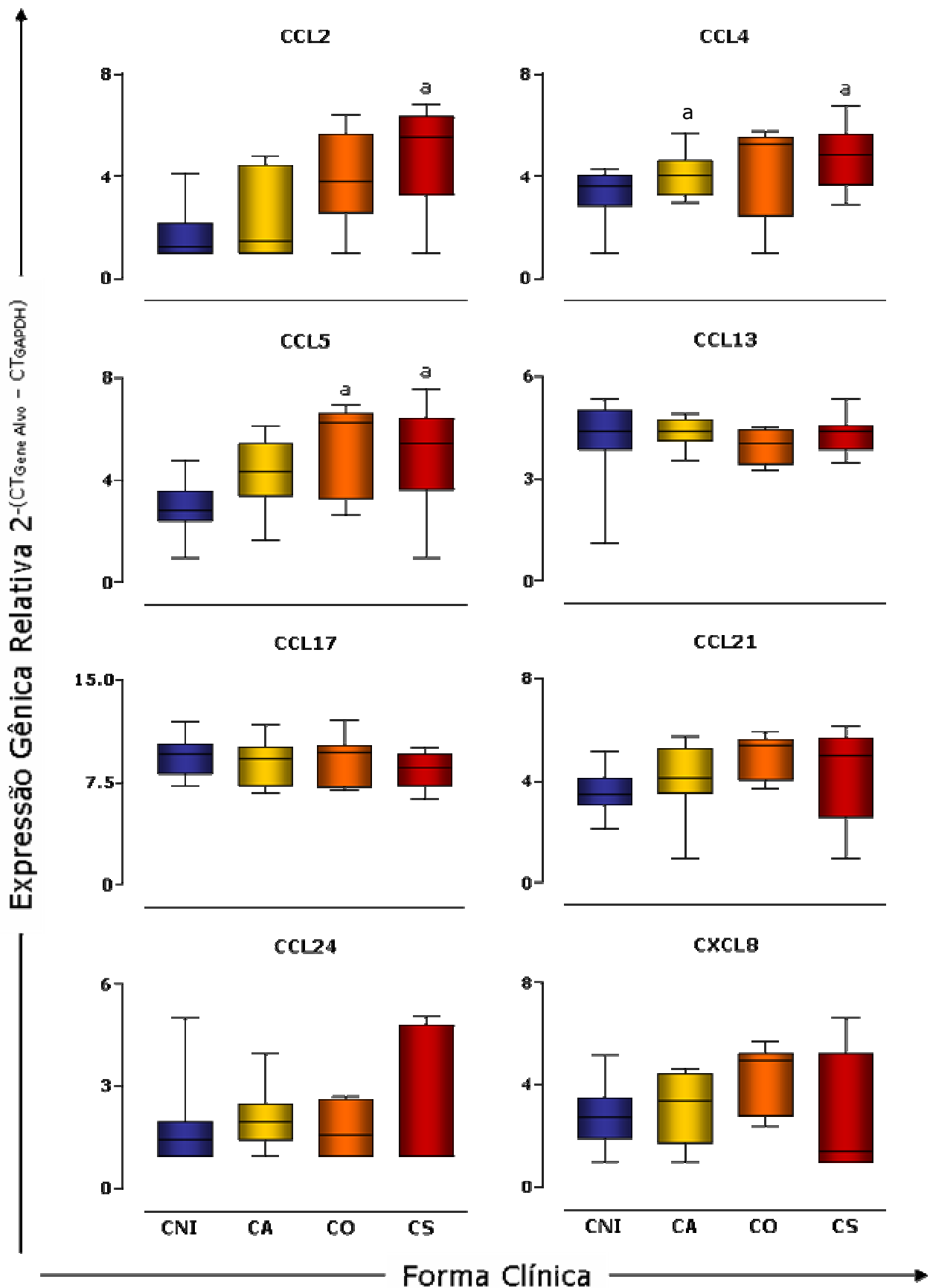


Figura 12: Avaliação da expressão de RNAm de quimiocinas na pele de cães não infectados e cães naturalmente infectados por *L. chagasi* portadores de diferentes formas clínicas. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimos, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. Cães não infectados=CNI ($n=16$); cães assintomáticos=CA ($n=10$); cães oligossintomáticos=CO ($n=10$); cães sintomáticos=CS ($n=15$). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representada pela letra *a* correspondente ao grupo CNI.

5.2.5 Avaliação do perfil celular inflamatório na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* e cães não infectados e sua correlação com o estado clínico da LVC

O estudo da celularidade tecidual cutânea contou com a avaliação do percentual dos tipos celulares (neutrófilo, linfócitos, macrófagos, eosinófilos e basófilos) presentes no infiltrado inflamatório da derme de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* e em cães não infectados (Figura 13). Nesse contexto, foi observado aumento ($p < 0,05$) do percentual de linfócitos no grupo CA quando comparado aos grupos CNI e CS. Além disso, foi observado aumento ($p < 0,05$) dessa população no grupo CO em relação ao grupo CS. A análise de correlação entre percentual de linfócitos e estado clínico revelou correlação negativa entre o aumento de linfócitos versus evolução clínica na LVC ($r = -0,6283/p < 0,0001$). Foi observada diminuição no percentual de eosinófilos no grupo CS em comparação ao grupo CNI ($p < 0,05$), além de correlação negativa dessa população celular ($r = -0,4760/p = 0,0059$) com a evolução clínica. Adicionalmente, foi observada diminuição ($p < 0,05$) do percentual de basófilos nos grupos CO e CS quando comparado ao grupo CNI. De forma semelhante, foi observada correlação negativa no percentual de basófilo ($r = 0,6018/0,0002$) em relação a forma clínica da LVC. Em relação à população de macrófagos, foi observado aumento significativo ($p < 0,05$) nos grupos CO e CS em relação ao grupo CNI, bem como correlação positiva ($r = 0,5553/p < 0,0001$) entre percentual de macrófagos e grau clínico da doença. Não foi encontrada diferença significativa no percentual de neutrófilos entre diferentes formas clínicas da LVC.

A Figura 14 apresenta as fotomicroscopias dos principais achados histopatológicos da pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da infecção. Nas pranchas A-B observa-se em objetiva de 10x o aspecto normal da pele com ausência de infiltrado inflamatório e de alterações histológicas na pele de orelha de um cão do grupo CNI. Em relação às pranchas C-D, que representam CA, e E-F, que representam CO, observa-se discreto infiltrado inflamatório composto principalmente por células mononucleares, evidenciado em objetiva de 40x. Nas pranchas G-H, que representam cortes de pele de orelha de um cão do grupo CS, é observado intenso infiltrado celular em objetiva de 40x, composto principalmente por células mononucleares.

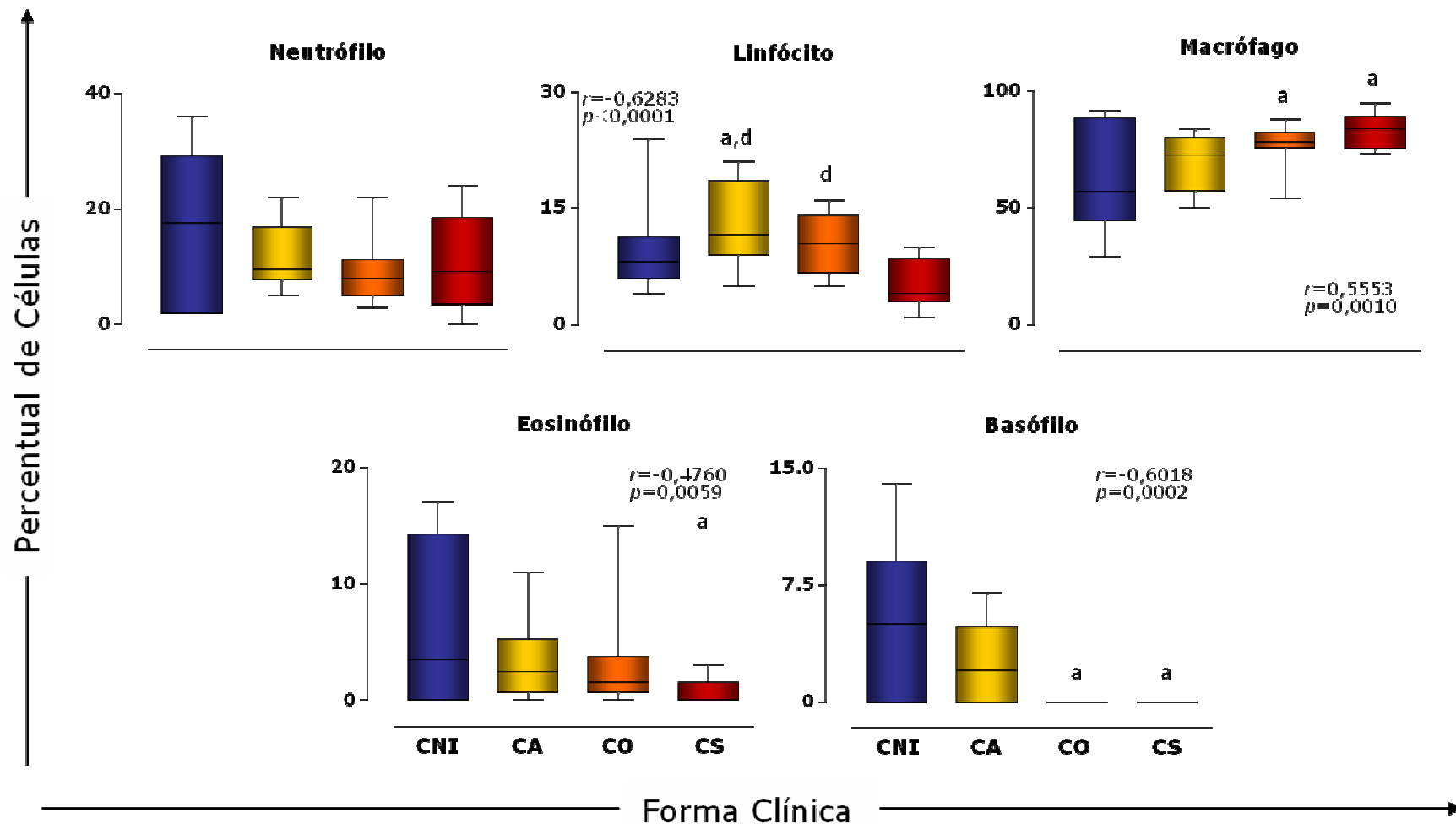


Figura 13: Avaliação da celularidade na pele de cães não infectados e cães naturalmente infectados por *L. chagasi* portadores de diferentes formas clínicas. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimos, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. Cães não infectados=CNI (■, $n=16$); cães assintomáticos=CA (■, $n=10$); cães oligossintomáticos=CO (■, $n=10$); cães sintomáticos=CS (■, $n=15$). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras *a* e *d* correspondentes aos grupos CNI e CS, respectivamente. As análises de correlação foram estabelecidas utilizando apenas os grupos com animais infectados (CA, CO e CS) e os valores de coeficiente linear (*r*) e p-value (*p*) estão sendo demonstrados apenas nos gráficos onde foi encontrada correlação significativa.

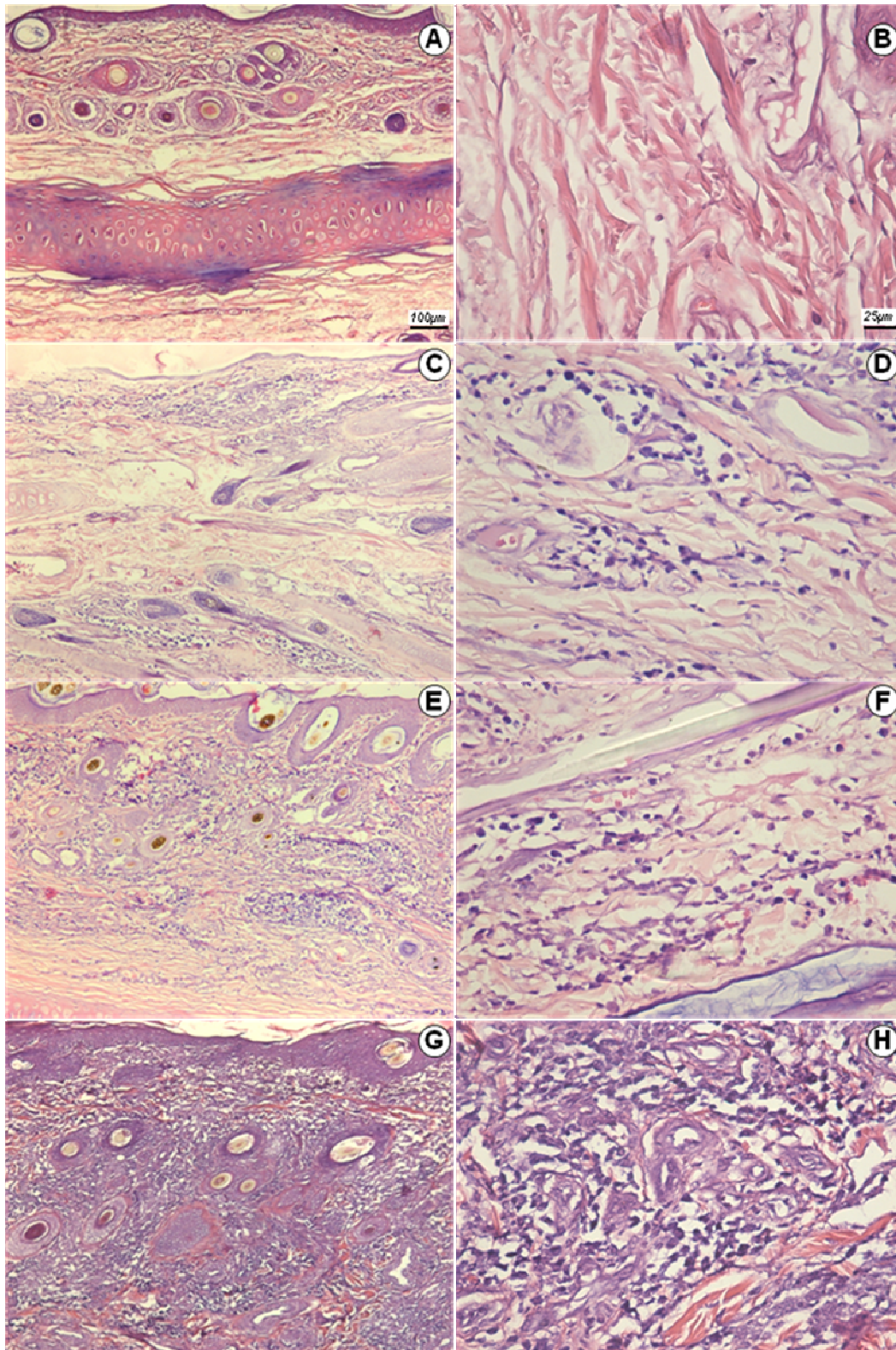


Figura 14: Fotomicrografias coradas por HE do infiltrado celular da pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. Está demonstrado o infiltrado celular dos seguintes grupos: CNI (A, B); CA e BP (C e D); CO e MP (E e F) e CS e AP (G e H). Estão sendo ilustradas fotomicroscopias com aumento de 10x (barra: 100 μm), 40x (barra: 25 μm).

5.3 Capítulo III: Influência da densidade parasitária cutânea sobre parâmetros imunológicos e histopatológicos deste tecido em cães naturalmente infectados por Leishmania chagasi

5.3.1 Avaliação da expressão de citocinas Tipo I, II e imunoreguladoras em cães naturalmente infectados por *L. chagasi* e cães não infectados e sua correlação com a densidade parasitária cutânea

Foi realizado um estudo detalhado do perfil de citocinas do Tipo I (IFN- γ , IL-12p40 e TNF- α), Tipo II (IL-4, IL-5 e IL-13) e imunoreguladoras (IL-10 e TGF- β 1) em cães portadores de LV. Os dados estão apresentados de forma comparativa entre cães apresentando diferentes graus de parasitismo cutâneo e o grupo controle na Figura 15.

Os dados revelaram elevada expressão de IL-10 no grupo com alto parasitismo (AP) em relação aos grupos com baixo (BP) e médio parasitismo (MP) ($p < 0,05$), acompanhado por correlação positiva ($r = 0,4240/p = 0,0245$) entre a expressão de IL-10 e a densidade parasitária na pele. Interessantemente, a expressão de TGF- β 1 foi significativamente aumentada no grupo AP ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo CNI, entretanto, não foi observada correlação significativa ($r = 0,0979/p = 0,5937$) entre densidade parasitária cutânea e a expressão dessa citocina. Em adição, correlação positiva ($r = 0,4940/p = 0,0004$) foi observada entre a expressão de IL-10 e a expressão de TGF- β 1 (dados não mostrados).

A análise da expressão de IL-12 indicou um aumento ($p < 0,05$) da expressão dessa citocina nos grupos BP e MP em comparação ao grupo AP. Além disso, foi observada significante correlação negativa ($r = -0,5928/p = 0,0002$) entre a expressão de IL-12 e a densidade parasitária cutânea, e correlação negativa entre os níveis de IL-12 com as citocinas imunoreguladoras IL-10 e TGF- β 1 ($r = -0,5777/p = 0,0005$ e $r = -0,5013/p = 0,0030$, respectivamente).

A presença do parasito foi associada com o aumento ($p < 0,05$) das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α em todos os grupos infectados quando comparados com o grupo controle, entretanto nenhuma correlação pode ser estabelecida entre a expressão dessas citocinas e a densidade parasitária cutânea.

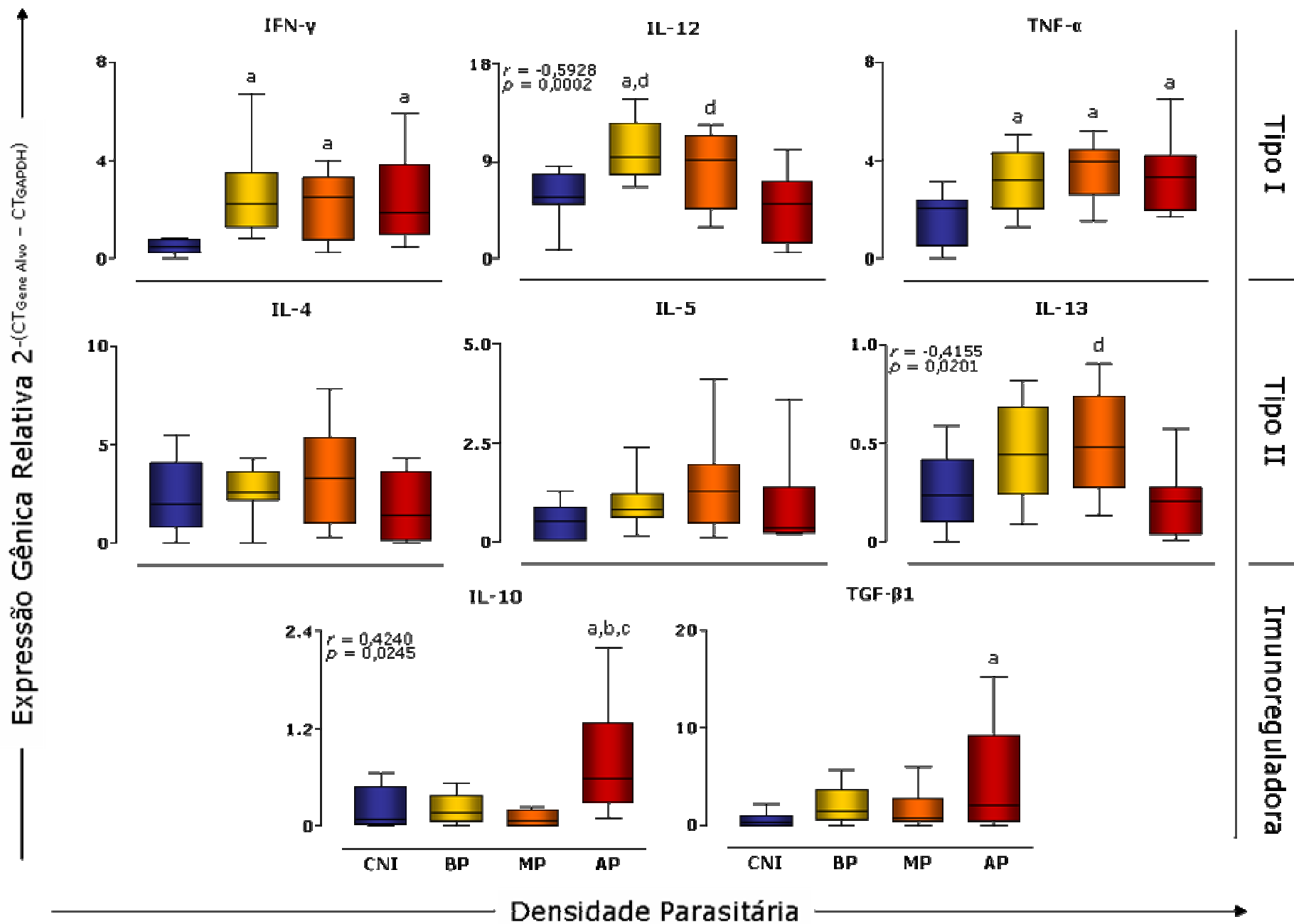


Figura 15: Análise da expressão de RNAm de citocinas do Tipo I, II e imunoreguladoras na pele de cães não infectados e cães naturalmente infectados por *L. chagasi* portadores de diferentes densidades parasitárias na pele. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimos, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. Cães não infectados=CNI (■, n=16); cães c/ baixo parasitismo=BP (■, n=12); cães c/ médio parasitismo=MP (■, n=11); cães c/ alto parasitismo=AP (■, n=12). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a, b, c e d correspondente aos grupos CNI, BP, MP e AP, respectivamente. As análises de correlação foram estabelecidas considerando todos os dados de animais infectados (BP, MP e AP) e os valores de coeficiente linear (r) e p-value (p) estão sendo demonstrados apenas nos gráficos onde foi encontrada correlação significativa.

5.3.2 Avaliação da razão de citocinas de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* e cães não infectados e sua associação com a densidade parasitária cutânea

A avaliação da razão de citocinas IFN- γ /IL-4, IFN- γ /IL-10, IFN- γ /TGF- β 1 e IL-12/IL-10 foi realizada na pele de cães portadores de LV e os resultados encontram-se apresentados de forma comparativa entre cães apresentando diferentes graus de parasitismo cutâneo e o grupo controle (Tabela V).

A análise dos dados revelou aumento ($p < 0,05$) da razão IFN- γ /IL-4 no grupo BP quando comparado ao grupo AP. Em relação a razão IFN- γ /IL-10, foi observado aumento ($p < 0,05$) no grupo BP e MP em relação aos grupos CNI e AP.

Em relação à razão IL-12/IL-10 e IFN- γ /TGF- β 1, não foram observadas diferenças entre os grupos avaliados nesse estudo de acordo com a densidade parasitária cutânea, entretanto, a razão IL-12/IL-10 apresentou-se aumentada nos grupos BP e MP ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo AP.

Tabela V: Análise da razão de citocinas de acordo com densidade parasitária cutânea

Razão	CNI	Densidade Parasitária Tecidual		
		BP	MP	AP
IFN- γ /IL-4	0,32 \pm 0,15	0,70 \pm 0,36	69,95 \pm 85,06 ^d	0,47 \pm 0,21
IFN- γ /IL-10	9,68 \pm 18,69	1845 \pm 6138 ^{a,d}	1780 \pm 4169 ^{a,d}	40,58 \pm 128,2
IFN- γ /TGF- β 1	16,53 \pm 35,39	11,33 \pm 19,83	5,57 \pm 8,78	2,09 \pm 2,80
IL-12/IL-10	178,3 \pm 447,6	69,95 \pm 85,06 ^d	90,80 \pm 97,24 ^d	16,13 \pm 31,06

As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras *a* e *d* correspondentes aos grupos CNI e AP, respectivamente.

5.3.3 Avaliação da expressão dos fatores de transcrição T-bet, GATA-3 e FOXP3 na pele de cães naturalmente infectados por L. chagasi e cães não infectados e sua associação com a densidade parasitária cutânea

A expressão dos fatores de transcrição T-bet, GATA-3 e FOXP3 foi investigada na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* e cães não infectados e sua correlação com densidade parasitária cutânea. Os resultados estão apresentados comparativamente entre todos os grupos de cães infectados e o grupo controle (Figura 16).

Os resultados mostraram aumento ($p < 0,05$) na expressão de T-bet em todos os grupos infectados em comparação ao grupo controle, porém não foi observado correlação entre expressão de T-bet e densidade parasitária na pele. Nossos dados também não revelaram diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão de GATA-3 e FOXP3 entre os grupos experimentais, bem como nenhuma correlação significativa da expressão desses fatores de transcrição com densidade parasitária cutânea.

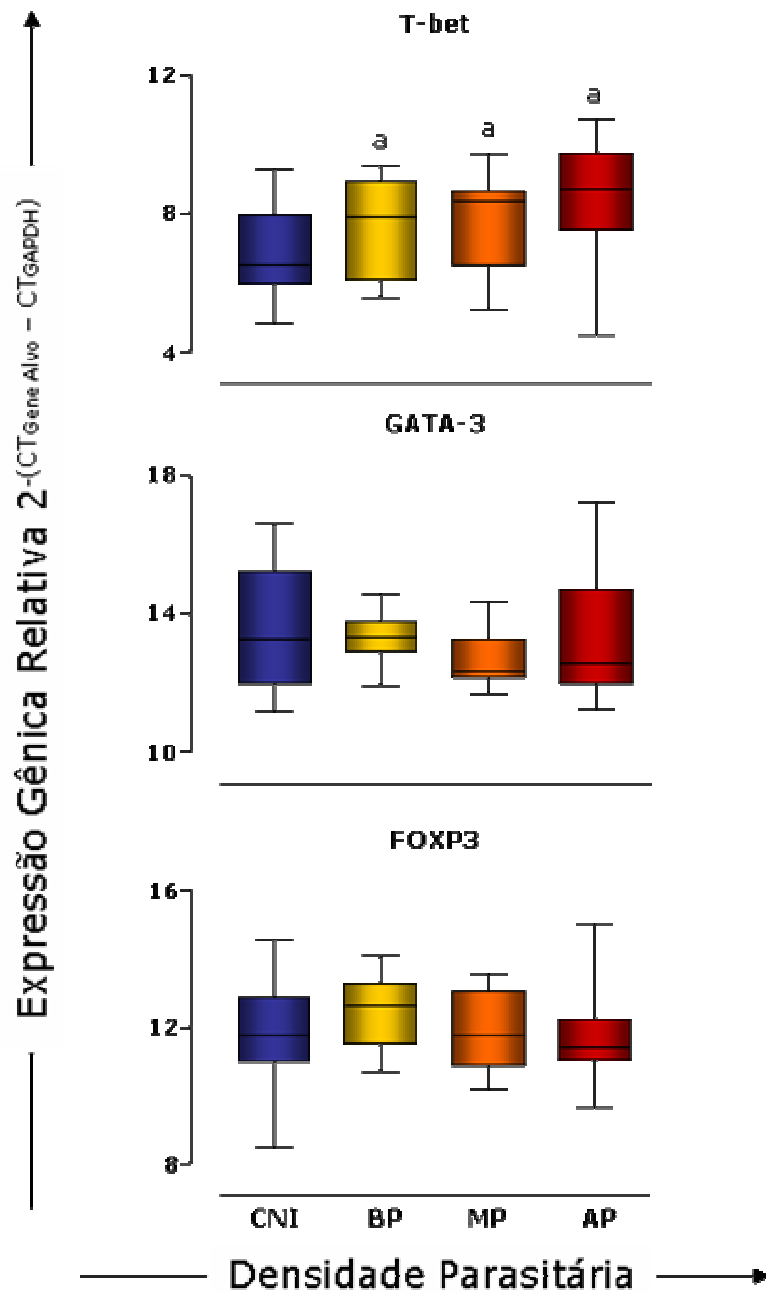


Figura 16: Avaliação da celularidade na pele de cães não infectados e cães naturalmente infectados por *L. chagasi* portadores de diferentes densidades parasitárias na pele. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimos, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. Cães não infectados=CNI (■, n=16); cães c/ baixo parasitismo=BP (■, n=12); cães c/ médio parasitismo=MP (■, n=11); cães c/ alto parasitismo=AP (■, n=12). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pela letra *a* correspondente ao grupo CNI.

5.3.4 Avaliação da expressão de quimiocinas na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* e cães não infectados e sua associação com a densidade parasitária cutânea

A expressão de quimiocinas (CCL2, CCL4, CCL5, CCL13, CCL17, CCL21, CCL24 e CXCL8) na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, foi investigada categorizando os cães por densidade parasitária cutânea. Os resultados relacionados à avaliação da expressão dessas quimiocinas, bem como, a associação dessas com densidade parasitária cutânea estão apresentados comparativamente entre todos os grupos de cães infectados e o grupo controle (Figura 17).

Na avaliação da expressão das quimiocinas CCL2 e CCL4, foi observado aumento ($p < 0,05$) nos níveis de RNAm desses mediadores no grupo AP em relação aos demais grupos experimentais. Além disso, as análises de correlação detectaram que maior expressão dessas quimiocinas está associada ao aumento na carga parasitária na pele desses animais ($r = 0,5329/p = 0,0010$ e $r = 0,5774/p = 0,0003$, respectivamente). Em relação às quimiocinas CCL5, CCL21 e CXCL8, foi observado aumento significativo ($p < 0,05$) no grupo AP em relação ao grupo CNI. Entretanto, apenas as quimiocinas CCL5 e CCL21 apresentaram correlação positiva da expressão com a densidade parasitária cutânea ($r = 0,3724/p = 0,0276$ e $r = 0,4271/p = 0,0105$, respectivamente). A expressão de CCL24 apresentou-se aumentada ($p < 0,05$) no grupo MP em relação ao grupo CNI e uma correlação negativa foi observada entre a expressão dessa quimiocina e a densidade parasitária cutânea ($r = -0,3426/p = 0,0474$). Para as quimiocinas CCL13 e CCL17, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais.

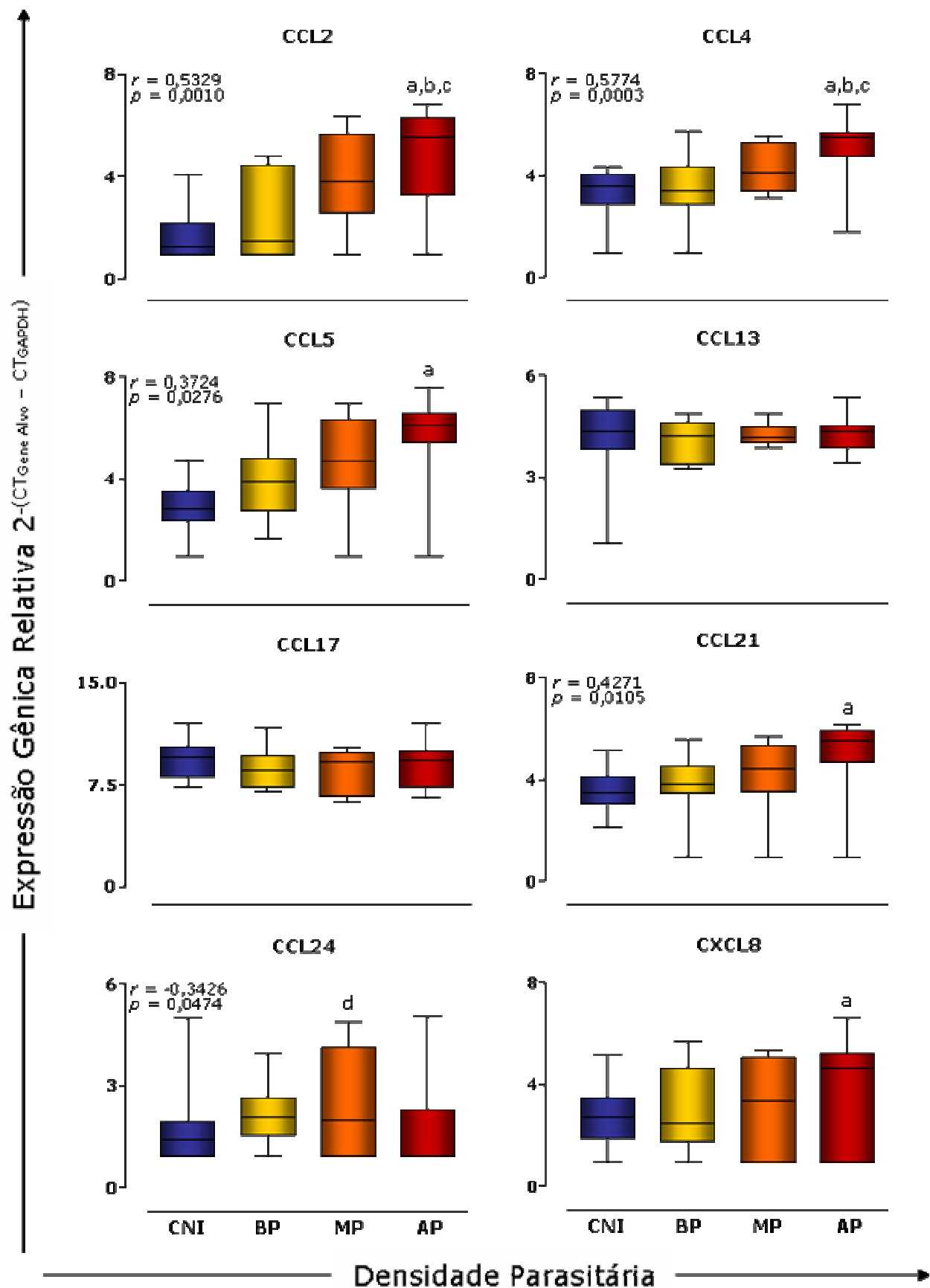


Figura 17: Avaliação da expressão de RNAm de quimiocinas na pele de cães não infectados e cães naturalmente infectados por *L. chagasi* portadores de diferentes densidades parasitárias na pele. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimos, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. Cães não infectados=CNI (■, $n=16$); cães c/ baixo parasitismo=BP (■, $n=12$); cães c/ médio parasitismo=MP (■, $n=11$); cães c/ alto parasitismo=AP (■, $n=12$). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representada pela letra *a*, *b*, *c* e *d* correspondente ao grupo CNI, BP, MP e AP respectivamente. As análises de correlação foram estabelecidas utilizando apenas os grupos com animais infectados (BP, MP e AP) e os valores de coeficiente linear (*r*) e p-value (*p*) estão sendo demonstrados apenas nos gráficos onde foi encontrada correlação significativa.

5.3.5 Avaliação do perfil celular inflamatório na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* e cães não infectados e sua correlação com a densidade parasitária cutânea

A avaliação da celularidade tecidual na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* e cães não infectados, foi realizada categorizando os animais por densidade parasitária na pele. Os resultados relacionados à avaliação da celularidade cutânea e sua correlação com a densidade parasitária cutânea, estão apresentados comparativamente entre todos os grupos de cães infectados e o grupo controle (Figura 18). Embora não tenha sido identificado alterações significativas nas populações celulares de neutrófilos e linfócitos, foi observado alterações no perfil de células da resposta imune inata. Nesse sentido, foi constatado aumento significativo ($p < 0,05$) do percentual de macrófagos nos grupos MP e AP quando comparado aos grupos CNI. Além disso, foi observada uma correlação positiva entre o percentual de macrófagos e a densidade parasitária cutânea ($r = 0,4163/p = 0,0198$). Em relação ao percentual de eosinófilos, foi observada diminuição ($p < 0,05$) dessa população no grupo MP e AP em relação ao grupo CNI. Associado a essas observações, foi encontrada correlação negativa entre percentual de eosinófilos e a densidade parasitária cutânea ($r = -0,3885/p = 0,0255$). Na avaliação do percentual de basófilos, foi observada diminuição do percentual no grupo BP, MP e AP em comparação ao grupo CNI ($p < 0,05$), porém não foi observada correlação significativa com densidade parasitária cutânea.

A Figura 14 ilustra as fotomicroscopias dos principais achados histopatológicos da pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, categorizados por densidade parasitária, onde foram utilizadas as mesmas fotomicroscopias mostradas em relação ao estado clínico, pois foi demonstrado que a categorização pelos diferentes grupos clínicos e por densidade parasitária apresenta correlação positiva. Nas pranchas A-B observa-se em objetiva de 10x o aspecto normal da pele com ausência de infiltrado inflamatório e de alterações histológicas na pele de orelha de um cão do grupo CNI. Em relação às pranchas C-D, que representam BP, e E-F, que representam MP, observa-se discreto infiltrado inflamatório composto principalmente por células mononucleares, evidenciado em objetiva de 40x. Nas pranchas G-H, que representam cortes de pele de orelha de um cão do grupo AP, é observado intenso infiltrado celular em objetiva de 40x, composto principalmente por células mononucleares.

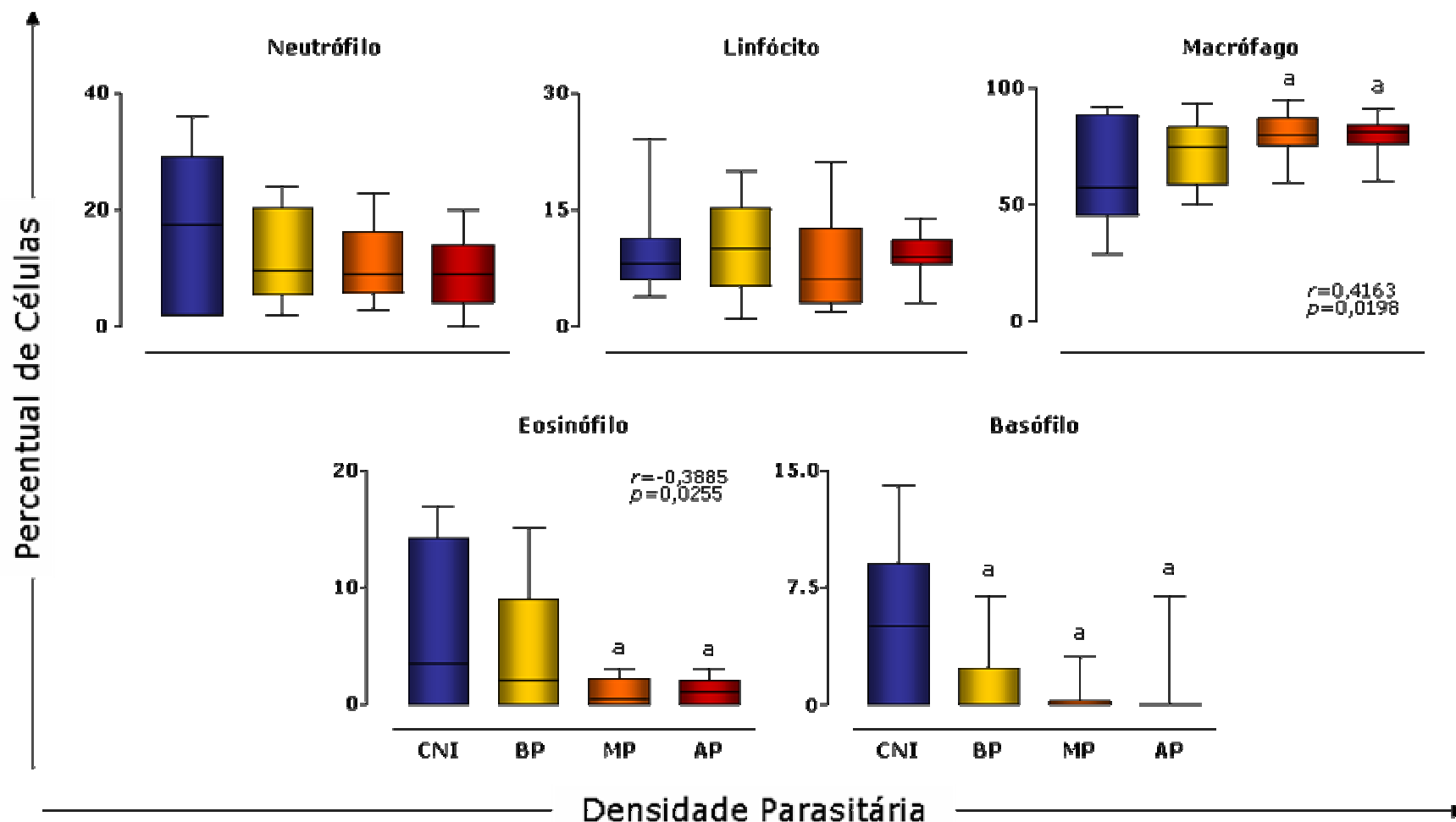


Figura 18: Avaliação da celularidade na pele de cães não infectados e cães naturalmente infectados por *L. chagasi* portadores de diferentes densidades parasitárias na pele. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimos, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. Cães não infectados=CNI (■, $n=16$); cães c/ baixo parasitismo=BP (■, $n=12$); cães c/ médio parasitismo=MP (■, $n=11$); cães c/ alto parasitismo=AP (■, $n=12$). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pela letra *a* correspondente ao grupo CNI. As análises de correlação foram estabelecidas utilizando apenas os grupos com animais infectados (BP, MP e AP) e os valores de coeficiente linear (*r*) e *p*-value (*p*) estão sendo demonstrados apenas nos gráficos onde foi encontrada correlação significativa.

5.4 Capítulo IV: Correlação entre a expressão de citocinas do Tipo I com citocinas do Tipo II e com citocinas imunoreguladoras em cães naturalmente infectados por L. chagasi

5.4.1 Análise de correlação entre a expressão de citocinas Tipo I com citocinas do Tipo II e com citocinas imunoreguladoras em cães naturalmente infectados por *L. chagasi*

Uma análise de correlação detalhada entre a expressão de citocinas do Tipo I e do Tipo II, bem como, entre citocinas do Tipo I e imunoreguladoras, foi realizada com o intuito de investigar se há padrão misto de resposta na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, independente do estado clínico e densidade parasitária cutânea apresentado por esses animais. Essas observações são fundamentais para investigar a rede de interação entre as citocinas, que diferem muito entre animais de diferentes espécies, podendo ajudar a direcionar novos estudos e a compreender melhor a dinâmica de apresentação de diferentes perfis de citocinas na LVC. Para isso, foi realizada análise de correlação utilizando apenas os valores de expressão de citocinas obtidos a partir dos animais naturalmente infectados por *L. chagasi* (total de 35 animais). Os resultados estão representados na Figura 19, onde foram demonstrados apenas os gráficos de correlação entre citocinas que apresentaram significância.

Os resultados revelaram que a citocina IL-12 foi positivamente correlacionada com a expressão das citocinas IL-4 e IL-13 ($r=0,6643/p<0,0001$ e $r=0,5656/p=0,0011$, respectivamente). Interessantemente, foi encontrada correlação negativa entre a expressão de IL-12, uma citocina fundamental para ativação da resposta do Tipo I, com a expressão das citocinas imunoreguladoras IL-10 e TGF- β 1, que estão associadas a inibição da ativação da resposta do Tipo I ($r=-0,5777/p=0,0005$ e $r=-0,5013/p=0,0030$, respectivamente). Adicionalmente, TNF- α foi positivamente correlacionada com a expressão das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 ($r=0,5243/p=0,0012$, $r=0,5227/p=0,0021$ e $r=0,3664/p=0,0464$, respectivamente). Em relação à citocina IFN- γ , foi encontrada correlação positiva com as citocinas IL-5 e IL-13 ($r=0,3646/p=0,0476$ e $r=0,3691/p=0,0447$, respectivamente).

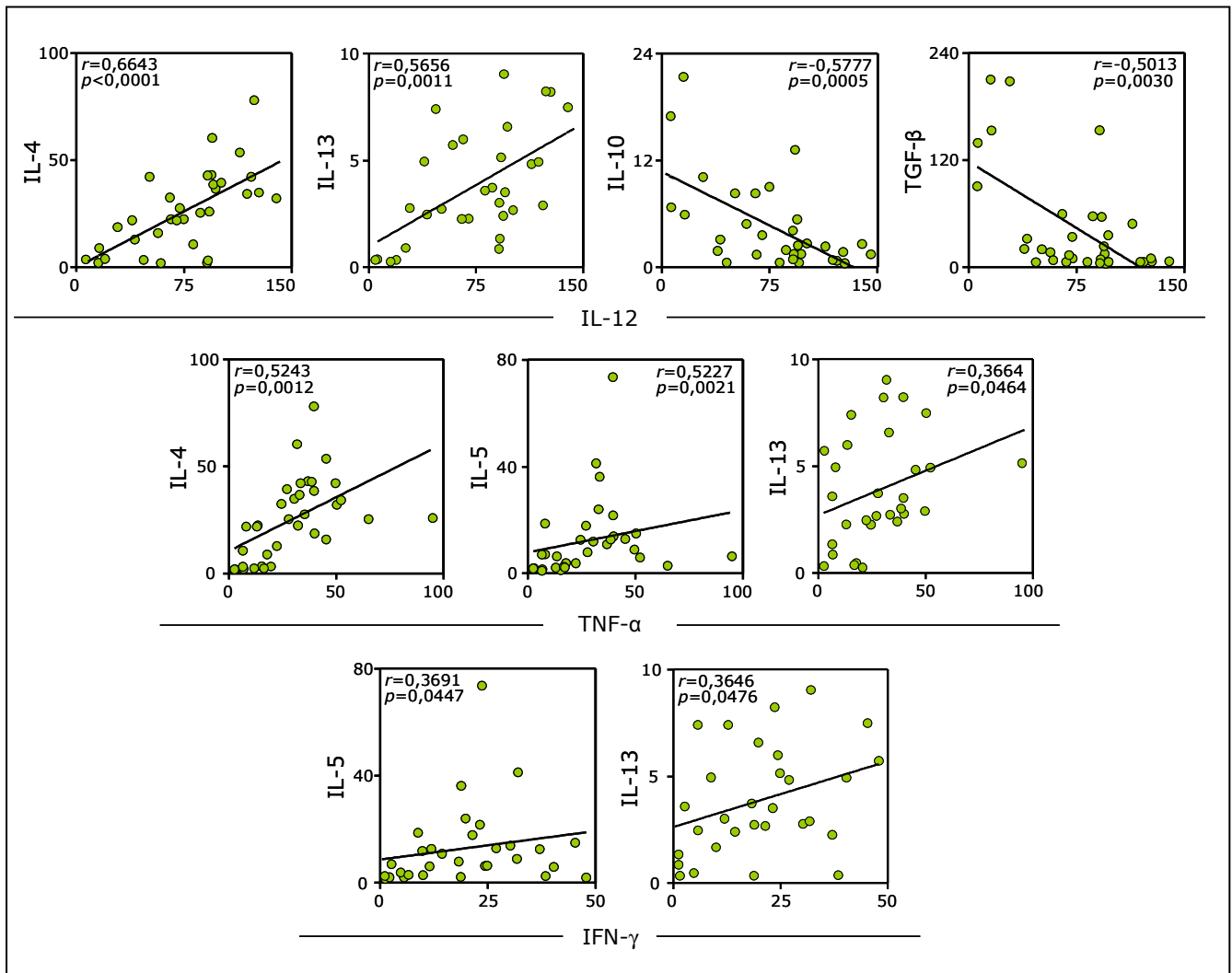


Figura 19: Análise da correlação da expressão de citocinas mistas na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. Os símbolos representam os valores pontuais dos cães com LVC. As análises de correlação foram estabelecidas utilizando apenas os grupos com animais infectados por *L. chagasi* e os valores do coeficiente linear (r) e p-value (p) estão demonstrados na parte superior dos gráficos. As linhas apresentadas sobre os gráficos ilustram as tendências das diferentes correlações.

*5.5 Capítulo V: Correlação entre a expressão de quimiocinas
e a celularidade tecidual em cães naturalmente infectados por
Leishmania chagasi*

5.5.1 Análise da correlação entre a expressão de quimiocinas e a celularidade tecidual em cães naturalmente infectados por *L. chagasi*

No intuito de investigar a relação entre os níveis de expressão de RNAm de quimiocinas e o perfil celular encontrado no infiltrado inflamatório dérmico em cães portadores da LVC, foram estabelecidas análises de correlação entre os níveis de RNAm e percentual das populações celulares neutrófilos, linfócitos, macrófagos, eosinófilos e basófilos. Os resultados estão representados pela Tabela VI, onde foram demonstradas apenas as correlações que apresentaram significância estatística.

De forma interessante, a população de macrófagos foi a mais frequentemente correlacionada a diferentes quimiocinas. Nesse sentido, os dados revelaram correlação positiva entre a expressão de CCL2 e a população de macrófagos ($r=0,4159/p=0,0179$). Correlação positiva também foi encontrada entre as quimiocinas CCL4 e CCL5 e a população celular de macrófagos ($r=0,4760/p=0,0059$ e $r=0,4126/p=0,0189$, respectivamente). Em relação à quimiocina CCL24, foi encontrada correlação negativa entre a sua expressão e o percentual de linfócitos ($r= -0,5334/p=0,0017$)

Tabela VI: Análise de correlação entre a expressão de quimiocinas e a celularidade tecidual na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. As análises de correlação foram estabelecidas considerando todos os dados de animais infectados por *L. chagasi* e os valores de coeficiente linear (r) e p-value (p) estão demonstrados na tabela.

Célula	Quimiocina	Coefficiente Linear (r)	p-value (p)
Macrófago	CCL2	0,4159	0,0179
	CCL4	0,4760	0,0059
	CCL5	0,4126	0,0189
Linfócito	CCL24	-0,5334	0,0017

5.6 Resumo dos resultados

Após a apresentação do conjunto de resultados obtidos no presente estudo decorrentes da avaliação de parâmetros imunopatológicos (citocinas, quimiocinas, fatores de transcrição e celularidade do infiltrado inflamatório na derme) de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, e a associação desses com progressão clínica e densidade parasitária cutânea, é possível apresentar as seguintes evidências:

- A evolução clínica da LVC se correlaciona positivamente com o aumento da carga parasitária no compartimento dérmico;
- Cães com a forma clínica **assintomática** apresentaram **aumento** nos níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-5, IL-13, da razão IFN- γ /IL-4, do percentual de linfócitos associado a um discreto infiltrado inflamatório;
- Cães com a forma clínica **oligossintomático** apresentaram **aumento** nos níveis de IFN- γ , IL-10, TGF- β 1, T-bet, da razão IFN- γ /IL-4, do percentual de macrófagos e linfócitos, assim como, **diminuição** dos níveis de IL-13 e do percentual de basófilos associado a um moderado infiltrado inflamatório;
- Cães com a forma clínica **sintomática**, apresentaram **diminuição** dos níveis de TNF- α , IL-13, GATA-3, FOXP3, do percentual de linfócitos, eosinófilos e basófilos e **aumento** nos níveis de CCL2, CCL4, CCL5 bem como do percentual de macrófagos associado a um intenso infiltrado inflamatório;
- Cães com **baixo parasitismo** cutâneo apresentaram **aumento** nos níveis de IFN- γ , IL-12, TNF- α , T-bet, da razão IFN- γ /IL-10, IL-12/IL-10, associado a **diminuição** nos níveis de IL-10 e a um **discreto** infiltrado inflamatório;
- Cães com **médio parasitismo** cutâneo apresentaram **aumento** nos níveis de IFN- γ , IL-12, TNF- α , IL-13, T-bet, CCL24, da razão IFN- γ /IL-4, IFN- γ /IL-10, IL-12/IL-10, e do percentual de macrófagos, assim como uma **diminuição** nos níveis de IL-10 e do percentual de eosinófilos e basófilos associado a um **moderado** infiltrado inflamatório;
- Cães com **alto parasitismo** cutâneo apresentaram **aumento** nos níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-10, TGF- β 1, T-bet, CCL2, CCL4, CCL5, CCL21, CXCL8 e do percentual de macrófagos, assim como, **diminuição** nos níveis de IL-12, IL-13

e do percentual de eosinófilos e basófilos associados a **intenso** infiltrado inflamatório;

- A expressão de IL-12 apresentou-se correlacionada **positivamente** com a expressão de IL-4 e IL-13 e **negativamente** com a expressão de IL-10 e TGF- β 1 na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*;
- A expressão de TNF- α apresentou-se correlacionada **positivamente** com a expressão de IL-4, IL-5 e IL-13 na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*;
- A expressão de IFN- γ apresentou-se correlacionada **positivamente** com a expressão de IL-4 e IL-13 na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*;
- A expressão de CCL2, CCL4 e CCL5 apresentou-se correlacionada **positivamente** com o percentual de macrófagos na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*;
- A expressão de CCL24 apresentou-se correlacionada **negativamente** com os níveis de linfócitos na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*;

5.6.1 Diagrama dos principais resultados encontrados nesse estudo

O conjunto de evidências observadas nesse estudo encontra-se sumarizado no diagrama da Figura 20.

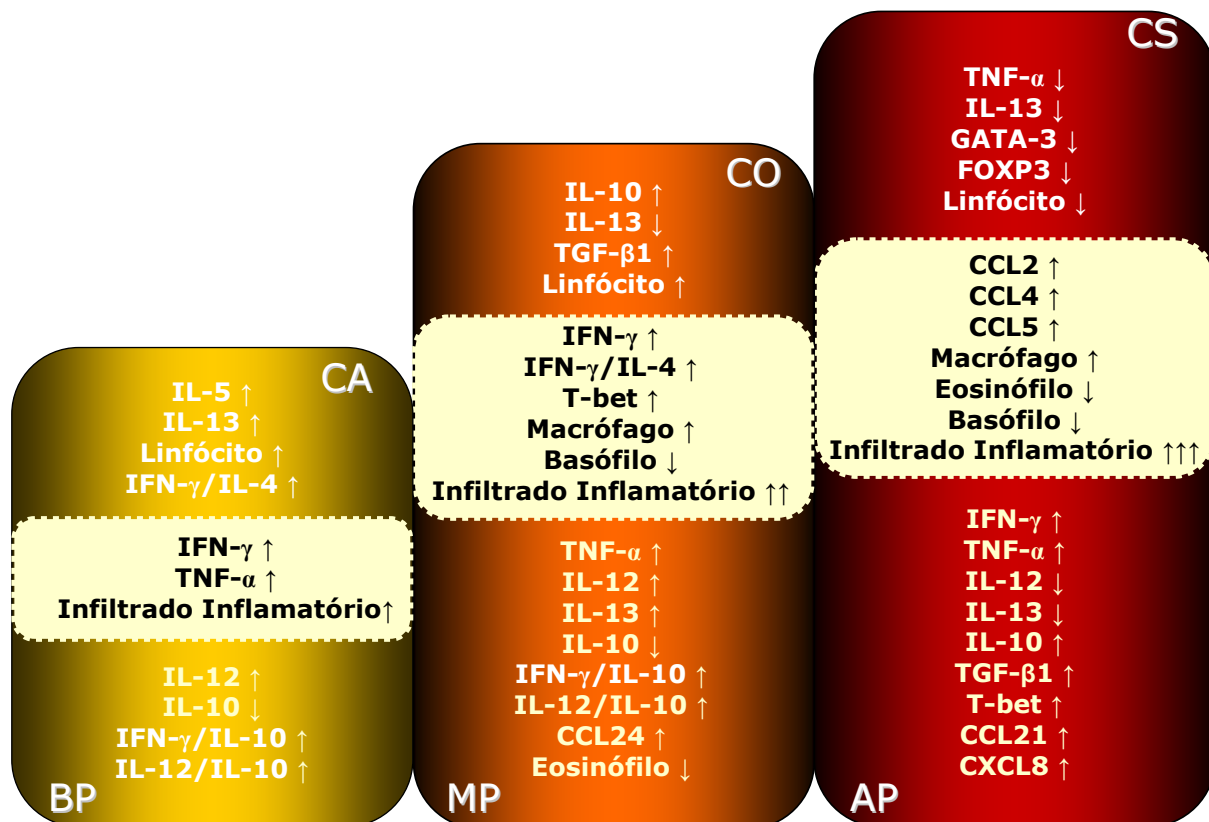


Figura 20: Diagrama ilustrativo das principais alterações encontradas na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, de acordo com estado clínico e densidade parasitária cutânea. As alterações em destaque no quadro branco mostram as alterações encontradas em comum aos grupos CA, CO e CS com os grupos BP, MP e AP, respectivamente. As setas apontadas para baixo representam diminuição dos parâmetros, enquanto as setas apontadas para cima representam aumento dos parâmetros avaliados na pele dos cães infectados por *L. chagasi*.

6 Discussão

Diante do versátil e robusto sistema de vigilância imune apresentado pelo compartimento cutâneo, esse tecido linfóide desempenha um importante papel na manutenção de muitos mecanismos de defesa frente a diversos tipos de patógenos. Entretanto, a regulação dos mecanismos de defesa da pele, também é crucial, sendo que, uma inadequada ou mal direcionada resposta imune pode implicar na patogênese de uma grande variedade de acometimentos cutâneos, seja de origem infecciosa ou auto-imune (Kupper & Fuhlbrigge et al. 2004). Nesse contexto, a resposta imune cutânea conta com uma grande variedade de células de defesa, as quais incluem os linfócitos T intra-epiteliais e as células de Langerhans, que apresentam uma considerável capacidade de capturar antígenos e de estabelecer/manter uma resposta imune local (Kupper & Fuhlbrigge et al. 2004).

De forma intrigante, o aspecto histopatológico e imunopatológico da pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, pode variar de um infiltrado inflamatório focal até mesmo difuso com variável número de plasmócitos, macrófago (parasitados ou não com amastigotas), linfócitos e neutrófilos isolados (Santos et al. 2004, Solano-Galego et al. 2004, Giunchetti et al. 2006). Esse aspecto reflete o grande desafio que permeia o estudo da LVC e da identificação de biomarcadores da resposta imune que podem estar associados à resistência/suscetibilidade à infecção pelo parasito, fato que implicará em maior ou menor capacidade reservatória tecidual de formas amastigotas para o inseto vetor. Nesse sentido, o grande número de casos de LVC e o intenso parasitismo cutâneo observado muitas vezes inclusive em cães assintomáticos, são condições fundamentais que reforçam o papel dos cães como principal fonte de infecção para o vetor flebotomíneo, e conseqüentemente, para o homem (Abranches et al. 1991, Moreno & Alvar 2002). Portanto, o entendimento dos mecanismos responsáveis pela indução e manutenção de resposta imune inata e adaptativa efetiva no compartimento cutâneo, conduz a importantes implicações na compreensão da história natural da LVC.

Assim, considerando a importância do compartimento cutâneo na infecção por *Leishmania*, que consiste na primeira interface de interação entre o parasito/hospedeiro, o presente trabalho se propôs a avaliar aspectos imunopatológicos da pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. Nesse sentido, avaliou-se a relação entre a densidade parasitária na pele e as manifestações clínicas em cães portadores de LVC. Além disso, esse trabalho dedicou-se a investigar as alterações histológicas, as quais incluem o estudo do perfil celular na pele, diante da importância desses achados como indicadores do processo inflamatório local, que implica diretamente no perfil de citocinas e quimiocinas presentes nesse

microambiente (Stewart et al. 1984). Adicionalmente, utilizou-se estratégias de análises estatísticas buscando associações e correlações entre os achados observados nesse órgão com a intensidade de parasitismo dérmico e a evolução clínica na LVC, representada pelas diferentes formas clínicas (assintomática, oligossintomática e sintomática). Nesse sentido, no intuito de compreender os fatores envolvidos no estabelecimento e manutenção de uma resposta imune protetora no tecido cutâneo, foi empregada a técnica de PCR em tempo real para avaliar os níveis de transcritos de vários genes mediadores do sistema imunológico como, citocinas do Tipo I (IFN- γ , IL-12p40 e TNF- α), Tipo II (IL-4, IL-5 e IL-13) e imunoreguladoras (IL-10 e TGF- β 1), além dos fatores de transcrição T-bet, GATA-3 e FOXP3 e das quimiocinas CCL2 (MCP-1), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES), CCL13 (MCP-4), CCL17 (TARC), CCL21 (SLC), CXCL8 (IL-8) e CCL24 (Eotaxina-2). Da mesma forma, foram estabelecidas correlações entre os níveis de RNAm dos genes avaliados com estado clínico da LVC, intensidade de parasitismo e celularidade tecidual cutânea.

Após o exame sorológico, os cães foram clinicamente classificados de acordo com Mancianti et al. (1988) como, assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos, conforme descrito na Tabela I, no item materiais e métodos. Essa classificação tem sido recentemente utilizada por diversos autores que estudaram os fatores relacionados à evolução clínica e manutenção de lesões cutâneas e viscerais na LVC, bem como, para o entendimento dos mecanismos imunológicos relacionados ao controle do parasitismo (Giunchetti et al. 2006, Reis et al. 2006a,b,c, Lage et al. 2007, Carrilo et al. 2008, Giunchetti et al. 2008a,b, Guerra et al. 2009, Reis et al. 2009). Nesse sentido, foi observado que cães naturalmente infectados por *L. chagasi* apresentam evolução gradual da infecção a partir de uma forma assintomática, caracterizada pela ausência de sinais sugestivos da doença, passando por uma forma intermediária oligossintomática, no entanto, ativa da doença, caracterizada pela manifestação de alguns sinais clínicos. Essa forma clínica pode evoluir para uma forma clássica da LVC (sintomática) caracterizada pelo aparecimento de maior número e intensidade de sinais clínicos, bem como, por um descontrole imunológico que induz a um intenso parasitismo que possivelmente levam os animais a morte, como descrito por Reis (2001).

Considerando a importância do perfil de citocinas em eventos relacionados à resistência ou susceptibilidade a infecção por *Leishmania*, diversos estudos têm empregado essa abordagem para analisar a evolução clínica da LVC no âmbito da infecção natural ou experimental por *L. chagasi/infatum* (Pinelli et al. 1999, Quinnell et al. 2001, Santos-Gomes et al. 2002, Dos-Santos et al. 2004, Chamizo et al. 2005, Strauss-Ayali et al. 2005, Manna et

al. 2006, Corrêa et al. 2007, Lage et al. 2007, Lima et al. 2007, Rodrigues et al. 2007, Strauss-Ayali et al. 2007, Sanchez-Robert et al. 2008, Alves et al. 2009, Rodrigues et al. 2009). Entretanto, até o momento, os trabalhos que se dedicaram a estudar o perfil de citocinas durante a LVC, avaliaram distintos modelos de infecção (natural ou experimental), bem como, diferentes compartimentos teciduais (baço, medula óssea, linfonodos e sangue periférico). Dessa forma, a comparação entre os dados obtidos no presente estudo com os demais dados da literatura, foi realizada tomando o devido cuidado em considerar as peculiaridades das respostas imunes *in situ* contra parasitos da espécie *L. chagasi* que ocorrem em distintos órgãos alvos de cães infectados, como previamente descrito por Sanchez et al. (2004).

Até o presente momento, está descrito na literatura apenas um trabalho que buscou avaliar citocinas na pele de cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp (Brachelente et al. 2005), o que de forma interessante permite traçar um certo paralelo com os nossos dados. Diante do exposto e considerando a estratégia que empregamos para avaliar os dados apresentados aqui, os quais correlacionam os resultados da expressão dos mediadores avaliados com forma clínica e carga parasitária, o presente trabalho marca de forma inédita uma conquista no conhecimento da resposta imune na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*.

Nesse sentido, no estudo realizado por Santos-Gomes et al. (2002), foi demonstrado que durante um extensivo período após a infecção experimental por *L. infantum*, observa-se baixa expressão de citocinas IL-12, IFN- γ , IL-2 e IL-10 em células mononucleares do sangue periférico. Diante disso, esses autores sugeriram que na LVC ocorre um longo período de silenciamento caracterizado pela ausência de reações imunológicas contra o parasito, pelo não desenvolvimento de alterações patológicas e pela disseminação visceral do parasito. Essas especulações, de tal modo, explicam a manutenção desse equilíbrio por um longo tempo, fato que permite que ocorra a sobrevivência do hospedeiro e a manutenção do ciclo de vida do parasito, o que tornaria os cães um eficiente reservatório para *L. infantum* (Santos-Gomes et al. 2002). Entretanto, essa hipótese ignora a capacidade desses animais montarem resposta imune inata capaz de influenciar de alguma forma nesses eventos, portanto, precisa ser melhor investigada.

Evidências experimentais em modelos murinos, indicam que os mecanismos protetores envolvidos na infecção por *Leishmania* sp. encontram-se intimamente relacionados principalmente a uma específica resposta imune do Tipo I ligada à alta secreção de IFN- γ ,

enquanto elevados níveis de IL-4, tem sido descrito como importante marcador da resposta do Tipo II, associado à suscetibilidade a infecção por *Leishmania* (Mosmann et al. 1986, Heinzl et al. 1991, Scharon et al. 1991, Satoskar et al. 1995). Na LVC, a resposta imunoprotetora tem sido também associada com a ativação da resposta do Tipo I através da produção de IFN- γ , IL-2 e TNF- α (Pinelli et al. 1994, 1995 e 1997). Além disso, diversos trabalhos descreveram que o principal mecanismo efetor envolvido na resposta protetora em cães infectados por *Leishmania* é a ativação de macrófagos por IFN- γ e TNF- α , acionados para eliminar amastigotas intracelulares através da via L-arginina do óxido nítrico (NO) (Pinelli et al. 1994, Rodrigues et al. 2007, Lage et al. 2007).

Categorizando os cães de acordo com estado clínico, observamos um perfil de citocinas apresentando aumento da expressão de IFN- γ e TNF- α (Figura 10) e da taxa IFN- γ /IL-4 (Tabela IV) no grupo CA em comparação com os grupos CNI e CS. Em adição, correlação negativa pode ser estabelecida entre níveis de IFN- γ e TNF- α com a evolução clínica (Figura 10), o que reforça o papel dessas citocinas na manutenção da forma clínica assintomática. Esse achado é consistente com prévios trabalhos que avaliaram o envolvimento de IFN- γ e TNF- α na eliminação do parasito através da ativação de macrófagos e, através da indução da produção de óxido nítrico por essas células (Pinelli et al. 1994, Vouldoukis et al. 2007). Brachelente et al. (2005), compararam a expressão de citocinas em fragmentos de pele de cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp com cães não infectados, normais ou apresentando flebite. Nesse estudo, os autores constataram que os animais infectados apresentaram níveis elevados de expressão de IFN- γ e TNF- α em relação a animais controles, indicando que a infecção induz aumento da expressão dessas citocinas. Lima et al. (2007) utilizando a técnica de ELISA de captura, dosaram TNF- α no soro de cães sintomáticos com infecção natural por *L. chagasi* e cães não infectados e observaram que os níveis de TNF- α eram semelhantes entre os dois grupos avaliados. Por outro lado, algumas investigações não encontraram diferenças na expressão de IFN- γ e TNF- α ao avaliarem a medula óssea (Quinnell et al. 2001) ou esplenócitos (Lage et al. 2007) em cães naturalmente infectados portadores de diferentes formas clínicas da LVC. Adicionalmente, em um recente trabalho desenvolvido por Sanchez-Robert et al. (2008), foi demonstrado expressão aumentada de IFN- γ em CMSP nas formas clínicas mais graves da LVC, o que também aponta para o papel imunopatológico dessas citocinas nos processos relacionados a inflamação generalizada e visceral. O envolvimento de IFN- γ e TNF- α na resposta imune protetora anti-LVC, também foi descrito por Alves et al. (2009) ao avaliarem linfonodos de cães naturalmente infectados,

onde foi observado correlação negativa da expressão dessas citocinas com evolução clínica e carga parasitária nesse compartimento. Dessa forma, os resultados provenientes da análise da expressão de IFN- γ e TNF- α , possibilitam especular que a expressão aumentada e simultânea desses mediadores deve estar intimamente envolvida com mecanismos imunoprotetores durante a LVC, visto que, observou-se aumento dessas citocinas na pele de animais portadores da forma clínica assintomática.

A avaliação da carga parasitária pelo índice “*Leishmania Donovan Units*” (LDU), o qual correlaciona o número de amastigotas de *Leishmania* por 1000 células nucleadas (Stauber, 1955) é uma importante ferramenta para quantificar a densidade parasitária tecidual. Essa técnica vem sendo utilizada em diversos estudos que avaliaram o padrão imunopatológico da LVC considerando a carga parasitária em diferentes tecidos (Tafuri et al. 2001, 2004, Sanchez et al. 2004, Giunchetti et al. 2006, Reis et al. 2006a,b,c, Lage et al. 2007, Giunchetti et al. 2008a,b, Guerra et al. 2009, Reis et al. 2009). Nos estudos realizados pelo nosso grupo, o parasitismo tecidual para cada compartimento foi inicialmente classificado como baixo, médio e alto parasitismo, baseado nos valores teciduais de LDU estatisticamente categorizados em tercís (Reis et al. 2006a,b,c, Lage et al. 2007, Guerra et al. 2009, Reis et al. 2009). No presente estudo, os dados demonstraram que animais assintomáticos apresentam baixo parasitismo na pele, enquanto em animais sintomáticos, foi observada alta carga parasitária (Figura 9). Esses dados estão de acordo com prévias observações relatadas por pesquisadores de nosso grupo de pesquisa em vários tecidos como, pele, medula óssea, baço, fígado e linfonodo (Giunchetti et al. 2006, Reis et al. 2006a,b,c, Giunchetti et al. 2008a,b). Além disso, ao correlacionar a carga parasitária na pele (índice LDU) versus formas clínicas (assintomático, oligossintomático e sintomático), foi estabelecida correlação positiva entre densidade parasitária cutânea e evolução clínica da LVC (Figura 9). Evidências experimentais obtidas pelo nosso grupo no intuito de investigar a associação entre níveis de parasitismo em distintos compartimentos com formas clínicas da LVC demonstraram que, independente do estado clínico, o baço e a pele são os sítios de maior densidade parasitária, sendo que, o aumento da densidade parasitária na medula óssea e no baço possibilita decodificar a forma clínica na LVC (Reis et al. 2006b). De fato, essa relação entre parasitismo e manifestações clínicas da LVC, tem sido evidenciada em outros compartimentos linfóides como linfonodo (Giunchetti et al. 2008a, Alves et al. 2009, Manna et al. 2009), fígado (Giunchetti et al. 2008) e baço (Giunchetti 2004, Lage et al. 2007, Guerra et al. 2009).

Nesse contexto, a análise do perfil de citocinas categorizando os cães de acordo com densidade parasitária cutânea, torna-se importante estratégia para decodificar os aspectos imunopatológicos que estariam associados ao controle do parasitismo tecidual. Nesse sentido, os dados obtidos nesse estudo revelaram expressão aumentada das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α em todos os grupos de cães infectados (BP, MP e AP) em comparação ao grupo controle (Figura 15). Em acordo com esses dados, Lage et al. (2007) observaram que independente da densidade parasitária no baço, os níveis de IFN- γ foram significativamente aumentados em cães naturalmente infectados por *L. chagasi* quando comparados com animais não infectados. Sanchez-Robert et al. (2008), demonstraram que a expressão aumentada de IFN- γ em CMSP de cães experimentalmente infectados, foi diretamente correlacionada com a carga parasitária no sangue periférico, medida pela PCR em tempo real. Até o momento, não foi ainda estabelecido relação entre TNF- α em cães infectados, seja pela forma clínica, seja pela carga parasitária, e de modo geral observa-se que essa citocina é sempre expressa ora em níveis baixos ora em níveis aumentados, mas sem relação direta com a evolução da doença. Por outro lado, pode-se especular que TNF- α deve estar exercendo sua atividade biológica e sendo modulado de forma concomitante e sinérgica com os níveis de IFN- γ e IL-10 ou IL-4.

A expressão da subunidade p40 da citocina IL-12, também foi avaliada no presente estudo devido às considerações descritas a seguir: IL-12 é uma proteína heterodímera formada por uma cadeia leve de 35 KDa (conhecido como p35 ou IL-12 α) e uma cadeia pesada de 40 KDa (conhecida por p40 ou IL-12 β). IL-12p40 é secretada principalmente por monócitos/macrófagos, neutrófilos, micróglia e células dendríticas, e os efeitos celulares específicos da IL-12 são devidos principalmente à ativação da STAT4 através da subunidade p40 (Kaplan et al. 1996). Nesse sentido, a citocina IL-12 é conhecida por estar associada à indução da produção de IFN- γ por CMSP e células NK, ao estímulo da proliferação de células T pré-ativadas e células NK. Essa citocina também exerce estímulo à produção de óxido nítrico por macrófagos, além de exercer papel fundamental na diferenciação de células T *helper* virgens (T_{H0}) em T *helper* 1 (T_{H1}), estabelecendo uma ligação entre resposta imune inata e adaptativa (Trinchieri et al. 2003).

Buscando avaliar o papel da IL-12 na LVC, Strauss-Ayali et al. (2005) estudaram o efeito biológico da adição de IL-12 recombinante sobre a resposta imune celular em cães naturalmente e experimentalmente infectados por *L. infantum*. Nesse estudo, foi observado aumento da proliferação celular após a adição de IL-12 em cães portadores de infecção natural, entretanto, esse efeito não foi evidenciado na infecção experimental (Strauss-Ayali et

al. 2005). Além disso, foi demonstrado que CMSP de animais sintomáticos não foram capazes de produzir quantidades significantes de IFN- γ após o estímulo com antígeno solúvel específico de *Leishmania*, e que esse efeito era restaurado após a adição de IL-12 recombinante (Strauss-Ayali et al. 2005). Diante disso, foi sugerido que IL-12 é um importante mediador da resposta imune do Tipo I capaz de ativar a proliferação de linfócitos e a produção de IFN- γ em cães infectados por *L. infantum*, e que esse mediador pode ser um bom candidato para imunoterapia utilizando citocinas em animais refratários a quimioterapia convencional.

No presente trabalho, não foi encontrada diferença significativa nos níveis de IL-12p40 na pele ao categorizar os cães de acordo com estado clínico (Figura 10). Manna et al. (2006) ao avaliarem cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, demonstraram que apenas os animais assintomáticos que progrediram para doença sintomática apresentaram níveis detectáveis de IL-12 em amostras de sangue, sugerindo que essa citocina pode representar também um importante marcador de doença ativa. Adicionalmente, os dados obtidos no presente trabalho corroboram com prévias observações onde não pode ser estabelecida correlação entre a expressão de IL-12 e evolução clínica da LVC, sugerindo que a resposta imune compartimentalizada induzida por esse mediador, não reflete a presença dos sinais clínicos sistêmicos (hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia, emagrecimento, anemia, leucopenia dentre outros) encontrados nesses animais (Lage et al. 2007, Strauss-Ayali et al. 2007, Sanchez-Robert et al. 2008, Alves et al. 2009). Nesse sentido, a importância de IL-12 como marcador de doença ativa, conforme descrito por Manna et al. (2006), precisa ser ainda melhor investigada no âmbito da resposta imune compartimentalizada nos diversos tecidos acometidos pelo parasito durante a LVC.

Por outro lado, ao agrupar os animais por densidade parasitária cutânea, foi observado níveis aumentados de IL-12p40 nos grupos com baixo e médio parasitismo (BP e MP) quando comparado a animais controles e com alto parasitismo (Figura 15). Adicionalmente, foi identificada correlação negativa entre a expressão de IL-12p40 e a carga parasitária (Figura 15). Lage et al. (2007) avaliaram a expressão de IL-12 em esplenócitos de animais naturalmente infectados por *L. chagasi* e não detectaram diferenças na frequência da expressão dessa citocina ao categorizar os animais por carga parasitária esplênica. Entretanto, ao agruparem os animais infectados independente da carga parasitária, observaram um aumento dos níveis de IL-12 quando comparado a animais controle (Lage et al. 2007). Strauss-Ayali et al. (2007) observaram aumento dos níveis de IL-12 no baço de cães

portadores de infecção experimental por *L. infantum*, entretanto, essas observações não foram encontradas em animais naturalmente infectados. Em um modelo de infecção experimental acompanhado longitudinalmente em cães, foi observada baixa expressão de IL-12 em CMSP durante o período de infecção, independente da carga parasitária avaliada no sangue periférico (Sanchez-Robert et al. 2008). Apesar de ainda ser escasso o estudo da expressão de IL-12 na LVC, os achados observados no presente estudo, confrontados com estudos anteriores (Dos-Santos et al. 2004, Strauss-Ayali et al. 2005) apontam para a importância dessa citocina no controle do parasitismo cutâneo.

Em relação à citocina IL-4, não foram observadas diferenças significativas na expressão desse mediador seja entre as diferentes formas clínicas, seja ao avaliar os cães de acordo com a densidade parasitária cutânea (Figura 10 e 15, respectivamente). Na LVC, tem sido demonstrado que em animais infectados há aumento da detecção de IL-4 após o estímulo com antígeno solúvel de *Leishmania*, porém diferenças entre os níveis dessa citocina não tem sido encontrada entre formas clínicas da LVC (Carrillo et al. 2008), corroborando com os resultados obtidos no presente estudo. Por outro lado, em relação a IL-5, foi observada expressão aumentada dessa citocina na pele de cães portadores da forma assintomática da LVC, além de ter sido estabelecida correlação positiva desse mediador com o percentual de linfócitos totais contados na pele (Figura 10). Alguns autores têm sugerido que a produção de IL-5 associada à de IFN- γ pode estar envolvida no controle da infecção, possivelmente promovendo a diferenciação e a ativação de eosinófilos e aumentando a geração e ativação de linfócitos T-citotóxicos específicos (Nagasawa et al. 1991, Mary et al. 1999, Peruhype-Magalhães et al. 2005). Strauss-Ayali et al. (2007) não observaram diferenças entre níveis de IL-5 durante a evolução da infecção natural por *L. infantum* quando comparado com animais não infectados, entretanto, após 5-7 meses de infecção, foi observado aumento desse mediador em comparação ao período pré-infecção, associado ao aumento concomitante de IL-4 e IFN- γ . Nesse sentido, ainda não é possível compreender o real envolvimento dessa citocina durante o desenvolvimento da LVC, o que torna difícil explorar os efeitos imunológicos desencadeados por esse mediador na modulação da resposta e suas implicações no desenvolvimento da história natural da infecção (natural ou experimental) por *Leishmania* em cães. Assim, nosso grupo de pesquisa pretende investigar por imunohistoquímica as populações e subpopulações de células T (CD4⁺ e CD8⁺), bem como células T_{Reg} (CD25⁺) na pele desses animais a fim de buscar uma associação entre as citocinas expressas e essas populações celulares, o que acarretaria em um melhor entendimento dos eventos observados

no presente trabalho. Tudo indica que para acionar mecanismos relacionados à evolução da clínica da LVC, ocorre um perfil concomitante (misto) de IFN- γ com IL-10 e/ou IL-4. Realmente, isso parece ser verdade, e ainda mais é possível que uma rede complexa de citocinas tanto do Tipo I como do Tipo II possa estar sendo elaborada de forma a acionar mecanismos que irão conduzir a evolução clínica na história natural da leishmaniose visceral canina ou mesmo influenciar na manutenção do equilíbrio na relação parasito/hospedeiro.

Nesse sentido, as hipóteses lançadas no parágrafo anterior parecem proceder considerando os resultados encontrados no presente estudo, onde se observa expressão aumentada de IL-13 em animais apresentando a forma assintomática e correlação negativa dessa citocina com progressão clínica da LVC (Figura 10). De forma similar, categorizando os cães por densidade parasitária cutânea, também pode ser estabelecida correlação negativa entre os níveis de IL-13 e parasitismo da pele, além de expressão aumentada no grupo com médio parasitismo (Figura 15). Em adição, uma concomitante alta expressão de IFN- γ e IL-13 foi encontrada em CA, além de correlação positiva entre a expressão dessas citocinas encontrada nos animais infectados (Figura 10). Em murinos, tem sido relatado que IL-13 promove a síntese inicial de IFN- γ e influencia na montagem e maturação do granuloma tecidual (Murray et al. 2006). Além disso, foi detectado que o percentual de eosinófilos no tecido cutâneo, uma célula associada à produção de IL-13, apresentou-se diminuído no grupo de cães sintomáticos (Figura 13). Em adição, correlação negativa entre o percentual de eosinófilos com evolução clínica da LVC foi observada (Figura 13). Esses resultados apontam para a importância da IL-13 no estabelecimento de formas clínicas mais brandas, no qual níveis reduzidos dessa citocina apresentam-se associados à forma sintomática da LVC. Nesse contexto, parece que níveis elevados dessa citocina na pele favorecem um microambiente capaz de conduzir uma migração diferencial de eosinófilos possibilitando um controle mais efetivo do parasitismo nas fases iniciais da doença (assintomática) e assim favorecer um melhor prognóstico da LVC nesses animais. Em acordo com nossos resultados, Sanchez-Roberts et al. (2008) demonstraram que CMSP de animais experimentalmente infectados por *L. infantum* que desenvolveram sinais clínicos da LVC, expressaram IL-13 durante os quatro primeiros meses após a infecção, período em que os animais geralmente ainda apresentam a forma clínica assintomática da doença. Considerando o importante papel desempenhado por eosinófilos nas etapas iniciais do processo de infecção por *Leishmania*, como demonstrado no estudo desenvolvido por Belkaid et al. (2000), tem sido descrito que IL-4 atua como forte indutor da migração de eosinófilos (Sanz et al. 1998). Paranhos et al. (1993) detectaram

eosinofilia em cães inoculados intradermicamente com saliva de *Lu. longipalpis*. Observações similares foram vistas em processos inflamatórios em camundongos imunizados com uma proteína recombinante de 15 KDa de *P. papatasi* (Valenzuela et al. 2001).

Um interessante estudo realizado por Pearson et al. (1987), demonstrou que eosinófilos apresentam capacidade microbicida frente a parasitos do gênero *Leishmania*. Esses resultados sugerem que a ativação de eosinófilos em microambientes contendo IFN- γ induz a estimulação da produção de vários mediadores inflamatórios. Assim, o recrutamento de eosinófilos observado poderia representar um mecanismo leishmanicida adicional que compensaria a ausência do envolvimento precoce de macrófagos (Beil et al. 1992, Oliveira et al. 1997, 1998, Watanabe et al. 2004). Em camundongos BALB/c, os neutrófilos são as células predominantes nos primeiros três dias após infecção por *Leishmania*, acompanhados de um discreto infiltrado de eosinófilos (Andrade et al. 1984, Beil et al. 1992). Após análise histopatológica, observou-se a presença de parasitos íntegros e destruídos no interior de neutrófilos e também de eosinófilos, sugerindo a participação dessas células no controle inicial da infecção por *Leishmania* (Lima et al. 1998).

Investigações a respeito do envolvimento das citocinas IL-10 e TGF- β na modulação da resposta imune na LVC têm sido realizadas com o objetivo de compreender melhor o papel desses mediadores no desencadeamento da progressão clínica e dos processos imunopatológicos envolvidos com o parasitismo tecidual, bem como em avaliação da imunogenicidade (Pinelli et al. 1999, Quinnell et al. 2001, Santos-Gomes et al. 2002, Chamizo et al. 2005, Strauss-Ayali et al. 2005, 2007, Manna et al. 2006, Lage et al. 2007, Carrillo et al. 2008, Sanchez-Robert et al. 2008, Alves et al. 2009, Rodrigues et al. 2009). Em mamíferos, tem sido descrito que dentre os membros da família TGF- β , a citocina TGF- β 1 é predominantemente expressa por células do sistema imune, enquanto TGF- β 2 e TGF- β 3, estão presentes em pequenas quantidades, e portanto, o envolvimento dessas últimas citocinas na modulação do sistema imune é considerado insignificante (Govinden et al. 2003), fato que justifica a avaliação apenas de TGF- β 1 nesse trabalho.

Nesse contexto, ao avaliar a expressão de IL-10 e de TGF- β 1 de acordo com estado clínico, foi observado aumento dos níveis de IL-10 apenas no grupo oligossintomático quando comparado a animais controle e sintomáticos (Figura 10). Assim, correlação entre os níveis dessa citocina e evolução clínica da doença não pode ser estabelecida. Essas observações corroboram com os estudos desenvolvidos por Manna et al. (2006, 2009) ao avaliarem a expressão de IL-10 em CMSP, onde não foi possível ser estabelecida correlação dos níveis

dessa citocina com progressão da doença. Por outro lado, Pinelli et al. (1999), avaliaram a expressão de RNAm em CMSP de cães infectados com *L. infantum* e verificaram no grupo de animais que apresentaram sinais clínicos, que apenas a expressão de IL-4 e IL-10 foi detectada, indicando possível participação dessas citocinas no desenvolvimento de manifestações clínicas da doença. Posteriormente, no estudo desenvolvido por Quinnell et al. (2001), os níveis teciduais de IL-10 foram semelhantes tanto nos animais infectados como nos controles, não constatando o papel imunossupressor da IL-10 na LVC. Santos-Gomes et al. (2002) ao avaliarem os níveis de IL-10 na LVC, observaram que apenas na fase tardia da infecção em animais portadores sintomáticos, a presença de RNAm dessa citocina era detectada. Lage et al. (2007) ao avaliarem os níveis de transcritos de IL-10 em esplenócitos, demonstraram correlação positiva entre essa citocina e o estado clínico da LVC. Entretanto, Carrillo et al. (2008) ao avaliarem os níveis de transcritos em CMSP estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania*, relataram que o grupo de animais assintomáticos e oligossintomáticos apresentavam uma tendência a expressar níveis de IL-10 abaixo dos valores basais de células controle não estimuladas, associado ao aumento dos níveis de IFN- γ e TNF- α quando comparados a animais sintomáticos. Sanchez-Roberts et al. (2008) relataram que durante a infecção experimental de cães por *L. infantum* é observado em CMSP aumento dos níveis de IL-10 e TGF- β .

Na análise de citocinas imunoreguladoras e parasitismo cutâneo, foi observado que cães apresentando alto parasitismo na pele, exibiram padrão imunoregulador de resposta imune caracterizado pela expressão aumentada de IL-10 em relação aos grupos CNI, BP e MP e de TGF- β 1 em relação aos animais controle (Figura 15). Lage et al. (2007) ao correlacionarem os níveis de expressão de IL-10 com índice de parasitismo esplênico, observaram correlação positiva entre aumento de IL-10 e aumento parasitismo esplênico, sugerindo que a LVC é marcada por um predominante acúmulo de IL-10 associado à alta carga parasitária e progressão da doença no compartimento esplênico. Esse perfil imunoregulador também foi observado no estudo desenvolvido por Alves et al. (2009) ao avaliarem o perfil de citocinas em linfonodos de cães portadores de LVC. Esses autores, também observaram níveis aumentados de IL-10 e TGF- β de forma concomitante em cães sintomáticos e com alto parasitismo nesse tecido, sugerindo que esse perfil está associado com progressão da LVC e a incapacidade do controlar o parasitismo nesse órgão. Entretanto, no estudo desenvolvido por Strauss-Ayali et al. (2007) avaliando a resposta imune esplênica, não foi observado perfil imunoregulador no decorrer da infecção de cães experimentalmente

infectados. Corrêa et al. (2007) através de técnica de ELISA de captura, avaliaram de forma quantitativa a produção de IFN- γ , TGF- β e IL-10 em extratos de baço e fígado de cães assintomáticos e sintomáticos e observaram altos níveis de IL-10 em ambos os grupos de cães. Em relação à TGF- β , foi verificado níveis mais elevados no grupo de cães assintomáticos, enquanto IFN- γ foi encontrado em níveis semelhantes nos dois grupos em estudo, porém em concentrações significativamente inferiores as de IL-10 e TGF- β (Corrêa et al. 2007).

Na LV humana, tem sido bem descrito que IL-10 modula a resposta imune do Tipo I através da inibição da produção de IFN- γ via supressão da síntese de IL-12 em células apresentadoras de antígeno (Vouldoukis et al. 1997, Peruhype-Magalhães et al. 2005). Interessantemente, em um modelo murino de infecção por *L. donovani*, tem sido demonstrado que a desativação do efeito biológico da IL-10 através do emprego de anticorpos anti-IL-10R é uma estratégia imunoterapêutica eficiente na ativação da resposta imune do Tipo I, e conseqüentemente, no controle da infecção (Murray et al. 2002). Diante disso, foi sugerido que essa citocina é o principal mediador envolvido no desenvolvimento da doença (Bacellar et al. 1996), e que o equilíbrio na expressão de IFN- γ e IL-10 durante a infecção é particularmente importante no controle da leishmaniose visceral, como sugerido por estudos recentes envolvendo modelos experimentais (Silvestre et al. 2007) e na infecção humana (Peruhype-Magalhães et al. 2006). Adicionalmente, é importante ressaltar que embora níveis aumentados de IL-10 em pacientes com LV estão frequentemente implicados em limitar o desenvolvimento de patologias associadas a uma exacerbada resposta imune, especificamente no fígado, a atividade imunossupressiva desse mediador está diretamente correlacionada com aumento da replicação do parasito e progressão da doença (Nylén & Sacks 2007). Em relação ao TGF- β , tem sido amplamente relatado o envolvimento dessa citocina na progressão da leishmaniose *in vivo*, devido principalmente ao papel supressor na expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e de IFN- γ (Barral-Netto et al. 1992, Rodrigues et al. 1998, Wilson et al. 1998, Gantt et al. 2003).

Os resultados obtidos nesse estudo são consistentes com registros anteriores que relataram a habilidade de IL-10 e TGF- β em reduzir a reatividade celular, seja em nível de proliferação ou de citotoxicidade, bem como desses moduladores agirem inibindo a atividade leishmanicida de macrófagos, conduzindo assim a progressão da doença e/ou impossibilitando a cura (Gantt et al. 2003, Vouldoukis et al. 1997). Nesse sentido, Strauss-Ayali et al. (2005) demonstraram a habilidade de IL-10 em inibir a proliferação de CMSP estimuladas com

antígeno solúvel de *Leishmania*, além de inibir a produção de IFN- γ por essas células em animais experimentalmente infectados. Portanto, assim como nesses animais experimentalmente infectados por *L. infantum* e apresentando a forma ativa da infecção, os dados obtidos no presente estudo sugerem que expressão aumentada das citocinas imunoreguladoras IL-10 e TGF- β favorece um microambiente propício a multiplicação do parasito independente do estado clínico do animal. Além disso, foi observada baixa razão da expressão de IFN- γ /IL-10 e IL-12/IL-10 no grupo AP quando comparado com os demais grupos (Tabela V). É importante ressaltar que as correlações negativas observadas entre a expressão de IL-12 com os níveis das citocinas imunoreguladoras IL-10 e TGF- β 1 (Figura 19), sugerem possível efeito biológico antagonista entre essas citocinas. Assim, os dados apresentados no presente estudo apontam para o envolvimento de citocinas imunoreguladoras na supressão da resposta imune responsável pelo controle da replicação das amastigotas no compartimento dérmico de cães portadores de LV. Entretanto, ainda é obscuro os mecanismos envolvidos na indução da expressão de IL-10 e TGF- β por diferentes tipos celulares na LVC e muito divergente os achados relacionados a essas citocinas em diferentes compartimentos. Assim, torna-se fundamental ampliar o espectro de investigação científica no campo da imunopatologia da LVC, abrangendo metodologias capazes de identificar de forma simultânea as populações celulares que estão contribuindo na produção de citocinas nos diferentes compartimentos linfóides onde os processos inflamatórios estão ocorrendo durante o desenvolvimento da história natural da LVC. Somente com essas investigações poderemos definir melhor o papel dos principais mediadores no cenário imunológico tão elaborado encontrado nesses órgãos, conforme já descrito por diversos autores na literatura (Tafuri et al. 2004, Giunchetti et al. 2006, Lima et al. 2007, Giunchetti et al. 2008a,b).

Nesse sentido, considerando a importância de avaliações sobre o perfil imunoregulador e a indução da transcrição dos genes que codificam as citocinas IL-10 e TGF- β , esse trabalho se propôs a avaliar a expressão do fator de transcrição FOXP3 (Zheng et al. 2007). De uma forma geral, inúmeras limitações ocorrem na avaliação da expressão de fatores de transcrição e suas implicações em processos patológicos de doenças, devido ao fato desses mediadores estarem envolvidos na regulação da transcrição de inúmeros outros genes, assim como descrito em estudos anteriores que avaliaram a expressão de FOXP3 em murinos e que apontaram a implicação dos fatores de transcrição na indução ou inibição da expressão dessas proteínas (Marson et al. 2007, Zheng et al. 2007). Apesar dessas evidências, poucos estudos têm sido realizados no intuito de investigar o envolvimento de fatores de transcrição na

regulação da transcrição gênica de citocinas no sistema imunológico canino (Biller et al. 2007), principalmente no âmbito da infecção canina por parasitos do gênero *Leishmania* (Strauss-Ayali et al. 2007). No estudo realizado por Biller et al. (2007), foi demonstrado que há expressão aumentada concomitante de RNAm do fator de transcrição FOXP3 e das citocinas IL-10 e TGF- β em células T_{Reg} de cães com câncer. No presente estudo, apesar de não ter sido avaliadas populações celulares específicas isoladas, como linfócitos T_{Reg}, a correlação positiva entre a expressão de FOXP3 e da citocina IL-10 a nível tecidual foi confirmada (Tabela VII). Entretanto, em relação à TGF- β 1 foi observado uma tendência do aumento dessa citocina com o fator de transcrição FOXP3 (Tabela VII). Adicionalmente, baixos níveis de FOXP3 foram observados no grupo CS quando comparado aos grupos CA e CO, além de ter sido negativamente correlacionado com progressão clínica (Figura 11). Entretanto, o fato de não ter sido encontrada diminuição concomitante de FOXP3 com as citocinas IL-10 e TGF- β 1, bem como, correlação negativa desses mediadores com forma clínica assim como observado para FOXP3, pode ser explicado pela inespecificidade desse fator de transcrição, como descrito acima. Portanto é necessário investir em estudos que possam utilizar abordagens metodológicas, seja por imunofenotipagem por citometria de fluxo ou por imunohistoquímica, capazes de empregar uma marcação concomitante de ambos mediadores em células T_{Reg} (CD25⁺). A abordagem de dupla marcação fenotípica permitirá melhor compreensão do envolvimento de FOXP3 no desenvolvimento de células reguladoras na LVC afim de melhor esclarecer o papel dessa proteína no processo imunopatológico da doença.

Nesse trabalho também foi identificada redução da expressão de GATA-3 no grupo CS em relação aos grupos CA e CO e correlação negativa desse fator de transcrição com evolução clínica da LVC (Figura 11). O fator de transcrição GATA-3 está fortemente associado à indução da expressão das citocinas do Tipo II (IL-4, IL-5 e IL-13) em células T_H2 (Zhang & Flavell 1997, Zhang et al. 1998). De forma interessante, os níveis de GATA-3 também mostraram estar positivamente correlacionados com a expressão das citocinas do Tipo II (IL-5 e IL-13) (Tabela VII). Além disso, uma tendência do aumento desse fator com o aumento de IL-4 na pele de cães avaliados foi evidenciado nesse estudo (Tabela VII). Entretanto, entre essas citocinas, apenas IL-13 apresentou expressão aumentada simultaneamente no grupo CA, além de ter sido negativamente correlacionada com progressão clínica o que reforça a evidência desse evento como um biomarcador de controle da evolução clínica e da carga parasitária cutânea na LVC. Kitamura et al. (2005) ao

avaliarem a correlação entre a expressão de GATA-3 e citocinas do Tipo II em clones de células T *helper* humanas, verificaram que apenas a citocina IL-13 estava fortemente correlacionada com níveis de RNAm de GATA-3. Além disso, tem sido descrito que GATA-3 exerce importante papel na produção de IL-13 por linfócitos T e mastócitos, além de facilitar o remodelamento da cromatina do loco do gene de citocinas do tipo II em células T_{H2}, incluindo o gene codificador para IL-13 (Murray et al. 2006). Em adição, a ligação de GATA-3 em um sítio proximal do promotor de IL-13 é necessário para expressão de IL-13 em tipos celulares específicos (Murray et al. 2006).

Essa interessante correlação encontrada no compartimento dérmico, pode encorajar futuros estudos a investigar o papel do GATA-3 na determinação do fenótipo de células T_HCD4⁺ e na regulação da expressão de citocinas do Tipo II na LVC. Nesse sentido, os resultados apresentados nesse estudo apontam para uma forte evidência que níveis aumentados de IL-13 e GATA-3 simultaneamente podem ser considerados bons biomarcadores da forma clínica assintomática da LVC.

Ao categorizar os cães por densidade parasitária cutânea, a análise da expressão do fator de transcrição T-bet revelou expressão aumentada desse mediador em todos os grupos de cães infectados (BP, MP e AP) em comparação ao grupo controle (Figura 16). O fator de transcrição T-bet é uma importante proteína no sistema imune que tem sido indicado como um fator de transcrição específico para linfócitos T_HCD4⁺ virgens, atuando no desenvolvimento de células T_{H1}CD4⁺, e conseqüentemente, na expressão de citocinas do Tipo I como IFN- γ , IL-12 e TNF- α , em células T_{H1} e NK (Murphy et al. 2000, Szabo et al. 2002). Diversos estudos têm estabelecido que T-bet exerce papel essencial no controle de infecções por protozoários dependente de células T_{H1} (Szabo et al. 2002, Rosas et al. 2006). Recentemente, em acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, Strauss-Ayali et al. (2007) demonstraram aumento na expressão de T-bet e IFN- γ no baço de cães experimentalmente e naturalmente infectados apresentando alta carga parasitária.

Considerando que um balanço no padrão misto de citocinas pode estar influenciando na resistência ou suscetibilidade durante a infecção por *Leishmania* (D'Andrea et al. 1995, Peruhype-Magalhães et al. 2006, Raziuddin et al. 1994), no presente trabalho foi também investigado a ocorrência desses padrões durante LVC (Figura 19). Nesse sentido, foram estabelecidas análises de correlações entre a expressão de citocinas do Tipo I com citocinas do Tipo II e imunoreguladoras nas amostras de pele de cães infectados independente do estado clínico e densidade parasitária cutânea, no intuito de compreender como esses

mediadores interagem no sistema imunológico canino durante a LV. É importante ressaltar que o presente trabalho foi pioneiro nesse tipo de investigação durante a LVC, e que essa abordagem será fundamental no direcionamento de futuros estudos que buscarão avaliar a rede de interação desses mediadores durante a infecção canina por *L. chagasi*.

Os resultados desse estudo revelaram correlação positiva entre a citocina IL-12 e as citocinas IL-4 e IL-13. Além disso, foi observado que TNF- α foi positivamente correlacionada com a expressão das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, evidenciando a participação simultânea dessa citocina com outras inclusive associadas a resposta imune antagônica. Em um estudo que avaliou a resposta imune a lipopolissacarídeos ou *Staphylococcus aureus* em CMSP pré-tratadas com IL-4 ou IL-13, foi demonstrado significativo aumento da produção e acúmulo de IL-12 e TNF- α nessas células (D'Andrea et al. 1995). Essa conexão também foi observada no presente estudo pela correlação positiva entre IL-12 ou TNF- α com IL-4 ou IL-13. Em acordo com nossos resultados, Raziuddin et al. (1994) avaliaram *in vitro* a expressão de citocinas e observaram aumento dos níveis de TNF- α e IL-4 na leishmaniose cutânea e visceral humana. Nossos dados também revelaram correlação positiva entre IFN- γ com IL-5 e IL-13. Esses achados somados aos dados de expressão de citocinas de acordo com estado clínico, que revelaram expressão concomitante de TNF- α , IFN- γ , IL-5 e IL-13 no grupo de cães assintomáticos, reforçam a hipótese do envolvimento de padrão misto de expressão de citocinas no desenvolvimento de formas clínicas mais brandas durante a LVC.

Rodrigues et al. (2009) ao avaliarem CMSP de cães não infectados sobre estimulação *in vitro* com promastigotas de *L. chagasi*, observaram que a redução da infecção foi diretamente correlacionada com a expressão de IFN- γ e IL-4, associada a baixa taxa IFN- γ /IL-4. Diante desses achados, pode-se pressupor que há uma complexa rede de interação entre as citocinas no sistema imunológico canino capazes de acionar e regular mecanismos inflamatórios no âmbito do compartimento dérmico durante a LVC. Não obstante, também se encontra o envolvimento de citocinas tipo I (IFN- γ) associadas concomitantemente com IL-10 nos processos imunopatológicos da LVC, tais como relatadas por Lage et al. (2007), que demonstraram que a expressão simultânea de IFN- γ e IL-10 encontram-se intimamente envolvida com o desenvolvimento da história natural da LVC principalmente na patogênese da esplenomegalia na forma sintomática da doença. Adicionalmente, esses autores observaram que 100% dos animais com alta densidade parasitária esplênica expressam IL-10 em esplenócitos. Recentemente, Nylén & Sacks (2007) preconizaram que na LV humana a progressão clínica da doença não está relacionada ao predomínio de uma resposta do Tipo II

ou a uma ineficiente resposta do Tipo I. De fato, há outros mecanismos imunossupressivos e de evasão imune que contribuem para a patologia da LV como, genética do hospedeiro (podem influenciar, por exemplo, na habilidade de macrófagos em eliminar parasitos ou prejudicar na formação e manutenção de granulomas), co-infecções, estado nutricional, dentre outros (Nylén & Sacks 2007).

Além disso, é possível sugerir que o perfil misto de expressão de citocinas observado nesse trabalho em cães assintomáticos pode indicar a existência de um padrão de resposta protetora em cães infectados por *Leishmania*. O melhor conhecimento dessa rede irá auxiliar no entendimento das repostas imunes envolvidas com proteção à infecção podendo então facilitar o entendimento de mecanismos relacionados à proteção pós-vacinal em cães.

Conforme discutido anteriormente, evidencia-se com o presente trabalho uma complexa rede de citocinas envolvidas na resposta imune inata e adaptativa na infecção natural de cães por *L. chagasi*. De fato, essa rede é extremamente complexa e intrincada e envolve uma série de perfis mistos expressos de forma simultânea, alguns desses podendo ter efeitos sinérgicos frente aos processos imunopatológicos. Entretanto, para que possamos entender melhor os fenômenos envolvidos no trânsito celular do compartimento sistêmico sanguíneo para os tecidos linfóides, deve-se considerar a participação de quimiocinas no orquestramento desse trânsito, bem como na formação dos infiltrados inflamatórios. Assim, a análise da expressão de quimiocinas nos compartimentos linfóides é de fundamental importância para avaliar o papel que essas desempenham na regulação central e na variação da amplitude dos processos fisiopatológicos, incluindo o tráfego homeostático, inflamatório e hematopoiético (Sallusto et al. 2000, Ono et al. 2003). Esse tipo de análise pode contribuir para a melhor compreensão dos eventos relacionados à migração de leucócitos e na forma com que essas células atuam no estabelecimento/manutenção dos processos imunológicos associados à evolução clínica e a intensidade da replicação parasitária na LVC. Nesse contexto, há uma escassez de estudos que buscam investigar os níveis de expressão de quimiocinas na LVC.

Diante disso, no presente estudo foi gerado um grande esforço a fim de somar uma contribuição no conhecimento desses mediadores quimiotáticos na imunopatogênese dos processos inflamatórios na derme de cães naturalmente infectados e portadores de diferentes formas clínicas e graus de parasitismo cutâneo.

Em vertebrados superiores, já foram identificadas mais de 50 tipos distintos de quimiocinas (Rossi et al. 2000). As quimiocinas são um grupo de mediadores do sistema

imune de baixo peso molecular (6-17 KDa) responsáveis pelo recrutamento diferencial de diversas populações e subpopulações de leucócitos para os sítios de inflamação, direcionando células apresentadoras de antígeno maduras para os vasos linfáticos e conduzindo células T e APCs para dentro dos órgãos linfóides (Rot et al. 2004). O retorno das células efetoras para os sítios de inflamação, também é dependente de quimiocinas. As quimiocinas são subdivididas em quatro subfamílias estruturais, sendo distinguidas de acordo com o arranjo dos resíduos de cisteína na região amino-terminal, os quais podem estar separados por um aminoácido simples (CXC – α -quimiocina) e em posições adjacentes (CC – β -quimiocina), entretanto, ainda existe mais duas pequenas sub-famílias estruturais denominadas C (γ -quimiocina - contém um aminoácido cisteína) e CX3C (δ -quimiocina - contém três aminoácidos entre duas cisteínas) (Baggiolini et al. 2001). Quimiocinas são diferencialmente induzidas em resposta a diferentes patógenos ou tipos de estímulos, e é através desse conceito que elas são importantes no recrutamento e trânsito de células efetoras apropriadas para os sítios de inflamação, incluindo o recrutamento diferencial de células T_{H1} e T_{H2} . A secreção de quimiocinas é estimulada por uma série de agentes como lipopolissacarídeos, mitógenos, citocinas pró-inflamatórias, bem como vários patógenos ou produtos de secreção e excreção desses (Moser et al. 2004). As quimiocinas exercem seu efeito biológico de quimiotaxia sobre populações específicas de células de acordo com a classe a que pertencem, assim, os membros da classe CXC atuam principalmente sobre células polimorfonucleares (PMNs), enquanto os membros da classe CC atuam em uma grande variedade de células, incluindo monócitos, basófilos, eosinófilos e linfócitos, porém não exercem efeito sobre PMNs (Baggiolini et al. 2001). Embora isoladamente muitas vezes sejam associadas a migrações seletivas, as interações entre as quimiocinas e seus respectivos receptores são caracterizadas por uma considerável “promiscuidade”, onde cada receptor interage com várias quimiocinas, e cada quimiocina pode se ligar a vários receptores (Mahalingam et al. 1999).

As quimiocinas tem sido frequentemente designadas pelos nomes tradicionais, entretanto, nesse estudo, foi adotada a mais recente nomenclatura para a classificação desses mediadores (Zlotnik & Yoshie, 2000). Nesse sentido, o presente trabalho se propôs a avaliar as seguintes quimiocinas: CCL2 (MCP-1 – *Monocyte Chemoattractant Protein 1*), CCL4 (MIP-1 β – *Macrophage Inflammatory Protein 1- β*), CCL5 (RANTES – *Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted*), CCL13 (MCP-4 – *Monocyte Chemoattractant Protein 4*), CCL17 (TARC – *Thymus and Activation Regulated Chemokine*),

CCL21 (SLC – *Secondary Lymphoid Tissue Chemokine*), CCL24 (Eot-2 – *Eotaxin 2*) e CXCL8 (IL-8 – *Interleukin 8*).

A avaliação dos níveis de quimiocinas no presente trabalho mostrou que em cães categorizados de acordo com o estado clínico da LVC ocorre aumento dos níveis de CCL5 no grupo CO e CS quando comparado ao grupo CNI, enquanto CCL2 e CCL4 apresentaram-se aumentadas apenas no grupo CS em relação aos animais não infectados (Figura 12). Resultados semelhantes foram identificados na categorização dos animais por carga parasitária cutânea, sendo que níveis aumentados de CCL2, CCL4 e CCL5 foram observados no grupo de cães com alto parasitismo, além de ter sido identificadas correlações positivas entre essas quimiocinas e a carga parasitária cutânea (Figura 17). Esses resultados parecem indicar uma tentativa do organismo em estimular a migração de células, particularmente monócitos, em direção a pele, pressupondo uma estratégia do hospedeiro para controlar o parasitismo nas formas mais graves da LVC (CO, CS, MP, AP). Dessa forma, pode estar ocorrendo ação sinérgica e concomitante de CCL2, CCL4 e CCL5 no envolvimento do trânsito diferencial de leucócitos preferencialmente mononucleares e plasmócitos, e posteriormente, polimorfonucleares para os sítios inflamatórios para compor o infiltrado inflamatório dérmico com essas características celulares conforme descrito por Giunchetti et al. (2006) ao avaliar o infiltrado inflamatório dérmico em cães portadores de diferentes formas clínicas e graus de parasitismo cutâneo.

Corroborando com essa hipótese, os resultados de análise da celularidade na pele encontrados no presente estudo, demonstraram aumento do percentual de macrófagos nos grupos com sinais clínicos (CO e CS) (Figura 13) ou com níveis moderados a elevados de carga parasitária (MP e AP) (Figura 18). Nesse sentido, foi observada correlação positiva entre percentual de macrófagos e a expressão de CCL2, CCL4 e CCL5 (Tabela VI). Adicionalmente, a análise histológica da pele revelou intenso infiltrado celular composto por células mononucleares em animais com alto parasitismo (Figura 14). Esses dados reforçam a hipótese de que níveis elevados da expressão de CCL2, CCL4 e CCL5 atuariam estimulando a migração de células mononucleares, principalmente monócitos e plasmócitos, em direção ao compartimento cutâneo para compor o repertório celular para o controle do parasitismo. De fato, no estudo desenvolvido por Giunchetti et al. (2006), foi observado que a forma clínica sintomática apresenta as menores contagens de monócitos CD14⁺ circulantes, além de ser o grupo com maior intensidade inflamatória dérmica e elevados níveis de parasitismo cutâneo.

Esses dados sugerem uma possível ativação e migração dessa população de leucócitos para o compartimento cutâneo que se encontra intensamente parasitado a fim de compor o infiltrado inflamatório que é do tipo plasmolinfocitário.

Strauss-Ayali et al. (2007), avaliaram a expressão de CCL2, CCL4, CCL5 e CXCL10 no baço de cães naturalmente e experimentalmente infectados por *L. infantum*. No estudo desenvolvido por esses autores, foi demonstrado durante a infecção natural aumento dos níveis de CCL2 e CCL5 no baço de animais experimentalmente infectados quando comparados a animais não infectados. Adicionalmente, foi evidenciado aumento de CCL2 e CCL5, além de CCL4 e CXCL10 durante o curso da infecção experimental por *L. infantum*, que é revertido após o tratamento com alopurinol, indicando que a presença do parasito está associada ao aumento desses mediadores, que possivelmente estimulam a migração de células do sistema imune para o tecido buscando o controle do parasitismo (Strauss-Ayali et al. 2007).

De uma forma geral, tem sido proposto que nas leishmanioses, as quimiocinas CCL2, CCL4 e CCL5 apresentariam papel não apenas como fatores quimiotáticos, mas também como co-ativadores de macrófagos e dessa forma estariam também participando da eliminação do parasito (Ritter et al. 1996, Muzio et al. 2000, Dorner et al. 2002 e Ji et al. 2003), atuando junto a citocinas do Tipo I como IFN- γ na indução da atividade leishmanicida via iNOS ativando a capacidade microbicida em macrófagos humanos e murinos infectados por *L. donovani* e *L. major* (Ritter et al. 1996, 2000). Evidências experimentais em modelo murino de infecção por *L. major*, apontam que CCL2 é uma quimiocina indispensável para o controle da infecção sendo capaz de gerar uma resposta imune protetora anti-*Leishmania* (Quinones et al. 2007). Em biópsias de pele de pacientes portadores de leishmaniose cutânea, altos níveis de CCL2 foram associados com infiltrado de macrófagos nas lesões, além de estimulação da atividade leishmanicida (Ritter et al. 1996, 2000). Na leishmaniose visceral, a infecção experimental por *L. donovani* tem sido associada à indução de um rápido acúmulo hepático de RNAm codificadores para CCL2 (Cotterell et al. 1999). Em outro estudo, a indução de CCL2, CCL4 e CCL5 foi observada na pata de camundongos resistentes a infecção por *L. major* ou *L. amazonensis*, na fase inicial e tardia da infecção (Ji et al. 2003). Santiago et al. (2004) demonstraram que em camundongos infectados por *L. major*, a resistência a infecção foi associada com níveis aumentados de CCL5, enquanto o bloqueio do receptor de CCL5 esteve correlacionado a suscetibilidade a infecção, evidenciando a importância da cascata de eventos desencadeados por essa quimiocina que conduzem a um

eficiente controle do parasitismo. Em estudos de infecção murina por *L. major*, tem sido descrito também, que durante a fase adaptativa há um aumento da expressão de CCL2, CCL3 (MIP-1 α - *Macrophage Inflammatory Protein 1- α*), CCL5 e CXCL10 (IP-10 – *Interferon Inducible Protein 10*) na pele desses animais, enquanto no linfonodo, tem sido observado aumento de CCL2, CCL3 e CCL5 em animais normais e *knockout* para TLR4 (Antoniazzi et al. 2004).

Em macrófagos humanos experimentalmente infectados por *L. infantum*, foi demonstrado que após o estímulo com CCL2, os níveis de óxido nítrico produzido eram semelhantes aos níveis obtidos pelo estímulo com IFN- γ , aumentam a habilidade dessas células na eliminação do parasito (Brandonisio et al. 2002). Além disso, CCL2 e CCL3 podem induzir a habilidade leishmanicida *in vitro* em macrófagos humanos infectados por *L. infantum* e podem controlar o crescimento e multiplicação intracelular de *L. donovani* via mecanismos reguladores mediados por NO (Bhattacharyya et al. 2002). De fato, CCL2 causa aumento da liberação de NO, e conseqüentemente, eleva os eventos que conduzem a morte do parasito em macrófagos humanos (Villalta et al. 1998) e murinos (Aliberti et al. 1999) após infecção com *Trypanosoma cruzi in vitro*. Tzagosis et al. (2003) avaliaram a secreção de quimiocinas por células T CD8⁺ durante a LV murina por *L. infantum* e observaram que essas células exibiam expressão aumentada de CCL5 associada a imunidade contra o parasito.

A participação de neutrófilos na infecção por parasitos do gênero *Leishmania* vem sendo amplamente investigada nos últimos anos por alguns autores no intuito de compreender os mecanismos relacionados a resposta imune inata envolvidos na infecção por esses patógenos (Van Zandbergen et al. 2002, 2004, Peters et al. 2008). Recentemente, foi proposto que neutrófilos representam a primeira linha de defesa após a inoculação de promastigotas na pele dos hospedeiros pelos flebotomíneos e que estas células possuem papel fundamental no “silenciamento” do patógeno durante a penetração no organismo. Esta hipótese é conhecida como “Cavalo de tróia” (Van Zandbergen et al. 2002). Van Zandbergen et al. (2002) demonstraram que após a internalização de *Leishmania major* por neutrófilos, promovem a morte dessas células infectadas devido a processos apoptóticos, sendo posteriormente fagocitadas por macrófagos preferencialmente. Peters et al. (2008), avaliaram os eventos que ocorrem na pele durante a fase inicial da transmissão de *L. major* por flebotomíneos e observaram que a diminuição de neutrófilos nesse sítio está associada a inabilidade dos parasitos no estabelecimento da infecção. A depleção de neutrófilos está associada com o aumento da expressão de moléculas pró-inflamatórias, tais como, IL-1 α e IL-1 β .

Adicionalmente, esses autores observaram que na ausência de neutrófilos, macrófagos foram recrutados para o sítio da infecção e fagocitaram os parasitos, comprometendo a habilidade do parasito em estabelecer a infecção (Peters et al. 2008). Esses achados apontam para a hipótese que parasitos liberados a partir de neutrófilos apoptóticos são melhor adaptados para sobreviver em macrófagos, embora não exista ainda evidências diretas para explicar esse mecanismo (Jonh & Hunter 2008).

Nesse sentido, no presente estudo foi observado que níveis de CXCL8 apresentaram-se elevados em cães com alto parasitismo em relação ao grupo controle (Figura18), evidenciando um possível estímulo do parasitismo cutâneo na indução da expressão desse mediador. O influxo inicial de neutrófilos parece ser benéfico para a sobrevivência da *Leishmania* no tecido infectado (van Zandbergen et al. 2004). De forma interessante, tem sido descrito que o próprio parasito produz uma proteína com propriedades quimioatraentes, denominada “*Leishmania Chemotactic Factor*”, a qual promove a migração de neutrófilos para o sítio da infecção (Van Zandbergen et al. 2002), potencializando assim a fagocitose do parasito. No entanto, a presença do parasito no interior dessas células aumenta a sobrevivência de neutrófilos (Aga et al. 2002) o que possibilita que esse patógeno sobreviva intracelularmente por horas ou até dias após a infecção (Van-Zandbergen et al. 2004), favorecendo a persistência do parasito em células do hospedeiro.

É importante ressaltar ainda que após a fagocitose por neutrófilos, os parasitos do gênero *Leishmania* induzem a liberação de CCL4/MIP-1 β , recrutando monócitos para o sítio da infecção (Van-Zandbergen et al. 2004). Esse evento favorece a fagocitose de neutrófilos infectados por macrófagos, impedindo a ativação de mecanismos microbicidas pelos macrófagos (Van-Zandbergen et al. 2004 e Meagher et al. 1992). Dessa forma, os níveis de CXCL8 observados nos animais com AP parecem favorecer a persistência do parasito no compartimento cutâneo, impedindo mecanismos leishmanicidas por macrófagos. Além disso, os níveis elevados de macrófagos na pele de cães com formas clínicas da LVC (CO e CS) e nos grupos de cães com carga parasitária média ou alta (MP e AP) e os resultados relacionados à correlação entre o percentual de monócitos e os níveis de CCL2, CCL4 e CCL5 reforçam a hipótese da incapacidade dessas células em controlar o parasitismo.

No presente estudo, foi observado também aumento dos níveis de CCL21 no grupo de animais com alto parasitismo além de correlação positiva entre essa quimiocina e o parasitismo cutâneo (Figura 18). Tem sido descrito que CCL21 apresenta-se como importante quimiocina envolvida no recrutamento de APCs para órgãos linfóides (Marsland et al. 2005).

Os raros trabalhos que avaliaram essa quimiocina na LV têm utilizado como modelo experimental camundongos. Nesse sentido, na infecção murina por *L. donovani*, Manabu et al. (2004) demonstraram que ocorre perda seletiva da zona marginal de macrófagos do baço, evidenciando que CCL21 é fundamental para manutenção dessa estrutura e para captura de antígenos sanguíneos durante a infecção por *Leishmania*. Além disso, camundongos deficientes para o gene codificador de CCL21 e infectados por *L. donovani* apresentam maior suscetibilidade a infecção devido à perda da migração de células dendríticas (Manabu et al. 2006). É importante ressaltar que o presente estudo constitui a primeira investigação sobre o envolvimento de CCL21 na LVC. Dessa forma, a partir dos resultados obtidos é possível especular que o aumento do parasitismo cutâneo é potencialmente capaz de estimular o aumento dos níveis dessa quimiocina, resultando no recrutamento de APCs presentes na pele para órgãos linfóides. Para comprovar essa hipótese, torna-se fundamental ampliar as investigações analisando sítios linfóides como baço e linfonodos para verificar simultaneamente os níveis de quimiocinas e o perfil imunofenotípico de APCs nesses tecidos e na pele dos mesmos animais. Apesar da grande presença de APCs nesses órgãos que se traduz na hiperplasia e hipertrofia do sistema fagocítico mononuclear, e por fim, no aumento de órgãos como o baço e fígado (hepatoesplenomegalia) associado à linfodenopatia generalizada, observam-se uma ineficiência no controle do parasitismo tecidual (Reis et al. 2009).

Muito provavelmente, o repertório de citocinas e quimiocinas geradas nos animais com alta carga parasitária e sintomáticos, justifica a ineficiência dessas células em eliminar os parasitos no compartimento cutâneo, passando então a servirem como reservatórios propícios a sua replicação nos sítios inflamatórios quando os animais encontram-se nessa fase da infecção. Parte desses eventos pode ser devido à ausência de células T (CD8⁺) associado a um ambiente de citocinas que não favorece a ação citotóxica dessas células junto aos macrófagos infectados. Outra parte desse quadro pode ser devido à ineficiência de macrófagos em exercer sua atividade microbicida devido à incapacidade desses em produzir NO. Assim, acreditamos que nesse cenário se descortina uma série de mediadores (citocinas, quimiocinas, fatores de transcrição, receptores do tipo *Toll*, NO, etc.) que irão agir no sentido de favorecer ou prejudicar a relação parasito/hospedeiro.

Diante da complexa rede de interação citocinas/quimiocinas muitos biomarcadores envolvidos na resistência e suscetibilidade muitas vezes relacionados com a forma assintomática e baixo parasitismo e a forma sintomática e alto parasitismo respectivamente,

foram evidenciados com o desenvolvimento do presente trabalho. Por outro lado, descortina-se uma série de dúvidas e surgem inúmeros questionamentos que irão permear futuros trabalhos a serem desenvolvidos a partir desse estudo. Dessa forma, um dos caminhos a serem percorridos pelos estudos de imunopatologia será o emprego de ferramentas que de forma simultânea nos permita investigar a contribuição de determinadas populações e subpopulações celulares e seu envolvimento com citocinas, quimiocinas, fatores de transcrição, receptores do tipo *Toll* dentre outros mediadores no desenvolvimento da imunopatogênese na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. Abordagens como essas são fundamentais não apenas para ampliar o entendimento imunológico a cerca da LVC no âmbito da resposta imune compartimentalizada, mas também para o fornecimento de novos biomarcadores que auxiliem na distinção de respostas imunes eficazes contra parasitos do gênero *Leishmania* a fim de empregar esses biomarcadores em estudos envolvendo testes de drogas e de vacinas no modelo canino.

7 Conclusão

Diante da complexa rede de interação citocinas/quimiocinas/fatores de transcrição avaliadas no presente estudo, foi possível concluir que:

Cães assintomáticos apresentam baixo parasitismo dérmico e exibem um padrão misto de resposta imune com aumento simultâneo de citocinas do Tipo I (IFN- γ e TNF- α) e II (IL-5 e IL-13), com predomínio da resposta Tipo I acompanhado de discreto aumento do infiltrado inflamatório.

A forma oligossintomática correlaciona-se com médio parasitismo tecidual, com predomínio de citocinas imunorreguladoras e com aumento progressivo da densidade parasitária observada nesses animais.

A elevação nos níveis de citocinas imunorreguladoras (IL-10 e TGF- β 1) e queda de IL-12 contribuem na manutenção do parasitismo dérmico e, conseqüentemente, na sobrevivência e persistência de amastigotas no interior de macrófagos da pele.

Além disso, durante a passagem por esta forma oligossintomática, os níveis de IL-13 decaem e, em cães com médio parasitismo, passa a ocorrer migração preferencial de eosinófilos, que estão intimamente relacionados ao aumento de CCL24.

O parasitismo avança na forma oligossintomática, entretanto ainda mantém um discreto infiltrado inflamatório decorrente da migração diferencial de macrófagos e linfócitos, orquestrado por citocinas do Tipo I (IL-12, TNF- α e IFN- γ) e fator de transcrição T-bet.

Cães com alto parasitismo dérmico apresentam aumento de CCL2, CCL4, CCL5 e CCL21, que possivelmente são responsáveis pelo orquestramento do fluxo celular de monócitos e plasmócitos para compor o intenso infiltrado inflamatório dérmico nesses animais. A manutenção de macrófagos parasitados nesse local pode ser reflexo do ambiente de citocinas aí encontradas além de uma baixa frequência de linfócitos ativados (provavelmente linfócitos T CD8⁺).

Finalmente, o presente estudo trouxe um avanço no conhecimento dos mecanismos que determinam a resposta imune relacionada com o desenvolvimento da infecção de cães por *L. chagasi*, bem como de mecanismos protetores envolvidos na manutenção de formas mais brandas com menor parasitismo tecidual. Assim, o conjunto de dados obtidos nesse estudo permitirá estabelecer de forma racional o desenvolvimento de vacinas e de imunoterapia contra LVC.

8 Perspectivas

Esse estudo mostrou-se particularmente interessante, uma vez que avaliou a produção de mediadores do sistema imune em um órgão de grande importância na infecção por *Leishmania chagasi*, já que a maioria dos estudos até então realizados, avaliaram a presença desses mediadores, sobretudo em amostras de sangue periférico.

Buscando ampliar o conhecimento dos eventos imunopatológicos relacionados à resistência/suscetibilidade a infecção canina por *L. chagasi*, o presente trabalho permite propor as seguintes perspectivas:

- Empregar a técnica de PCR diagnóstico, a fim de, reavaliar os biomarcadores de resistência/suscetibilidade a infecção utilizando a categorização proposta por Vital et al. (2009) que classifica os cães assintomáticos em dois grupos: CA-I - Soronegativos e PCR positivos; CA-II – Soropositivos e PCR positivos. O emprego dessa nova categorização será fundamental para ampliar o conhecimento dos eventos imunopatológicos associados a resistência e suscetibilidade da infecção canina por *L. chagasi*;
- Avaliar a carga parasitária no compartimento cutâneo pela técnica de PCR em tempo real, assim como, em outros órgãos linfóides (baço, fígado, medula ósea e linfonodo) visando estimar de forma mais acurada o grau de parasitismo encontrado nesse compartimento tecidual;
- Avaliar a expressão dos mediadores estudados no presente trabalho em outros órgãos linfóides como, baço, fígado, medula ósea e linfonodo, e posteriormente, estabelecer uma correlação entre os achados imunopatológicos encontrados entre esses órgãos;
- Elaborar um artigo abordando os dados referentes a expressão de quimiocinas, celularidade tecidual e aspectos histopatológicos da pele abordados no presente estudo;
- Elaborar um artigo abordando os dados obtidos nesse estudo após nova avaliação estatística utilizando a categorização dos cães proposta por Vital et al. (2009) referentes a todos mediadores abordados, celularidade tecidual e aspectos histopatológicos da pele.

9 Anexos

9.1 Análise de correlação entre a expressão de citocinas e fatores de transcrição na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*

Tabela VII: Análise de correlação entre a expressão de citocinas e fatores de transcrição na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. As análises de correlação foram estabelecidas utilizando todos os animais avaliados nesse estudo e os valores de coeficiente linear (r) e p-value (p) estão ilustrados.

Fator de Transcrição	Citocina	Coefficiente Linear (r)	p-value (p)
T-bet	IFN- γ	0,3770	0,0105
	IL-12p40	0,4370	0,0087
	TNF- α	0,2795	0,0493
GATA-3	IL-4	0,3077	0,0567
	IL-5	0,7523	$p < 0,0001$
	IL-13	0,5220	$p < 0,0001$
FOXP3	IL-10	0,6764	$p < 0,0001$
	TGF- β 1	0,3151	0,0652

9.2 Análise de correlação entre a expressão de citocinas e quimiocinas na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*

Tabela VIII: Análise de correlação entre a expressão de citocinas e quimiocinas na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. As análises de correlação foram estabelecidas considerando todos os dados de animais infectados por *L. chagasi* e os valores de coeficiente linear (*r*) e p-value (*p*) estão ilustrados.

Citocina	Quimiocina	Coefficiente Linear (<i>r</i>)	p-value (<i>p</i>)
IFN-γ	CCL24	0,3403	0,0455
IL-4	CCL24	0,3436	0,0433
IL-10	CCL4	0,4580	0,0057
	CCL5	0,5861	0,0002
	CCL21	0,5635	0,0004
	CXCL8	0,5147	0,0016
	CCL2	-0,4055	0,0157
IL-12p40	CCL4	-0,3810	0,0240
	CCL5	-0,4772	0,0037
	CCL13	0,5932	0,0002
	CCL21	-0,5668	0,0004
	CXCL8	-0,3401	0,0456
IL-13	CCL2	-0,4465	0,0072
	CCL4	-0,4916	0,0027
	CCL5	-0,4521	0,0064
	CCL21	-0,42488	0,0110
TGF-β1	CCL2	0,5692	0,0004
	CCL4	0,5240	0,0012
	CCL5	0,6501	<0,0001
	CCL13	-0,3395	0,0460
	CCL21	0,5408	0,0008
	CXCL8	0,5584	0,0005

9.3 Análise de correlação entre a expressão de citocinas e a celularidade tecidual na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*

Tabela IX: Análise de correlação entre a expressão de citocinas e a celularidade tecidual na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. As análises de correlação foram estabelecidas considerando todos os dados de animais infectados por *L. chagasi* e os valores de coeficiente linear (r) e p-value (p) estão demonstrados na tabela.

Citocina	Célula	Coeficiente Linear (r)	p-value (p)
IL-5	Linfócito	0,4349	0,0114
IL-13	Basófilo	0,4138	0,0167

9.4 Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

9.4.1 “The role of cytokines and transcription factors in dermis of dogs naturally infected with *L. chagasi* with different parasite density”. XXIV Meeting of the Brazilian Society of Protozoology XXXV Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease, 2008, Águas de Lindóia.

THE ROLE OF CYTOKINES AND TRANSCRIPTION FACTORS IN DERMIS OF DOGS NATURALLY INFECTED WITH *L. CHAGASI* WITH DIFFERENT PARASITE DENSITY

Menezes-Souza, D.^{1,2,3}; Guerra-Sá³, R.; Giunchetti, R.C.^{1,2}; Teixeira-Carvalho, A.⁴; Martins-Filho, O.A.⁴; Corrêa-Oliveira, R.¹ and Reis, A.B.^{1,2}.

¹Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, IRR-FIOCRUZ-Belo Horizonte/MG

²Laboratório de Imunopatologia, ICEBII-NUPEB/UFOP-Ouro Preto/MG

³Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, ICEBII-NUPEB/UFOP-Ouro Preto/MG

⁴Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoramento, IRR-FIOCRUZ-Belo Horizonte/MG

Dogs naturally infected by *Leishmania chagasi* represent the main domestic reservoir of the visceral leishmaniasis considering intense skin parasitism in different clinical forms. The skin is the first point of contact with organisms of the genus *Leishmania* from sand fly vectors, and apparently normal skin of sick dogs harbours amastigote forms of *L. chagasi*. The present study was therefore designed to investigate the relationship between cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, TGF- β and TNF- α), transcription factors (T-bet, GATA-3 and FOXP3) and parasite density as seen in the ear skin of dogs naturally infected by *L. chagasi*. Thirty-five infected dogs were subdivided according with the tissue parasite density using *Leishman Donovan Units* (LDU), as follows: Low Parasitism (LP; $n=12$), Medium Parasitism (MP; $n=11$) and High Parasitism (HP; $n=12$). Sixteen non-infected dogs (CD), used as control group, were serologically and parasitologically negative for *L. chagasi*. Our results showed an increase of pro-inflammatory cytokines IFN- γ , TNF- α and transcription factor T-bet in all infected groups (LP, MP and HP) in comparison with the CD. The HP group presented a low expression of IL-12 in comparison with LP and a negative correlation ($r=-0.5928/p=0.0002$) between IL-12 and high parasite density. In HP, was found a high expression of immunoregulatory cytokines IL-10 and TGF- β in relation to CD, LP and MP groups. Furthermore, a positive correlation ($r=0.4240/p=0.0245$) between skin parasite density and IL-10 expression was observed. The increase of IL-12/IL-10 ratio in dogs with lower parasite density was observed. These findings reinforced the important of pro-inflammatory cytokines mainly IL-12 in the control of parasitism. Herein, we confirmed the involvement of IL-10 and TGF- β in the suppression of appropriate immune response in the control of parasite replication in the skin.

Supported by: Pronex 2007 (CNPq/FAPEMIG); CAPES; IRR/FIOCRUZ and UFOP

9.4.2 “Asymptomatic dogs naturally infected with *L. chagasi* present high expression of IFN- γ , TNF- α , IL-13 and GATA-3 in dermal compartment”. XXIV Meeting of the Brazilian Society of Protozoology XXXV Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease, 2008, Águas de Lindóia.

ASYMPTOMATIC DOGS NATURALLY INFECTED WITH *L. CHAGASI* PRESENT HIGH EXPRESSION OF IFN- γ , TNF- α , IL-13 AND GATA-3 IN DERMAL COMPARTMENT

Menezes-Souza, D.^{1,2,3}; Guerra-Sá³, R.; Giunchetti, R.C.^{1,2}; Teixeira-Carvalho, A.⁴; Martins-Filho, O.A.⁴; Corrêa-Oliveira, R.¹ and Reis, A.B.^{1,2}.

¹Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, IRR-FIOCRUZ-Belo Horizonte/MG

²Laboratório de Imunopatologia, ICEBII-NUPEB/UFOP-Ouro Preto/MG

³Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, ICEBII-NUPEB/UFOP-Ouro Preto/MG

⁴Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoramento, IRR-FIOCRUZ-Belo Horizonte/MG

Canine visceral leishmaniasis (CVL) manifests itself as a broad clinical spectrum ranging from asymptomatic infection to patent severe disease. In the last decade, the search for new immunobiomarkers in CVL has been intensified. However, it still remains to be elucidated that mechanisms of the acquired immune response in dermal compartment. The aim of this study was to investigate the detail cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, TGF- β and TNF- α) and transcription factors (T-bet, GATA-3 and FOXP3) profiles by real time PCR in dermis biopsies of dogs naturally infected by *L. chagasi* with distinct clinical forms. Thirty-five infected dogs were subdivided according with clinical form, as follows: Asymptomatic (AD; $n=10$), Oligosymptomatic (OD; $n=10$) and Symptomatic (SD; $n=15$) and sixteen non-infected dogs (CD) were used as control group. Our major findings indicated that asymptomatic animals showed high expression of pro-inflammatory cytokines IFN- γ and TNF- α in relation to SD and CD groups. Also a negative correlation between high levels of IFN- γ and TNF- α ($r=-0.3988/p=0.0263$; $r=-0.5496/p=0.002$) with clinical evolution. Interestingly, IL-13 showed a similar profile with the IFN- γ and TNF- α , associated with a negative correlation ($r=-0.6879/p<0.0001$) with the clinical manifestations intensity. The IFN- γ /IL-4 ratio values were higher in the AD and OD groups in relation to SD group. Furthermore, GATA-3 presented a negative correlation ($r=-0.6654/p<0.0001$) with clinical progression. Together, our results suggest that IL-13 can promote an increase of IFN- γ production during asymptomatic disease as describe by other authors. Further, the high expression of pro-inflammatory cytokines in asymptomatic animals contributes to control the evolutions of the clinical signs.

Supported by: Pronex 2007 (CNPq/FAPEMIG); CAPES; IRR/FIOCRUZ and UFOP

9.5 Artigo submetido para publicação

Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* presenting distinct skin parasite density and clinical status

Daniel Menezes-Souza^{1,2,3}, Rodrigo Corrêa-Oliveira², Renata Guerra-Sá³, Rodolfo Cordeiro Giunchetti^{1,2}, Andréa Teixeira-Carvalho⁴, Olindo Assis Martins-Filho⁴, Guilherme Corrêa Oliveira⁵, Alexandre Barbosa Reis^{1,2,6,*}

¹ *Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, 35400-000, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil*

² *Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, 30190-002, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil*

³ *Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, 35400-000, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil*

⁴ *Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, 30190-002, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil*

⁵ *Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, 30190-002, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil*

⁶ *Departamento de Análises Clínicas, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, 35400-000, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil*

*** Corresponding author:**

Phone: +55 21 31 3559-1694; Fax: +55 21 31 3559-1680.

E-mail address: alexreis@nupeb.ufop.br

Short title: Cytokines and transcription factors in CVL

Abstract

The immune response in the skin of dogs infected with *Leishmania chagasi* and its association with distinct levels of tissue parasitism and clinical progression of canine visceral leishmaniasis (CVL) are poorly understood and limited studies are available. A detailed analysis of the profiles of cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, TGF- β and TNF- α) and transcription factors (T-bet, GATA-3 and FOXP3) in the skin of 35 naturally infected dogs was carried out using Real-time PCR alongside determinations of skin parasite density and the clinical status of CVL. A mixed cytokine profile with high levels of expression of IFN- γ , TNF- α and IL-13 was determined in asymptomatic dogs. Additionally, the levels of transcription factors GATA-3 and FOXP3 were correlated with the asymptomatic disease. A mixed cytokine profile was also observed during active CVL. Moreover, high levels of IL-10 and TGF- β , concomitant with the low expression of IL-12, may represent a key condition that allows persistence of parasite replication in the skin. The results obtained indicate that in asymptomatic disease or lower levels of skin parasite density, a mixed inflammatory, regulatory immune response profile may be of major relevance for both the maintenance of the clinical status of the dogs as well as for parasite persistence and replication at low levels.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis / Cytokines / Transcription factors / Real-time PCR / *Leishmania chagasi* / Parasitism.

1. Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) caused by the protozoan *Leishmania (Leishmania) chagasi* [syn. *Leishmania (Leishmania) infantum*], is one of the most important of zoonotic diseases affecting dogs and humans in Europe and Latin America (Desjeux, 2004). Dogs are considered to be excellent models for the study of human VL because the natural history of the canine disease is very similar to that observed in human (Moreno and Alvar, 2002). A number of reports are available concerning the parasite load found in different tissues and the immunopathological changes related to the progression of clinical forms of canine visceral leishmaniasis (CVL) (Chamizo et al., 2005; Reis et al., 2006a,b,c; Giunchetti et al., 2006; Lage et al., 2007; Giunchetti et al., 2008a,b; Alves et al., 2009; Carrillo et al., 2009; Guerra et al., 2009; Manna et al., 2009; Reis et al., 2009).

It has been established that the skin is an important reservoir for parasites in asymptomatic and symptomatic *Leishmania*-infected dogs, and the high parasite loads found in this organ suggest that the skin may play an important role in the transmission and epidemiology of the disease (Abranches et al., 1991). Previous investigations have revealed that symptomatic CVL-infected dogs exhibit an intense diffuse dermal inflammatory infiltrate and high parasitic burden in comparison with their asymptomatic counterparts (Giunchetti et al., 2007). On this basis it was proposed that the immunopathological changes in the skin and the levels of cutaneous parasitism are directly related to the clinical severity of the disease.

Earlier evaluations of the immune response pattern in *Leishmania*-infected dogs have been based on the analysis of cytokines profiles in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), skin, lymph nodes, bone marrow and spleen. Thus, Pinelli et al. (Pinelli et al., 1994) found higher levels of IL-2 and TNF- α in supernatants from *in vitro*-stimulated PBMCs derived from asymptomatic dogs, and proposed that these cytokines could be used as markers

of disease progression. Furthermore, Chamizo et al. (2005) reported that PBMCs of asymptomatic CVL-infected dogs exhibited preferential expression of T_H1 cytokines (Chamizo et al., 2005). Some authors have demonstrated the ability of IL-12 to augment the production of IFN- γ by PBMCs derived from dogs with experimental or natural symptomatic CVL, and stressed the importance of these cytokines in the resolution of the disease (Dossantos et al., 2004; Strauss-Ayali et al., 2005). In a recent study, both type 1 and 2 immune responses were demonstrated to occur in the spleen during CVL (Strauss-Ayali et al., 2007), while Lage et al. (2007) suggested that CVL is marked by the balanced splenic production of type 1 and 2 cytokines with the predominant accumulation of IL-10 and IFN- γ as a consequence of increased parasitic load and progression of the disease.

In the present study, the immunopathology of CVL has been further investigated by performing a detailed analysis of the expression of type 1 (IL-12, IFN- γ and TNF- α), type 2 (IL-4, IL-5 and IL-13) and immunoregulatory (IL-10 and TGF- β) cytokines in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania (L.) chagasi*. In addition, the levels of the transcription factors T-bet, GATA-3 and FOXP3 have been assessed during CVL. Attention was particularly focussed on the possible association between clinical status and skin parasite density, but the key objective of the study was to explore novel biomarkers, including the relationship between type 1 and 2 cytokine patterns and transcription factors that might influence susceptibility and resistance to infection.

2. Materials and methods

2.1. Study population and clinical evaluation

The investigation was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation (CETEA) of the Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. The study population

comprised 51 adult dogs (aged between 2 and 6 years) of both genders that had been captured by the Center of Zoonosis Control in Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil), a region with a high prevalence of CVL and human VL. The animals were maintained under quarantine at the kennels of the Institute of Biological Sciences (Universidade Federal de Minas Gerais) and treated for intestinal helminthic infections (Endal Plus[®]; Schering-Plough Coopers, Brazil) and immunised against parvovirus, leptospirosis, distemper, parainfluenza and hepatitis (Vanguard[®] HTLP 5/CV-L vaccine; Pfizer, New York, NY, USA). Experimental animals were categorised on the basis of serological results from an indirect immunofluorescence assay test (IFAT), the “gold standard” immunological test in Brazil for the diagnosis of CVL. Sixteen dogs presenting negative IFAT assays with serum samples diluted 1:40, and negative parasitological examinations for *Leishmania* in tissue smears (bone marrow, ear skin, spleen, liver and popliteal lymph node), were considered to be non-infected and were employed as the control group (CD, $n = 16$). Thirty-five animals with positive IFAT titres $\geq 1:40$ were considered CVL-positive and were included in the groups of infected animals. *Leishmania*-infected dogs were sub-divided on the basis of the presence or absence of signs of infection according to Mancianti et al. (1988) as follows: absence of indicative signs of the disease - asymptomatic group (AD, $n = 10$); presence of a maximum of three clinical signs of the disease including opaque bristles and/or localised alopecia and/or moderate loss of weight - oligosymptomatic group (OD, $n = 10$); presence of characteristic clinical signs of the disease including cutaneous lesions, onychogryphosis, opaque bristles, severe loss of weight, apathy and keratoconjunctivitis – symptomatic group (SD, $n = 15$).

2.2. Sample collection and assessment of skin parasite load

Animals were euthanised with sodium thiopental (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA; 30 mg/kg body weight) and samples of skin tissue were collected from the ears. One fragment of the skin was used for tissue imprints on microscopic slides. The samples were fixed in methanol, stained with Giemsa and examined under an optical microscope. *Leishmania* amastigote stages were counted and parasite densities were expressed as Leishman Donovan Units (LDU) as described by Stauber et al. (1955) with some modifications. Parasite densities were categorised statistically into tertiles according to Reis et al. (2006a) as absent (LDU = 0; CD group, $n = 16$), low (LDU = 1–9; LP group, $n = 12$), medium (LDU = 10–130; MP group, $n = 11$) and high (LDU = 131–7246; HP group, $n = 12$).

2.3. Extraction of total RNA and synthesis of first strand cDNAs

The second fragment of ear skin was stored at -80°C until required for RNA analysis. Total RNA was extracted by homogenising approximately 20 mg of skin tissue with 1 mL of TRIzol reagent (Invitrogen Brasil, São Paulo, SP, Brazil) in a rotor stator. The lysate was incubated at room temperature for 10 min, mixed with chloroform (200 μL) by tube inversion, and centrifuged at $12,000 \times g$ for 10 min at 4°C . The aqueous phase was collected and RNA extraction continued using the SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) according to the recommendations of the manufacturer, which included a DNase treatment step. First strand cDNAs were synthesised from 1.0 μg of total RNA using the ThermoScriptTM RT-PCR System (Invitrogen Brasil, São Paulo, SP, Brazil) with oligo-dT primers according to the manufacturer's instructions.

2.4. Design of primers for gene evaluation

Primers were designed with the aid of Gene Runner version 3.05 (copyright Hasting Software Inc. 2004) using specific canine sequences obtained from GenBank with accession numbers GAPDH ([AB038240](#)), IL-4 ([AF239917](#)), IL-5 ([AF331919](#)), IL-10 ([U33843](#)), IL-12p40 ([U49100](#)), IL-13 ([AF244915](#)), IFN- γ ([AF126247](#)), TGF- β 1 ([L34956](#)), TNF- α ([DQ923808](#)), FOXP3 ([XM_548996](#)), GATA-3 ([XM_844060](#)) and T-bet ([XM_548164](#)). The sequences of the primers employed are listed in Table I. The primers were synthesised by Eurogentec (Southampton, U.K.) and reconstituted in nuclease free water.

2.5. Real-time PCR, cloning and sequencing of amplicons

PCR was performed on an ABI Prism 7000 DNA Sequence Detection System using SYBR[®] Green PCR Master Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 100 mM of each primer and cDNA diluted 1:5. The samples were incubated at 95°C for 10 min and then subjected to 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min, during which time fluorescence data were collected. The efficiency of each pair of primers was evaluated by serial dilution of cDNA according to the protocol developed by PE Applied Biosystems. In order to evaluate gene expression, three replicate analyses were performed and the amount of target RNA was normalised with respect to the control (housekeeping) gene GAPDH and expressed according to the $2^{-\Delta C_t}$ method. PCR products were cloning with pGEM[®]-T Easy Vector (Promega) and sequenced to check specificity using an ABI 3100 Automated Sequencer (PE Applied Biosystems) and a Dye Terminator Kit.

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with the aid of GraphPad Prism software package version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Normality of the data was established using the Kolmogorov-Smirnoff test. In the parametric data, one-way analysis of variance was used for the comparative study between groups, followed by Tukey's test. In the nonparametric data, Kruskal-Wallis test was used for between group comparative study, followed by Dunns' test for multiple comparisons. Spearman's rank correlation was also computed in order to investigate relationships between the expression of cytokine and transcription factor mRNAs with clinical forms and skin parasite density. In all cases, differences were considered significant when the probabilities of equality, p values, were ≤ 0.05 .

3. Results

3.1. Asymptomatic dogs show high expression of IFN- γ , TNF- α and IL-13 in the skin

The expression of cytokine genes was assessed in the skin of dogs naturally infected with *L. chagasi* and exhibiting different clinical forms of the disease (Fig.1). IFN- γ showed higher expression in the AD and OD groups when compared with the CD group ($p < 0.05$). TNF- α was highly expressed in AD in relation to CD and SD ($p < 0.05$). The data revealed that the impaired expression of IFN- γ and TNF- α correlated ($r = -0.3988/p = 0.0263$ and $r = -0.5496/p = 0.0020$, respectively) with the morbidity of the disease. Interestingly, asymptomatic animals presented increased levels of IL-13 in comparison with all other groups ($p < 0.05$), and this was significantly negatively correlated with clinical progression ($r = -0.6879/p < 0.0001$). Additionally, AD showed a significant increase in IL-5 expression in comparison with CD

($p < 0.05$), while OD exhibited an enhanced expression ($p < 0.05$) of IL-10 when compared with CD and AD. Analysis of TGF- β expression showed levels were significantly higher in OD than in CD ($p < 0.05$).

3.2. Enhanced IL-10 and TGF- β cytokines and a concomitant low expression of IL-12 may represent a key condition for parasite replication in the skin of infected dogs

In order to determine whether the cytokine profiles of dogs naturally infected with *L. chagasi* were associated with dermal parasite density, the expression of cytokine genes was assessed in experimental animals classified according to parasitism (Fig. 2). The data revealed a high expression of IL-10 in HP in relation to LP and MP groups ($p < 0.05$), accompanied by a positive correlation ($r = 0.4240/p = 0.0245$) with an increase in skin parasite density. Interestingly, TGF- β expression was significantly higher ($p < 0.05$) in HP compared with CD, although no correlation ($r = 0.0979/p = 0.5937$) with increased parasite load was observed. In addition, a positive correlation ($r = 0.4940/p = 0.0004$) was observed between the increases in IL-10 and TGF- β (data not shown).

Analysis of IL-12 expression indicated that a significant up-regulation of this cytokine occurred in the LP and MP groups in comparison with the HP group ($p < 0.05$). Moreover, there was a significant negative correlation ($r = -0.5928/p = 0.0002$) between the decrease in the relative expression of IL-12 and the increase in parasite load (Fig. 2), and a negative correlation between the levels of IL-12 and those of IL-10 or TGF- β ($r = -0.5777/p = 0.0005$ and $r = -0.5013/p = 0.0030$, respectively; Fig. 3). Consistent with these observations, a significant increase in the ratio of expression of IL-12 to IL-10 was observed in groups with a lower parasite burden (data not shown). The relationship between inflammatory and regulatory responses was confirmed by the ratio of expression of IFN- γ /IL-10, which was found to be

significantly higher in LP and OD when compared with HP (data not shown). The presence of the parasite was associated with an increase in the pro-inflammatory cytokines IFN- γ and TNF- α ($p < 0.05$) in all infected groups when compared with the control group, although no correlation could be established between the expression of these cytokines and skin parasite density (Fig. 2).

*3.3. Mixed cytokine profile is a hallmark of active CVL following *L. chagasi* infection*

A detailed analysis of the correlations between of type 1 and type 2 cytokines expressed in the skin of dogs naturally infected by *L. chagasi* are depicted in Fig. 3. Correlation analyses revealed that the type 1 cytokines IFN- γ , IL-12 and TNF- α were positively correlated with IL-13 expression ($r=0.3646/p=0.0476$; $r=0.5656/p=0.0011$; $r=0.3664/p=0.0464$, respectively). Interestingly, concomitant secretion of IFN- γ , TNF- α and IL-13 was observed in AD (Fig. 1). Simultaneous expression of IL-5 with IFN- γ and TNF- α ($r=0.3691/p=0.0447$ and $r=0.5673/p=0.0009$, respectively) was found during CVL, and similar situations were observed with respect to IL-4 with TNF- α ($r=0.5243/p=0.0012$) and IL-4 with IL-12 ($r=0.6643/p < 0.0001$) in all infected dogs, independent of clinical status and/or skin parasite burden (Fig. 3).

3.4. The transcription factors GATA-3 and FOXP3 are correlated with less severe clinical forms

In an attempt to determine whether the expression of the transcription factors FOXP3, GATA-3 and T-bet might be reliable biomarkers of clinical status and skin parasite load in CVL, the association between the levels of these variables was investigated. Data analyses

revealed significant negative correlations between FOXP3 and GATA-3 with respect to clinical evolution ($r=-0.6654/p<0.0001$; $r=-0.3810/p=0.0239$, respectively; Fig. 4A), but no correlation between the levels of the transcription factors and skin parasite load (Fig. 4B). The presence of the parasite was associated with an increase in T-bet in all infected groups in comparison with CD ($p<0.05$; Fig. 4B). In addition, high levels of T-bet were found in OD and SD compared with CD ($p<0.05$; Fig.4A), but no associations could be established between the expression of T-bet and clinical status or dermal parasite burden (Figs. 4A and B).

4. Discussion

The skin is an important immune compartment that actively participates in host protection at both the early and later phases of infection. A wide variety of cells, including intra-epithelial T lymphocytes and Langerhans cells, are present in the skin and these provide considerable capacity to generate and maintain local immune reactions. Leishmaniasis is typically transmitted by the bite of sand flies infected with the pathogen and the skin is clearly the first point of contact with the protozoan. Apparently normal skin of dogs naturally infected by *L. chagasi* is intensely parasitised by amastigote forms of *L. chagasi* (Giunchetti et al., 2006) that reflects a compartmentalized profile of cytokine associated with resistance or susceptibility of *Leishmania* infection.

In this context, IL-12 is known to perform a number of key functions including the induction of IFN- γ production by PBMC and NK cells, the stimulation of proliferation in pre-activated T-cells and NK cells, production of NO from macrophages and plays in the development of specific type 1 T-cell-mediated immunity (Trinchieri et al., 2003). Additionally, it has been postulated that IL-10 modulates the type 1 immune response in

Leishmania-infections by inhibiting IFN- γ production via the suppression of IL-12 synthesis in antigen presenting cells (Lage et al., 2007; Peruhype-Magalhães et al., 2005). This would imply that the balance between IFN- γ and IL-10 during infection is particularly important in the control of VL as suggested in an earlier study involving functional models (Silvestre et al., 2007). In the present investigation, dogs showing high skin parasitism exhibited a predominantly immunoregulatory pattern of immune response characterised by increased expression of IL-10 and TGF- β in comparison with the CD, LP and MP groups (Fig. 2). These findings are consistent with previous reports relating the ability of IL-10 and TGF- β to down-regulate T-cell responses and inhibit the leishmanicidal activity of macrophages thus leading to the progression of leishmaniasis and/or prevention of cure (Vouldoukis et al., 1997; Gantt et al., 2003). Alves et al. (2009) observed that the increased of IL-10 and TGF- β in lymph nodes are correlated with high parasite burden and symptomatic diseases in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. Since the experimental animals typically exhibited active CVL, the present results suggest that an increase in IL-10 and TGF- β may lead to the maintenance of parasite multiplication and therefore disease status. Moreover, the IFN- γ /IL-10 and IL-12/IL-10 ratios were lower in the HP group than in the other groups (data not showed). Consistent with these findings, high levels of IL-12 cytokine were observed in the LP in relation to the HP group and were negatively correlated with increased skin parasite density (Fig. 2). Additionally, the data revealed that increases in IL-12 were negatively correlated with the levels of the immunoregulatory cytokines IL-10 and TGF- β (Fig. 3). The results presented here thus re-emphasise the involvement of immunoregulatory cytokines in the suppression of the immune response involved in the control of parasite replication in the skin.

Few studies have been concerned with the involvement of transcription factors in the regulation of cytokine gene transcription in canine models. Biller et al. (2007) have, however,

demonstrated increased expression of the mRNAs of FOXP3 and of the cytokines IL-10 and TGF- β in regulatory T cells (T_{Reg}) of dogs with cancer. In the present study, although specific cell populations such as T_{Reg} lymphocytes were not assessed, a positive correlation between the expression of FOXP3 and immunoregulatory (IL-10 and TGF- β) cytokines was confirmed (data not shown). Additionally, low levels of FOXP3 expression were observed in the SD group compared with the AD and OD groups, and this was negatively correlated with clinical progression. Nevertheless, no correlation between the up-regulation of IL-10 and TGF- β by FOXP3 and the clinical development of the disease could be observed. An explanation for this finding could be that FOXP3 is involved in regulating the expression of many genes, as described in recent studies involving murine models (Marson et al., 2007; Zheng et al., 2007), or it might indicate that other cells could be involved in the production of these cytokines, how macrophages with the purpose of modulation of the immune response. It is, however, imperative that the role of FOXP3 in the development of regulatory cells in CVL be ascertained in future studies.

Analysis of the cytokine profile with respect to parasite burden revealed increases in the expression of pro-inflammatory cytokines IFN- γ and TNF- α and in the transcription factor T-bet in all infected groups (LP, MP and HP) in comparison with the CD group (Figs.2 and 4). T-bet is a key protein in the immune system and has been described as a T_H1-specific T-box transcription factor controlling the development of T_H1 cells and the expression of the hallmark type 1 cytokine, IFN- γ , in T_H1 and NK cells. A number of studies have established that T-bet plays an essential role in the control of T_H1 cell-dependent protozoan infections (Rosas et al., 2006; Szabo et al., 2002). Recently, Strauss-Ayali et al. (2007) reported an increase in T-bet and IFN- γ expression in experimentally and naturally infected dogs presenting parasite load in the spleen. In agreement with the present study, Lage et al. (2007) observed that, independent of the splenic parasitic load, levels of IFN- γ were significantly

increased in naturally infected dogs compared with their non-infected counterparts. However, in contrast to the present study, no differences in the levels of TNF- α could be established between infected and non-infected dogs as previously described (Lage et al., 2007).

Cytokines analysis considering dogs classified according clinical status revealed in AD group increases in IFN- γ , TNF- α (Fig. 1) and IFN- γ /IL-4 ratios in comparison with the SD and CD groups (data not shown). In addition, a negative correlation could be established between high levels of IFN- γ and TNF- α and clinical evolution (Fig. 1). These findings are consistent with previous reports implicating the involvement of IFN- γ and TNF- α secretion in optimal parasite clearance through activation of macrophages and, consequently, induction of nitric oxide production (Vouldoukis et al., 1997). Furthermore, IL-4 has been proven to have no role in disease progression of the visceralising species (Satoskar et al., 1995). In contrast to the present results, some investigations have found no difference in the expression of IFN- γ and TNF- α in bone marrow (Quinnell et al., 2001) or spleen cells (Lage et al., 2007) in naturally infected dogs presenting different clinical forms. Moreover, a recent study by Sanchez-Robert et al. (2008) demonstrated that higher IFN- γ expression in PBMCs was associated with an increase in clinical status. One possible explanation of this observation is a distinct *in situ* immune response against *L. chagasi* in target organs of naturally infected dogs, as previously described Sanchez et al. (2004).

Even though IL-12 plays a major role in determining a type 1 immune response, no difference in expression of the mRNA of this cytokine was detected among the CVL clinical groups evaluated in the present study (Fig. 1). These results are in agreement with those of Lage et al. (2007) and Alves et al. (2009) who found no differences in the frequency and expression of this cytokine in CVL and considered that its was not an appropriate biomarker of the clinical progression of *L. chagasi* infection.

In accordance with previous observations (Peruhype-Magalhães et al., 2005), the present data revealed high levels of IL-5 in the skin of asymptomatic *Leishmania*-infected dogs (Fig. 1). Previous authors had suggest that IL-5 and associated IFN- γ production could be involved in the control of infection in such animals, possibly by promoting differentiation and activation of eosinophils and enhancing the generation and activation of specific cytotoxic T lymphocytes (Nagasawa et al. 1991; Mary et al. 1999; Peruhype-Magalhães et al., 2005).

In murine leishmaniasis, several researches have observed that IL-13 synthesis promotes initial IFN- γ production and influences the assembly and maturation of tissue granuloma. However, such experiments have not addressed the mechanism(s) by which IL-13 regulates the expression of anti-leishmanial type 1 response (Murray et al., 2006). In the present study it was demonstrated that asymptomatic *Leishmania*-infected animals presented a high expression of IL-13, and a negative correlation of this cytokine with clinical progression in CVL was observed (Fig. 1). In addition, a concomitant high IFN- γ expression (Fig. 1) was found in the AD group and this was positively correlated with the expression of IL-13 (Fig. 3). In a recent longitudinal study, Sanchez-Roberts et al. (2008) evaluated the cytokine profile in PBMCs of experimentally infected dogs and observed that most of the animals that developed clinical leishmaniasis expressed IL-13 during the first 4 months after infection, a result that was in complete contrast to that presented by the asymptomatic group.

A reduction of GATA-3 in the SD group (Fig. 4B) and a high negative correlation of this transcription factor with clinical evolution were detected in the present study. The level of GATA-3 also showed a positive correlation with the expression of the type 2 cytokines IL-4, IL-5 and IL-13 (data not shown) in the skin of infected dogs. However, among these cytokines, only IL-13 presented a concomitant expression with GATA-3 in the AD group that was negatively correlated with clinical progression (Fig. 1 and Fig. 4) in CVL. This finding is

in agreement with that of Kitamura et al. (2005) who evaluated the correlation between the expression of GATA-3 and type 2 cytokines in human helper T-cell clones and demonstrated that only IL-13 was strongly correlated with the mRNA levels of the transcription factor. It has been reported that GATA-3 plays an important role in IL-13 production in both T cells and mast cells, and also facilitates chromatin remodelling of T_H2 cytokine gene loci, including the IL-13 gene. In addition, a GATA-3 binding site in the proximal IL-13 promoter is necessary for cell type-specific expression of IL-13 (Murray et al., 2006). This interesting correlation found in the dermal compartment may encourage further studies of the role of GATA-3 in the determination of CD4⁺ T cell phenotype and in the expression of type 2 cytokines in canine models. The results presented in this study thus suggest that high levels of IL-13 and GATA-3 can be considered as good biomarkers of asymptomatic clinical forms in CVL.

Several investigations have demonstrated that a mixed cytokine pattern can be associated with resistance or susceptibility in vaccine models and *Leishmania*-infections (Raziuddin et al., 1994; D'Andrea et al., 1995; Peruhype-Magalhães et al., 2006). The mixed type 1/type 2 immune profile revealed in the present study demonstrated the ability of naturally infected dogs to respond to *L. chagasi* infections independent of clinical status and skin parasite density. The immune profile was characterised by a positive correlation between cytokine levels of type 1 (IFN- γ , IL-12 and TNF- α) and of type 2 (IL-4, IL-5 and IL-13) (Fig. 3). In agreement with these results, Raziuddin et al. (1994) reported enhanced production of IL-4 and TNF- α in both VL and in cutaneous leishmaniasis. Furthermore, a study of the immune response to lipopolysaccharide or *Staphylococcus aureus* in PBMCs pre-treated with IL-4 or IL-13 revealed a significant increase in the production and accumulation of IL-12 and TNF- α in such cells, and this could be inhibited by anti-IL-4 neutralising antibodies ((D'Andrea et al., 1995). These findings were confirmed in the present study by the

demonstration of positive correlations between IL-4 or IL-13 and IL-12 or TNF- α (Fig. 3). Even though only IL-13 was directly correlated with IFN- γ , the concomitant increase in IL-12 and IL-4 indicates an up-regulation of expression of IL-13 cytokine, reflecting a complex regulatory role of the mixed cytokine profile that is conducive to a protective response in *Leishmania*-infected dogs (Fig. 3).

In conclusion, the findings reported in this study are pertinent to understanding the dynamics of the immunological events associated with clinical status and skin parasite density during ongoing CVL. It has been demonstrated that inflammatory cytokine profiles, particularly those driven by IFN- γ , TNF- α and IL-13, associated with enhanced expression of the GATA-3 transcription factor are important biomarkers for asymptomatic clinical forms in CVL. Moreover, IL-12 could play a protective role against parasite replication. On the other hand, in order to guarantee the survival and persistence of amastigotes in the skin compartment, the establishment of a regulatory profile, triggered by an increase in the immunoregulatory cytokines IL-10 and TGF- β , is crucial. The results indicate that a concomitant expression of mixed cytokines, without the necessity for an absolute polarised profile, can tilt the immune system toward either a progressive or protective response in CVL. An advance in our knowledge of the mechanism that determines the protective immune response to *L. chagasi* infection in dogs will permit the establishment of a rational strategy for the development of vaccines and immunological therapies against CVL.

Acknowledgments

The study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil (PRONEX 2007). RCO, GCO, ABR and OAMF thank CNPq for fellowships. The authors wish to express their appreciation of the hard work carried out by the staff of the

Fundação Nacional da Saúde during the execution of this project. The authors are also grateful for the use of facilities at CEBIO, Universidade Federal de Minas Gerais and Rede Mineira de Bioterismo (FAPEMIG), and for support with the provision of experimental animals.

References

- Abranches P., Silva-Pereira M.C., Conceição-Silva F.M., Santos-Gomes G.M., Janz J.G., 1991. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J. Parasitol.* 77, 557–561.
- Alves C.F., de Amorim I.F., Moura E.P., Ribeiro R.R., Michalick M.S., Kalapothakis E., Bruna-Romero O., Tafuri W.L., Teixeira M.M., Melo M.N., 2009. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128(4), 349-58.
- Biller B.J., Elmslie R.E., Burnett R.C., Avery A.C., Dow S.W., 2007. Use of FoxP3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 116, 69–78.
- Brachelente C., Müller N., Doherr M.G., Sattler U., Welle M., 2005. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. *Vet. Pathol.* 42, 166–175.
- Carrillo E., Moreno J., 2009. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128, 67–70.
- Chamizo C., Moreno J., Alvar J., 2005. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 103, 67–75.

- D'Andrea A., Ma X., Aste-Amezaga M., Paganin C., Trinchieri G., 1995. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor- α production. *J. Exp. Med.* 181, 537–546.
- Desjeux P., 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 305–318.
- Dos-Santos L.R., Barrouin-Melo S.M., Chang Y.F., Olsen J., McDonough S.P., Quimby F., dos Santos W.L., Pontes-de-Carvalho L.C., Oliveira G.G., 2004. Recombinant single-chain canine interleukin 12 induces interferon gamma mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of dogs with visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 98, 43–48.
- Gantt K.R., Schultz-Cherry S., Rodriguez N., Jeronimo S.M., Nascimento E.T., Goldman T.L., Recker T.J., Miller M.A., Wilson M.E., 2003. Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. *J. Immunol.* 170, 2613–2620.
- Giunchetti R.C., Mayrink W., Genaro O., Carneiro C.M., Corrêa-Oliveira R., Martins-Filho O.A., Marques M.J., Tafuri W.L., Reis A.B., 2006. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J. Comp. Pathol.* 135, 100–107.
- Giunchetti R.C., Martins-Filho O.A., Carneiro C.M., Mayrink W., Marques M.J., Tafuri W.L., Corrêa-Oliveira R., Reis A.B., 2008a. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 121, 23–33.
- Giunchetti R.C., Mayrink W., Carneiro C.M., Corrêa-Oliveira R., Martins-Filho O.A., Marques M.J., Tafuri W.L., Reis A.B., 2008b. Histopathological and

- immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.* 84, 269–277.
- Kitamura N., Kaminuma O., Mori A., Hashimoto T., Kitamura F., Miyagishi M., Taira K., Miyatake S., 2005. Correlation between mRNA expression of Th1/Th2 cytokines and their specific transcription factors in human helper T-cells clones. *Immunol. Cell Biol.* 83, 536–541.
- Lage R.S., Oliveira G.C., Busek S.U., Guerra L.L., Giunchetti R.C., Corrêa-Oliveira R., Reis A.B., 2007. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 115, 135–145.
- Manna L., Reale S., Vitale F., Gravino A.E., 2009. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res. Vet. Sci.* 87, 76–8.
- Mancianti F., Gramiccia M., Gradoni L., Pieri S., 1988. Studies on canine leishmaniasis control. I. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 566–567.
- Marson A., Kretschmer K., Frampton G.M., Jacobsen E.S., Polansky J.K., MacIsaac K.D., Levine S.S., Fraenkel E., von Boehmer H., Young R.A., 2007. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* 445, 931–935.
- Mary C., Auriault V., Faugere B., Dessein A., 1999. Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8⁺ and gamma interferon and interleukin-5-production CD4⁺ antigen-specific T-cells. *Infect. Immun.* 67, 5559–5566.
- Moreno J., Alvar J., 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 18, 399–405.
- Murray H.W., Tsai C.W., Liu J., Ma X., 2006. Visceral *Leishmania donovani* infection in interleukin-13^{-/-} mice. *Infect. Immun.* 74, 2487–2490.

- Nagasawa M., Ohshiba A., Yata J., 1991. Effect of recombinant interleukin 5 on the generation of cytotoxic T cells (CTL). *Cell Immunol.* 133, 317-326.
- Peruhype-Magalhães V., Martins-Filho O.A., Prata A., Silva L.De-A., Rabello A., Teixeira-Carvalho A., Figueiredo R.M., Guimarães-Carvalho S.F., Ferrari T.C., Corrêa-Oliveira R., 2005. Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. *Scand. J. Immunol.* 62, 487–495.
- Peruhype-Magalhães V., Martins-Filho O.A., Prata A., Silva L.De-A., Rabello A., Teixeira-Carvalho A., Figueiredo R.M., Guimarães-Carvalho S.F., Ferrari T.C., Van Weyenbergh J., Correa-Oliveira R., 2006. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 146, 124–132.
- Pinelli E., Killick-Kendrick R., Wagenaar J., Bernadina W., del Real G., Ruitenbergh J., 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.* 62, 229–235.
- Quinnell R.J., Courtenay O., Shaw M.A., Day M.J., Garcez L.M., Dye C., Kaye P.M., 2001. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 183, 1421–1424.
- Raziuddin, S., Abdalla, R.E., el-Awad, E.H., al-Janadi, M., 1994. Immunoregulatory and proinflammatory cytokine production in visceral and cutaneous leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 170, 1037–1040.
- Reis A.B., Martins-Filho O.A., Teixeira-Carvalho A., Carvalho M.G., Mayrink W., Franca-Silva J.C., Giunchetti R.C., Genaro O., Corrêa-Oliveira R., 2006a. Parasite density and

- impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.* 81, 68–75.
- Reis A.B., Teixeira-Carvalho A., Vale A.M., Marques M.J., Giunchetti R.C., Mayrink W., Guerra L.L., Andrade R.A., Correa-Oliveira R., Martins-Filho O.A., 2006b. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112, 102–116.
- Reis A.B., Teixeira-Carvalho A., Giunchetti R.C., Guerra L.L., Carvalho M.G., Mayrink W., Genaro O., Corrêa-Oliveira R., Martins-Filho O.A., 2006c. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin. Exp. Immunol.* 146, 303–311.
- Reis A.B., Martins-Filho O.A., Teixeira-Carvalho A., Giunchetti R.C., Carneiro C.M., Mayrink W., Tafuri W.L., Corrêa-Oliveira R., 2009. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128, 87-95.
- Rosas L.E., Snider H.M., Barbi J., Satoskar A.A., Lugo-Villarino G., Keiser T., Papenfuss T., Durbin J.E., Radzioch D., Glimcher L.H., Satoskar A.R., 2006. Cutting Edge: STAT1 and T-bet play distinct roles in determining outcome of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. *J. Immunol.* 177, 22–25.
- Sanchez, M.A., Diaz, N.L., Zerpa, O., Negron, E., Convit, J., Tapia, F.J., 2004. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70, 618–624.

- Sanchez-Robert E., Altet L., Alberola J., Rodriguez-Cortés A., Ojeda A., López-Fuertes L., Timon M., Sanchez A., Francino O., 2008. Longitudinal analysis of cytokine gene expression and parasite load in PBMC in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 15, 168–175.
- Satoskar A., Bluethmann H., Alexander J., 1995. Disruption of the murine interleukin-4 gene inhibits disease progression during *Leishmania mexicana* infection but does not increase control of *Leishmania donovani* infection. *Infect. Immun.* 63, 4894–4899.
- Silvestre R., Cordeiro-Da-Silva A., Santarém N., Vergnes B., Sereno D., Ouaiissi A., 2007. SIR2-deficient *Leishmania infantum* induces a defined IFN-gamma/IL-10 pattern that correlates with protection. *J. Immunol.* 179, 3161–3170.
- Stauber L.A., 1955. Leishmaniasis in the hamster, in: Cole W.H. (Ed.), *Some Physiological Aspects and Consequences of Parasitism*. Rutgers University Press, New Brunswick. pp. 77–90.
- Strauss-Ayali D., Baneth G., Shor S., Okano F., Jaffe C.L., 2005. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. *Int. J. Parasitol.* 35, 63–73.
- Strauss-Ayali D., Baneth G., Jaffe C., 2007. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. *Vet. Res.* 38, 547–564.
- Szabo S.J., Sullivan B.M., Stemmann C., Satoskar A.R., Sleckman B.P., Glimcher L.H., 2002. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN- γ production in CD4 and CD8 T cells. *Science.* 295, 338–342.
- Trinchieri G., Pflanz S., Kastelein R.A., 2003. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity.* 19, 641–644.
- Vouldoukis I., Bécherel P.A., Riveros-Moreno V., Arock M., da Silva O., Debré P., Mazier D., Mossalayi M.D., 1997. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of

Leishmania infantum and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. Eur. J. Immunol. 27, 860–865.

Zheng Y., Josefowicz S.Z., Kas A., Chu T.T., Gavin M.A., Rudensky A.Y., 2007. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. Nature. 445, 936–940.

Figure legends

Figure 1. Relationship between clinical status and the expression of mRNAs for cytokines in the skin of dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. Animals were categorised as asymptomatic (AD), oligosymptomatic (OD) and symptomatic (SD) according to the clinical progression of CVL: the control group (CD) comprised uninfected animals. Box plots show the median value (horizontal line across the box), the interquartile ranges (horizontal ends of the box), and the highest and lowest values (lines extending from the box and terminating in horizontal lines). The log number of messenger RNA relative expression for IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, TGF- β and TNF- α are shown. Significant differences ($p < 0.05$) compared with CD, AD, OD and SD are indicated by the letters ‘a’, ‘b’, ‘c’ and ‘d’, respectively. Spearman’s correlation indexes (r and p -values) are shown on the graphs where applicable.

Figure 2. Relationship between skin parasite density and the expression of mRNAs for cytokines in the skin of dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. Animals were categorised with low (LP), medium (MP) and high (HP) parasite densities according to Reis et al. (2006a): the control group (CD) comprised uninfected animals. Box plots show the median value (horizontal line across the box), the interquartile ranges (horizontal ends of the box), and the highest and lowest values (lines extending from the box and terminating in

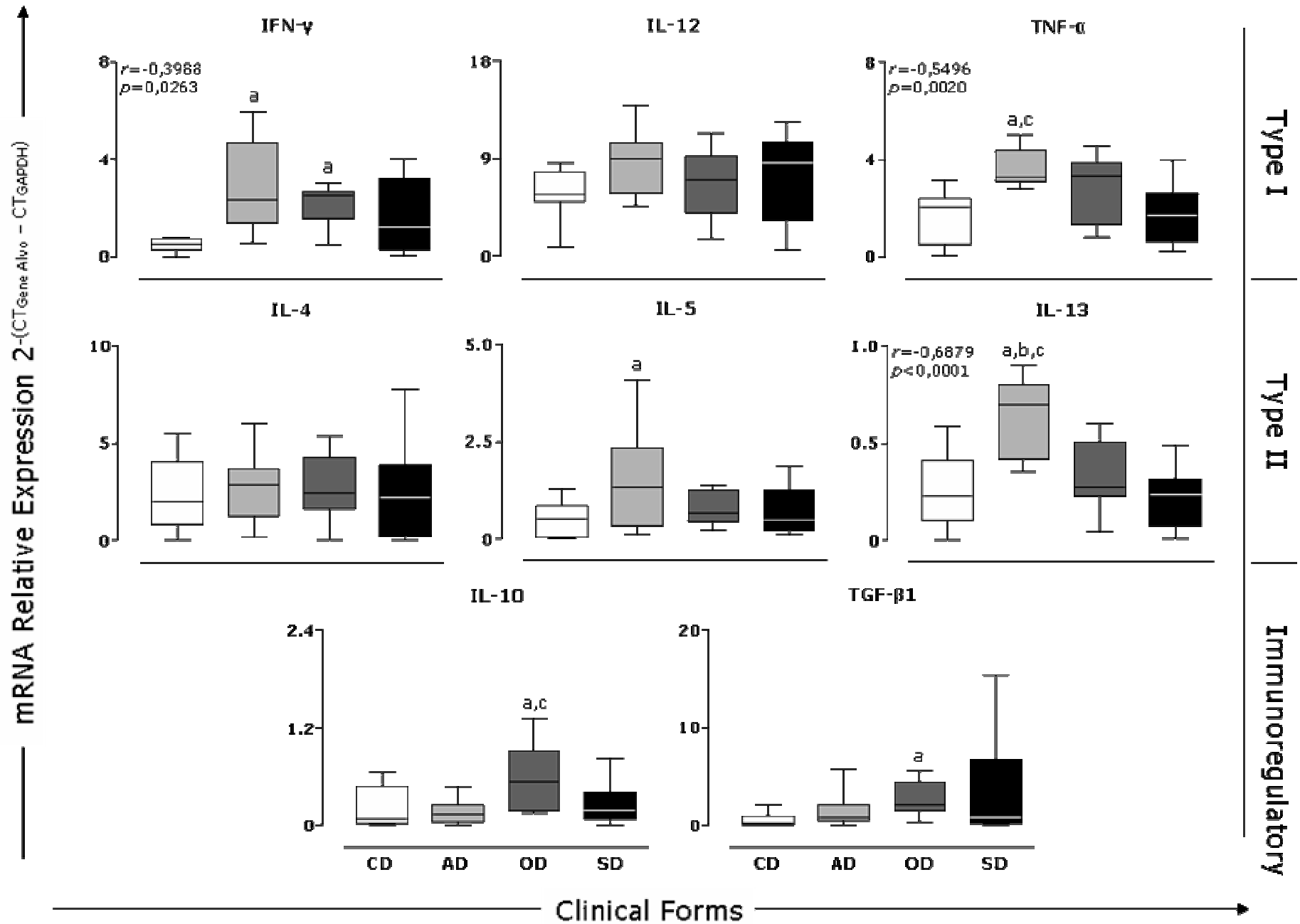
horizontal lines). The log number of messenger RNA relative expression for IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, TGF- β and TNF- α are shown. Significant differences ($p < 0.05$) compared with CD, LP, MP and HP are indicated by the letters 'a', 'b', 'c' and 'd', respectively. Spearman's correlation indexes (r and p -values) are shown on the graphs where applicable.

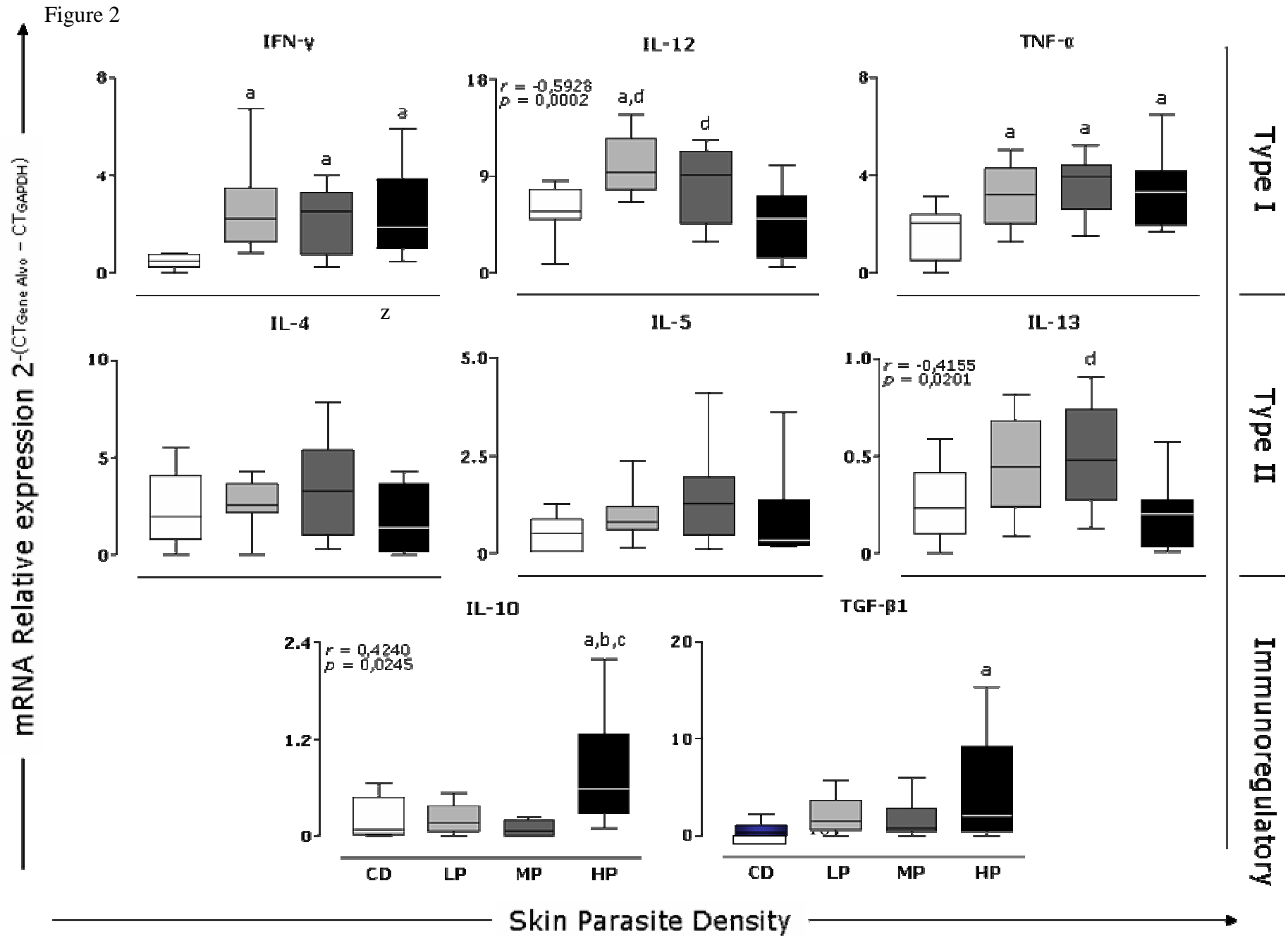
Figure 3. Correlations between the expression of the mRNAs of mixed cytokines in the skin of dogs presenting CVL (Infected dogs, $n = 35$). The results are displayed as scatter diagrams of individual values. Spearman's correlation indexes (r and p -values) are shown on the graphs while connecting lines illustrate positive and negative correlation indexes.

Figure 4. Analyses of the expression of mRNAs for transcription factors FOXP3, GATA-3 and T-bet in the skin of dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. In left plate, animals were categorised as asymptomatic (AD), oligosymptomatic (OD) and symptomatic (SD) according to the clinical progression of CVL. In right plate, animals were categorised with low (LP), medium (MP) and high (HP) parasite densities according to Reis et al. (2006a). In each case the control group (CD) comprised uninfected animals. Box plots show the median value (horizontal line across the box), the interquartile ranges (horizontal ends of the box), and the highest and lowest values (lines extending from the box and terminating in horizontal lines). The log number of messenger RNA relative expression for T-bet, GATA-3 and FOXP3 are shown. Significant differences ($p < 0.05$) compared with CD, AD and OD are indicated by the letters 'a', 'b' and 'c', respectively. Spearman's correlation indexes (r and p -values) are shown on the graphs where applicable.

Table 1. Sequences of primers used for quantification of mRNA expression by Real-time PCR. F: Forward primer, R: Reverse primer. GeneBank Accession number of the sequence used to design primers and their product length are shown as well as each PCR efficiency and R^2 .

Figure 1





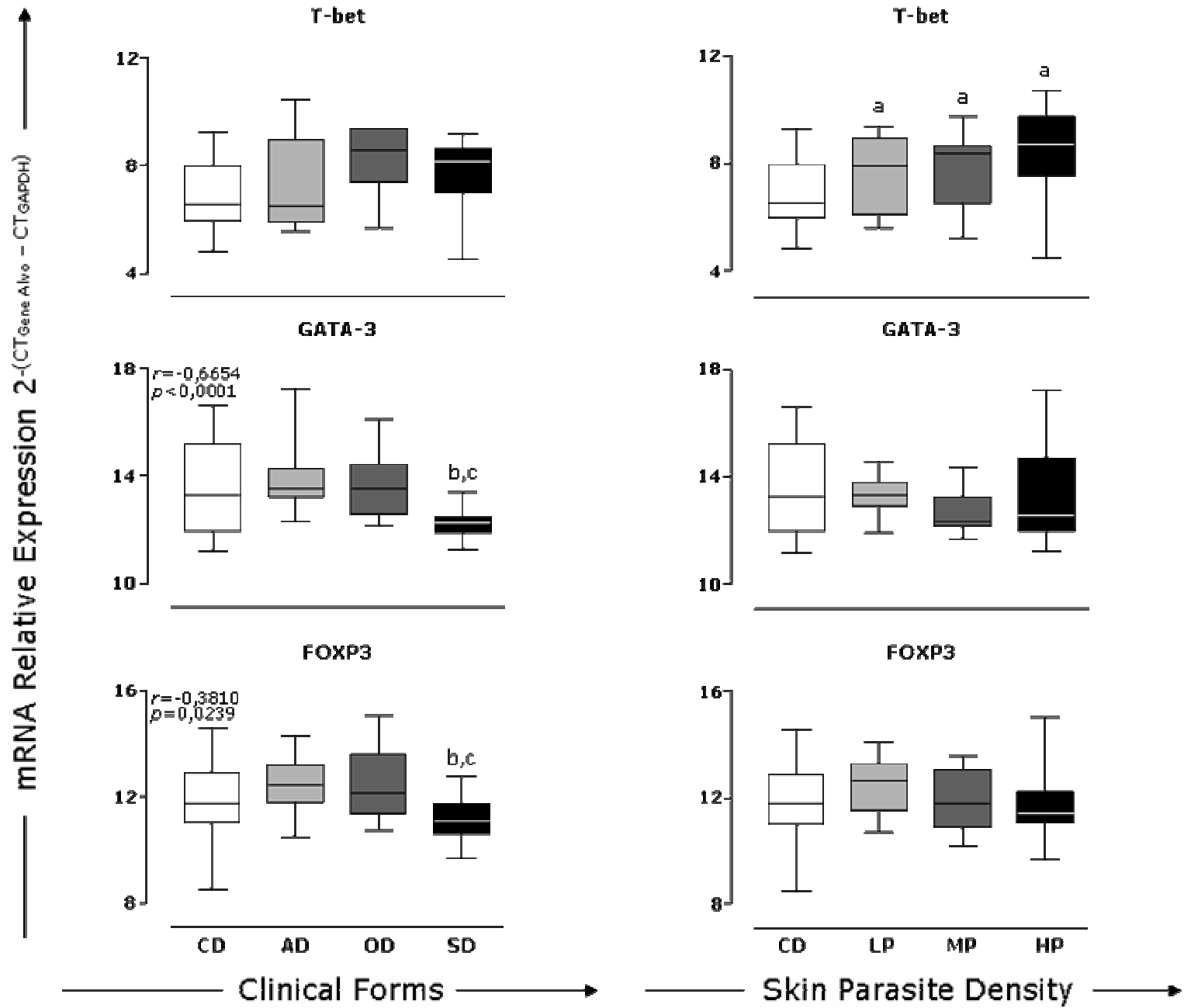


Figure 4

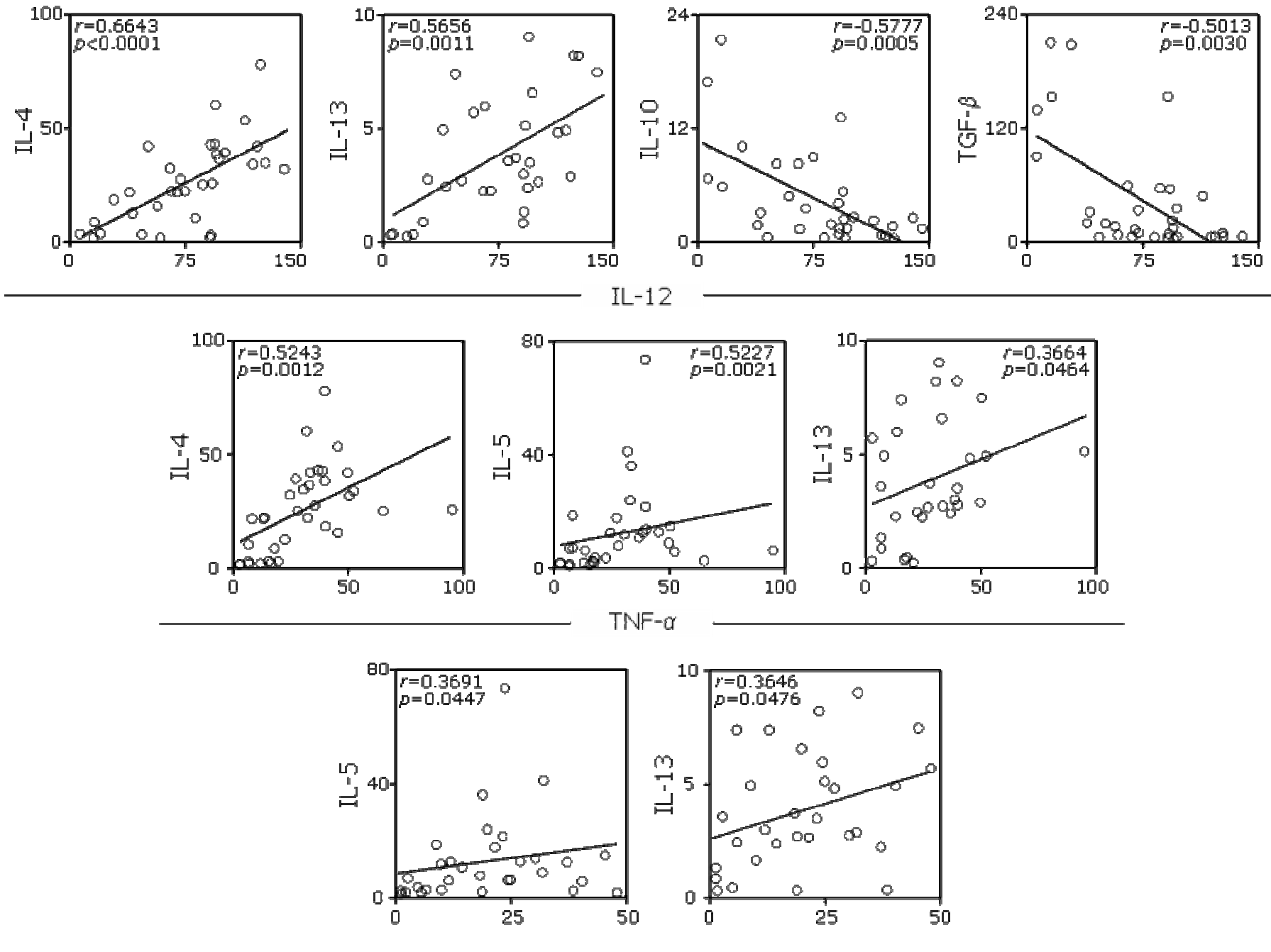


Table 1

Gene	Primer sequence (5' -3')	Product length (bp)	Reaction efficiency (%)	R ²
GAPDH				
F	TTCCAGGOCACAGTCAAG	115	99,1	0,996
R	ACTCAGCACCAGCATCAC			
IL-12p40				
F	CAGCAGADAGGGTCAGAGTGG	109	96,5	0,989
R	ACGACCTCGATGGGTAGGC			
IFN- γ				
F	TCAACCCCTTCTCGCCACT	113	95,4	0,967
R	GCTGCCCTACTTGGTCCCTGA			
TNF- α				
F	CGTCCATTCTGCCCAAAC	94	97,2	0,983
R	AGCCCTGAGCCCTTAATTC			
IL-4				
F	CACCTCCAACTGATCCAA	123	96,9	0,991
R	CTCGCTGTGAGGATGTTCAA			
IL-5				
F	GCCTATGTTTCTGCCTTTGC	106	95,3	0,979
R	GGTCCCATCGCCTATCA			
IL-13				
F	CCTCCTCAGAGCAAAGTG	148	96,7	0,973
R	CCCAGCACAAACAAAGAC			
IL-10				
F	AGAACCAGACCCAGACATC	129	97,1	0,993
R	CCACCGCCTTGCTCTTATTC			
TGF- β 1				
F	AGGATCTGGCCTGGAAGTG	134	95,1	0,981
R	CGGGTTGTGCTGGTTGTA			
T-bet				
F	GCTTCCAAACACACACATC	80	96,0	0,977
R	TGAGTGATCTCCGCATTC			
GATA3				
F	ATGACACGCTGGAGGACTTC	106	98,5	0,969
R	TGGCTGGAGTGGCTGAAA			
FOXP3				
F	AAACAGCACATTCCGAGATTG	102	95,1	0,981
R	AGGATGGCCACCGGATCAG			

9.6 Outros trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

– Menezes-Souza, D.; Guerra-Sá, R.; Busek, S.C.U.; Guimarães, A.R.S.C.; Braga, S.L.; Roatt, B.M.; Aguiar, R.D.O.; Corrêa-Oliveira, R.; Reis, A.B. “Characterization of potential secreted/excreted antigens of *Leishmania chagasi*”. 8th International Veterinary Immunology Symposium, 2007, Ouro Preto.

– Moreira, N.D.; Vitoriano-souza, J.; Giunchetti, R.C.; Menezes-Souza, D.; Corrêa-Oliveira, R.; Carneiro, C.M.; Reis, A.B. “Connections of the chemokines in the dermis of dogs immunized with antigenic compounds of *Leishmania braziliensis* plus saponin (LBSAP vaccine)”. XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 3º Encontro de Medicina Tropical do Cone Sul. 4º Encontro de Medicina Tropical dos Países de Língua Portuguesa. Simpósio Internacional Sobre Vacinas para Leishmanioses, 2009, Recife.

– Vitoriano-souza, J.; Roatt, B.M.; Moreira, N.D.; Menezes-Souza, D.; Giunchetti, R.C.; Carneiro, C.M.; Reis, A.B. “Immunomodulation of Type 1 and 2 cytokines profile in the dermis of dogs immunized with antigenic compounds of *Leishmania braziliensis* plus saponin (LBSAP vaccine)”. XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 3º Encontro de Medicina Tropical do Cone Sul. 4º Encontro de Medicina Tropical dos Países de Língua Portuguesa. Simpósio Internacional Sobre Vacinas para Leishmanioses, 2009, Recife.

10 Referências

Abranches P, Santos-Gomes G, Rachamim N, Campino L, Schnur LF, Jaffe CL. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 1991 Sep;13(5):537-50.

Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MF. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol.* 2005 Sep-Oct;52(5):399-451.

Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Müller K, Solbach W, Laskay T. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol.* 2002 Jul 15;169(2):898-905.

Alexandre-Pires G, Pais D, Correia M, Pina JA. Leishmaniosis--a report about the microvascular and cellular architecture of the infected spleen in *Canis familiaris*. *Microsc Res Tech.* 2006 Apr;69(4):227-35.

Aliberti JC, Machado FS, Souto JT, Campanelli AP, Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 1999 Sep;67(9):4819-26.

Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol*, v. 22, p. 552-7, 2006.

Alves CF, de Amorim IF, Moura EP, Ribeiro RR, Alves CF, Michalick MS, Kalapothakis E, Bruna-Romero O, Tafuri WL, Teixeira MM, Melo MN. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009 Apr 15;128(4):349-58.

Andrade ZA, Reed SG, Roters SB, Sadigursky M. Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. *Am J Pathol.* 1984 Jan;114(1):137-48.

Antoniazzi S, Price HP, Kropf P, Freudenberg MA, Galanos C, Smith DF, Müller I. Chemokine gene expression in toll-like receptor-competent and -deficient mice infected with *Leishmania major*. *Infect Immun.* 2004 Sep;72(9):5168-74.

Araújo MS, de Andrade RA, Vianna LR, Mayrink W, Reis AB, Sathler-Avelar R, Teixeira-Carvalho A, Andrade MC, Mello MN, Martins-Filho OA. Despite Leishvaccine and Leishmune trigger distinct immune profiles, their ability to activate phagocytes and CD8⁺ T-cells support their high-quality immunogenic potential against canine visceral leishmaniasis. *Vaccine.* 2008 Apr 24;26(18):2211-24.

Araújo MS, de Andrade RA, Sathler-Avelar R, Teixeira-Carvalho A, Andrade MC, Vianna LR, Mayrink W, Reis AB, Malaquias LC, Mello MN, Martins-Filho OA. T-cell-derived cytokines, nitric oxide production by peripheral blood monocytes and seric anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG subclass patterns following immunization against canine visceral leishmaniasis using Leishvaccine and Leishmune. *Vaccine.* 2009 Feb 11;27(7):1008-17.

Ashford RW, Desjeux P, Deraadt P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. *Parasitol Today.* 1992 Mar;8(3):104-5.

Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol.* 1996 Sep-Oct;14(5):523-32.

Ato M, Nakano H, Kakiuchi T, Kaye PM. Localization of marginal zone macrophages is regulated by C-C chemokine ligands 21/19. *J Immunol.* 2004 Oct 15;173(8):4815-20.

Ato M, Maroof A, Zubairi S, Nakano H, Kakiuchi T, Kaye PM. Loss of dendritic cell migration and impaired resistance to *Leishmania donovani* infection in mice deficient in CCL19 and CCL21. *J Immunol.* 2006 May 1;176(9):5486-93.

Bacellar O, Brodskyn C, Guerreiro J, Barral-Netto M, Costa CH, Coffman RL, Johnson WD, Carvalho EM. Interleukin-12 restores interferon-gamma production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1996 Jun;173(6):1515-8.

Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med.* 2001 Aug; 250(2):91-104.

Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, Skeiky YA, Ellingsworth LR, Twardzik DR, Reed SG. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science.* 1992 Jul 24;257(5069):545-8.

Bastien P, Blaineau C, Pages M. *Leishmania*: sex, lies and karyotype. *Parasitol Today*, v. 8, p. 174-7, 1992.

Beil WJ, Meinardus-Hager G, Neugebauer DC, Sorg C. Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *J Leukoc Biol.* 1992 Aug;52(2):135-42.

Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol.* 2000 Jul 15;165(2):969-77.

Bhattacharyya S, Ghosh S, Dasgupta B, Mazumder D, Roy S, Majumdar S. Chemokine-induced leishmanicidal activity in murine macrophages via the generation of nitric oxide. *J Infect Dis.* 2002 Jun 15;185(12):1704-8.

Biller BJ, Elmslie RE, Burnett RC, Avery AC, Dow SW. Use of FoxP3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2007; 116:69-78.

Bourdoiseau G, Marchal T, Magnol JP. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. *J Vet Diagn Invest.* 1997 Oct;9(4):439-40.

Brachelente C, Müller N, Doherr MG, Sattler U, Welle M. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. *Vet Pathol.* 2005 Mar;42(2):166-75.

Brandonisio O, Panaro MA, Fumarola I, Sisto M, Leogrande D, Acquafredda A, Spinelli R, Mitolo V. Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. *Clin Exp Med.* 2002 Nov;2(3):125-9.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ed. MS, 2006. 120 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_visceral2006.pdf > Acesso em: 23 nov. 2009.

Braun MC, Lahey E, Kelsall BL. Selective suppression of IL-12 production by chemoattractants. *J Immunol.* 2000 Mar 15;164(6):3009-17.

Cabral M, O'Grady J, Alexander J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunol.* 1992 Sep;14(5):531-9.

Camargo ME. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1964 May-Jun;12:117-8.

Cardoso L, Neto F, Sousa JC, Rodrigues M, Cabral M. Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. *Vet Parasitol.* 1998 Nov 16;79(3):213-20.

Carrillo E, Crusat M, Nieto J, Chicharro C, Thomas Mdel C, Martínez E, Valladares B, Cañavate C, Requena JM, López MC, Alvar J, Moreno J. Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine.* 2008 Mar 28;26(15):1902-11.

Corrêa AP, Dossi AC, de Oliveira Vasconcelos R, Munari DP, de Lima VM. Evaluation of transformation growth factor beta1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Parasitol.* 2007 Feb 28;143(3-4):267-74.

Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM. *Leishmania donovani* infection initiates T cell-independent chemokine responses, which are subsequently amplified in a T cell-dependent manner. *Eur J Immunol.* 1999 Jan;29(1):203-14.

Cunha AM, Chagas E. Estudos sobre o parasito. In: *Leishmaniose Visceral Americana, nova entidade mórbida do homem na América do Sul.* Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1937; 32: 329-337.

Day MJ. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. *Vet Parasitol.* 2007 Jun 20;147(1-2):2-8.

D'Andrea A, Ma X, Aste-Amezaga M, Paganin C, Trinchieri G. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor- α production. *J. Exp. Med.* 1995; 181:537-546.

Deplazes P, Smith NC, Arnold P, Lutz H, Eckert J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol.* 1995 Sep;17(9):451-8.

Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol.* 1996 Sep-Oct;14(5):417-23.

Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001 (a) May-Jun;95(3):239-43.

Desjeux P. Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol.* 2001 (b) Nov;190(1-2):77-9.

Desjeux P. Leishmaniasis. Nat Rev Microbiol. 2004 (a) Sep;2(9):692.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2004 (b) Sep;27(5):305-18.

Dorner BG, Scheffold A, Rolph MS, Huser MB, Kaufmann SH, Radbruch A, Flesch IE, Kroczeck RA. MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Apr 30;99(9):6181-6.

Dos-Santos LR, Barrouin-Melo SM, Chang YF, Olsen J, McDonough SP, Quimby F, dos-Santos WL, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveira GG. Recombinant single-chain canine interleukin 12 induces interferon gamma mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of dogs with visceral leishmaniasis. Vet. Immunol. Immunopathol. 2004; 98:43-48.

Fisa R, Gállego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera C, Carrió J, Gállego J, Portús M. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. Vet Parasitol. 1999 Jun 15;83(2):87-97.

Fujiwara RT, Vale AM, França da Silva JC, da Costa RT, Quetz Jda S, Martins Filho OA, Reis AB, Corrêa Oliveira R, Machado-Coelho GL, Bueno LL, Bethony JM, Frank G, Nascimento E, Genaro O, Mayrink W, Reed S, Campos-Neto A. Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmSTII) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. Vet Res. 2005 Sep-Dec;36(5-6):827-38.

Gantt KR, Schultz-Cherry S, Rodriguez N, Jeronimo SM, Nascimento ET, Goldman TL, Recker TJ, Miller MA, Wilson ME. Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. J. Immunol. 2003; 170:2613-2620.

Giunchetti, RC. Influência do parasitismo sobre os aspectos imunopatológicos na leishmaniose visceral canina (Dissertação de Mestrado em Imunoparasitologia). Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 2004; 101p.

Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL, Reis AB. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. J Comp Pathol. 2006 Aug-Oct;135(2-3):100-7.

Giunchetti RC, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Roatt BM, de Oliveira Aguiar-Soares RD, de Souza JV, das Dores Moreira N, Malaquias LC, Mota e Castro LL, de Lana M, Reis AB. Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. Vaccine. 2007 Nov 1;25(44):7674-86.

Giunchetti RC, Martins-Filho OA, Carneiro CM, Mayrink W, Marques MJ, Tafuri WL, Corrêa-Oliveira R, Reis AB. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol. 2008 (a) Jan 15;121(1-2):23-33.

Giunchetti RC, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Roatt BM, de Oliveira Aguiar-Soares RD, Coura-Vital W, de Abreu RT, Malaquias LC, Gontijo NF, Brodskyn C, de Oliveira CI, Costa DJ, de Lana M, Reis AB. A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. Vaccine. 2008 (b) Jan 30;26(5):623-38.

Giunchetti RC, Mayrink W, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL, Reis AB. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. Res Vet Sci. 2008 (c) Apr;84(2):269-77.

Giunchetti RC, Reis AB, da Silveira-Lemos D, Martins-Filho OA, Corrêa-Oliveira R, Bethony J, Vale AM, da Silva Quetz J, Bueno LL, França-Silva JC, Nascimento E, Mayrink W, Fujiwara RT. Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis. Res Vet Sci. 2008 (d) Aug;85(1):106-12.

Govinden R, Bhoola KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. Pharmacol Ther. 2003 May;98(2):257-65.

Guerra LL, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Martins-Filho OA, Reis AB, Corrêa-Oliveira R. Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res.* 2009 Feb;104(3):611-22.

Grimaldi G, Schottelius J. Leishmaniasis-their relationships to monoxenous and dixenous trypanosomatids. *Med Microbiol Immunol*, v. 190, p. 3-8, 2001.

Gu L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M, Rollins BJ. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature.* 2000 Mar 23;404(6776):407-11.

Heinzel FP, Rerko RM. Cure of progressive murine leishmaniasis: interleukin 4 dominance is abolished by transient CD4(+) T cell depletion and T helper cell type 1-selective cytokine therapy. *J Exp Med.* 1999 Jun 21;189(12):1895-906.

Hotez PJ, Remme JH, Buss P, Alleyne G, Morel C, Breman JG. Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. *Clin Infect Dis*, v. 38, p. 871-8, 2004.

Ji J, Sun J, Soong L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun.* 2003 Aug;71(8):4278-88.

John B, Hunter CA. Immunology. Neutrophil soldiers or Trojan Horses? *Science.* 2008 Aug 15;321(5891):917-8.

Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, Grusby MJ. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature.* 1996 Jul 11;382(6587):174-7.

Karpus WJ, Kennedy KJ, Kunkel SL, Lukacs NW. Monocyte chemotactic protein 1 regulates oral tolerance induction by inhibition of T helper cell 1-related cytokines. *J Exp Med.* 1998 Mar 2;187(5):733-41.

Kitamura N, Kaminuma O, Mori A, Hashimoto T, Kitamura F, Miyagishi M, Taira K, Miyatake S. Correlation between mRNA expression of Th1/Th2 cytokines and their specific transcription factors in human helper T-cells clones. *Immunol. Cell Biol.* 2005; 83:536-541.

Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A, Plevraki KG. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J Am Anim Hosp Assoc.* 1999 Sep-Oct;35(5):376-83.

Kupper TS & Fuhlbrigge RC. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol.* 2004 Mar;4(3):211-22.

Lage RS, Oliveira GC, Busek SU, Guerra LL, Giunchetti RC, Corrêa-Oliveira R, Reis AB. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007 Jan 15;115(1-2):135-45.

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Braga RR. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81(3):517.

Leandro C, Santos-Gomes GM, Campino L, Romão P, Cortes S, Rolão N, Gomes-Pereira S, Riça Capela MJ, Abranches P. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001 May 30;79(3-4):273-84.

Laveran A, Mesnil F. Sur un protozaire nouveau (*Piroplasma donovani* Lav. & Mesn.). Parasite d'une fièvre de l'Inde. *Comp. R. Hébd. Séanc. Acad. Sci.* 1903; 137: 957-961.

Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loeblich AR 3rd, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Vavra J, Wallace FG. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool.* 1980 Feb;27(1):37-58.

Lima HC, DeKrey GK, Titus RG. Resolution of an infection with *Leishmania braziliensis* confers complete protection to a subsequent challenge with *Leishmania major* in BALB/c mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999 Jan-Feb;94(1):71-6.

Lima WG, Michalick MS, de Melo MN, Luiz Tafuri W, Luiz Tafuri W. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Trop.* 2004 Sep;92(1):43-53.

Lima WG, Oliveira PS, Caliaro MV, Gonçalves R, Michalick MS, Melo MN, Tafuri WL, Tafuri WL. Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b/CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007 May 15;117(1-2):129-36.

Magalhaes PA, Mayrink W, da Costa CA, Melo MN, Dias M, Batista SM, Michalick MS, Williams P. Kala-azar in the Rio Doce, Minas Gerais area. Results of prophylactic measures. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 22, p. 197-202, 1980.

Mahalingam S, Karupiah G. Chemokines and chemokine receptors in infectious diseases. *Immunol Cell Biol.* 1999 Dec;77(6):469-75.

Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. I. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1988; 82:566-567.

Manna L, Reale S, Viola E, Vitale F, Manzillo VF, Michele PL, Caracappa S, Gravino AE. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Vet Parasitol.* 2006 Dec 20;142(3-4):271-80.

Manna L, Reale S, Vitale F, Gravino AE. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res Vet Sci.* 2009 Aug;87(1):76-8.

Marsland BJ, Bättig P, Bauer M, Ruedl C, Lässig U, Beerli RR, Dietmeier K, Ivanova L, Pfister T, Vogt L, Nakano H, Nembrini C, Saudan P, Kopf M, Bachmann MF. CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells. *Immunity.* 2005 Apr;22(4):493-505.

Mary C, Auriault V, Faugere B, Dessein A. Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8+ and gamma interferon and interleukin-5-production CD4+ antigen-specific T-cells. *Infect. Immun.* 1999; 67, 5559–5566.

Marson A, Kretschmer K, Frampton GM, Jacobsen ES, Polansky JK, MacIsaac KD, Levine SS, Fraenkel E, von Boehmer H, Young RA. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature.* 2007;445:931-935.

Marzochi MC, Coutinho SG, De Souza WJ, De Toledo LM, Grimaldi Júnior G, Momen H, Pacheco Rda S, Sabroza PC, De Souza MA, Rangel Júnior FB, et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1985 Jul-Sep;80(3):349-57.

Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology.* 1999 Sep;119 (Pt 3):237-46.

Maurício IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today.* 2000 May;16(5):188-9.

Meagher LC, Savill JS, Baker A, Fuller RW, Haslett C. Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B2. *J Leukoc Biol.* 1992 Sep;52(3):269-73.

Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 2002 Sep;18(9):399-405

Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol.* 2004 Feb;25(2):75-84.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986 Apr 1;136(7):2348-57.

Murphy KM, Ouyang W, Farrar JD, Yang J, Ranganath S, Asnagli H, Afkarian M, Murphy TL. Signaling and transcription in T helper development. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:451-94.

Murray HW, Lu CM, Mauze S, Freeman S, Moreira AL, Kaplan G, Coffman RL. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infect Immun.* 2002 Nov;70(11):6284-93.

Murray HW, Tsai CW, Liu J, Ma X. Visceral *Leishmania donovani* infection in interleukin-13^{-/-} mice. *Infect. Immun.* 2006; 74:2487-2490.

Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol.* 2000 Jun 1;164(11):5998-6004.

Nagasawa M, Ohshiba A, Yata J. Effect of recombinant interleukin 5 on the generation of cytotoxic T cells (CTL). *Cell Immunol.* 1991; 133, 317-326.

Nicolle CH. Cultures des corps de Leishman isolés de la rate dans trois cas d'anémie splénique infantile. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1908; 1-121.

Nieto CG, García-Alonso M, Requena JM, Mirón C, Soto M, Alonso C, Navarrete I. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999 Feb 1;67(2):117-30.

Noli C & Auxilia ST. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet Dermatol.* 2005 Aug;16(4):213-32.

Nylén S, Sacks D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol.* 2007 Sep;28(9):378-84.

Oliveira SH, Fonseca SG, Romão PR, Ferreira SH, Cunha FQ. Nitric oxide mediates the microbicidal activity of eosinophils. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997;92 Suppl 2:233-5

Oliveira SH, Fonseca SG, Romão PR, Figueiredo F, Ferreira SH, Cunha FQ. Microbicidal activity of eosinophils is associated with activation of the arginine-NO pathway. *Parasite Immunol*. 1998 Sep;20(9):405-12.

Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D, Ohbayashi M, Dawson M, Toda M. Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Jun;111(6):1185-99; quiz 1200.

Palatnik-de-Sousa CB, dos Santos WR, França-Silva JC, da Costa RT, Reis AB, Palatnik M, Mayrink W, Genaro O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, Nov;65(5):510-7, 2001.

Paranhos M, dos Santos WC, Sherlock I, Oliveira GG, de Carvalho LC. Development of eosinophilia in dogs intradermally inoculated with sand fly saliva and *Leishmania (Leishmania) Chagasi* stationary-phase promastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1993 Apr-Jun;88(2):249-51.

Pearson RD, Uydess IL, Chapman SW, Steigbigel RT. Interaction of human eosinophils with *Leishmania donovani*. *Ann Trop Med Parasitol*. 1987 Dec;81(6):735-9.

Peruhype-Magalhães V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva Lde A, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, Figueiredo RM, Guimarães-Carvalho SF, Ferrari TC, Correa-Oliveira R. Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. *Scand J Immunol*. 2005 Nov;62(5):487-95.

Peruhype-Magalhães V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva Lde A, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, Figueiredo RM, Guimarães-Carvalho SF, Ferrari TC, Van Weyenbergh J, Correa-Oliveira R. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-

alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. Clin Exp Immunol. 2006 Oct;146(1):124-32.

Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. Science. 2008 Aug 15;321(5891):970-4. Science. 2008 Dec 12;322(5908):1634.

Pinelli E, Boog CJ, Rutten VP, van Dijk B, Bernadina WE, Ruitenberg EJ. A canine CD8+ cytotoxic T-cell line specific for *Leishmania infantum*-infected macrophages. Tissue Antigens. 1994 (a) Mar;43(3):189-92.

Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenberg J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. Infect Immun. 1994 (b) Jan;62(1):229-35.

Pinelli E, Gonzalo RM, Boog CJ, Rutten VP, Gebhard D, del Real G, Ruitenberg EJ. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. Eur J Immunol. 1995 Jun;25(6):1594-600.

Pinelli, E. Cytokines in canine visceral leishmaniasis, Cytokines in veterinary medicine. edited by H. M. Schijns VECJ. Netherlands: Utrecht University.1997; 217-247.

Pinelli E, Rutten VP, Bruysters M, Moore PF, Ruitenberg EJ. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. Infect Immun. 1999 Jan;67(1):237-43.

Quinnell RJ, Courtenay O, Shaw MA, Day MJ, Garcez LM, Dye C, Kaye PM. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. J Infect Dis. 2001 May 1;183(9):1421-4.

Quinnell RJ, Kennedy LJ, Barnes A, Courtenay O, Dye C, Garcez LM, Shaw MA, Carter SD, Thomson W, Ollier WE. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics*. 2003 Apr;55(1):23-8.

Quinones MP, Estrada CA, Jimenez F, Martinez H, Willmon O, Kuziel WA, Ahuja SK, Ahuja SS. CCL2-independent role of CCR2 in immune responses against *Leishmania major*. *Parasite Immunol*. 2007 Apr;29(4):211-7.

Raziuddin S, Abdalla RE, el-Awad EH, al-Janadi M. Immunoregulatory and proinflammatory cytokine production in visceral and cutaneous leishmaniasis. *J. Infect. Dis*. 1994; 170:1037-1040.

Reis, AB. Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da infecção (Tese de Doutorado em Ciências). Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 2001; 180p.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC, Giunchetti RC, Genaro O, Corrêa-Oliveira R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci*. 2006 (a) Aug;81(1):68-75.

Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, Guerra LL, Andrade RA, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2006 Aug (b) 15;112(3-4):102-16.

Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Guerra LL, Carvalho MG, Mayrink W, Genaro O, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin Exp Immunol*. 2006 (c) Nov;146(2):303-11.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, Tafuri WL, Corrêa-Oliveira R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009 Mar 15;128(1-3):87-95.

Ribeiro RR, Moura EP, Pimentel VM, Sampaio WM, Silva SM, Schettini DA, Alves CF, Melo F A, Tafuri WL, Demicheli C, Melo MN, Frezard F, Michalick MS. 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. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 52, p. 2564-72, 2008

Ritter U, Moll H, Laskay T, Bröcker E, Velazco O, Becker I, Gillitzer R. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1996 Mar;173(3):699-709.

Ritter U, Moll H. Monocyte chemotactic protein-1 stimulates the killing of *Leishmania major* by human monocytes, acts synergistically with IFN-gamma and is antagonized by IL-4. *Eur J Immunol.* 2000 Nov;30(11):3111-20.

Rodrigues V Jr, Santana da Silva J, Campos-Neto A. Transforming growth factor beta and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun.* 1998 Mar;66(3):1233-6.

Rodrigues CA, Batista LF, Teixeira MC, Pereira AM, Santos PO, de Sá Oliveira GG, de Freitas LA, Veras PS. Peripheral blood mononuclear cell supernatants from asymptomatic dogs immunized and experimentally challenged with *Leishmania chagasi* can stimulate canine macrophages to reduce infection in vitro. *Vet Parasitol.* 2007 Feb 28;143(3-4):197-205.

Rodrigues CA, Batista LF, Filho RS, Santos Cda S, Pinheiro CG, Almeida TF, Freitas LA, Veras PS. IFN-gamma expression is up-regulated by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from non-exposed dogs upon *Leishmania chagasi* promastigote stimulation in vitro. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009 Feb 15;127(3-4):382-8.

Rosas LE, Snider HM, Barbi J, Satoskar AA, Lugo-Villarino G, Keiser T, Papenfuss T, Durbin JE, Radzioch D, Glimcher LH, Satoskar AR. Cutting Edge: STAT1 and T-bet play distinct roles in determining outcome of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. J. Immunol. 2006; 177:22-25.

Ross R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and further notes on Leishman bodies. Brit. Med. J. 1903; 2: 1261-1401.

Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. Annu Rev Immunol. 2000;18:217-42.

Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. Annu Rev Immunol. 2004;22:891-928.

Sallusto F, Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. Immunol Rev. 2000 Oct;177:134-40.

Sanchez MA, Diaz NL, Zerpa O, Negron E, Convit J, Tapia FJ. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. Am J Trop Med Hyg. 2004 Jun;70(6):618-24.

Sanchez-Robert E, Altet L, Alberola J, Rodriguez-Cortés A, Ojeda A, López-Fuertes L, Timon M, Sanchez A, Francino O. Longitudinal analysis of cytokine gene expression and parasite load in PBMC in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. Vet Immunol Immunopathol. 2008 Sep 15;125(1-2):168-75.

Santos-Gomes GM, Rosa R, Leandro C, Cortes S, Romão P, Silveira H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. Vet Immunol Immunopathol. 2002 Sep 6;88(1-2):21-30.

Sanz MJ, Marinova-Mutafchieva L, Green P, Lobb RR, Feldmann M, Nourshargh S. IL-4-induced eosinophil accumulation in rat skin is dependent on endogenous TNF-alpha and alpha 4 integrin/VCAM-1 adhesion pathways. J Immunol. 1998 Jun 1;160(11):5637-45.

Satoskar A, Bluethmann H, Alexander J. Disruption of the murine interleukin-4 gene inhibits disease progression during *Leishmania mexicana* infection but does not increase control of *Leishmania donovani* infection. *Infect. Immun.* 1995; 63:4894-4899.

Scharton TM, Scott P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4⁺ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J Exp Med.* 1993 Aug 1;178(2):567-77.

Silvestre R, Cordeiro-Da-Silva A, Santarém N, Vergnes B, Sereno D, Ouaiissi A. SIR2-deficient *Leishmania infantum* induces a defined IFN-gamma/IL-10 pattern that correlates with protection, *J. Immunol.* 2007; 179:3161-3170.

Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol.* 2000 Jun 10;90(1-2):37-45.

Solano-Gallego L, Riera C, Roura X, Iniesta L, Gallego M, Valladares JE, Fisa R, Castillejo S, Alberola J, Ferrer L, Arboix M, Portús M. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet Parasitol.* 2001 Apr 19;96(4):265-76.

Stauber LA. Leishmaniasis in the hamster. *In: W.H. Cole, Some physiological aspects and consequence of parasitism.* Rutgers Uni. Press, New Brunswick, N.J. 1955; 77-90.

Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN- γ production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 2002; 295:338-342.

Tafuri WL, de Oliveira MR, Melo MN, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol.* 2001 Apr 2;96(3):203-12.

Tafuri WL, Santos RL, Arantes RM, Gonçalves R, de Melo MN, Michalick MS, Tafuri WL. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods*. 2004 Sep;292(1-2):17-23.

Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity*. 2003 Nov; 19(5):641-4.

Tsagozis P, Karagouni E, Dotsika E. CD8(+) T cells with parasite-specific cytotoxic activity and a Tc1 profile of cytokine and chemokine secretion develop in experimental visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2003 Nov-Dec;25(11-12):569-79.

Valenzuela JG, Belkaid Y, Rowton E, Ribeiro JM. The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel Cimex family of apyrases. *J Exp Biol*. 2001 Jan;204(Pt 2):229-37.

Van Zandbergen G, Hermann N, Laufs H, Solbach W, Laskay T. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. *Infect Immun*. 2002 Aug;70(8):4177-84.

Van Zandbergen G, Gieffers J, Kothe H, Rupp J, Bollinger A, Aga E, Klinger M, Brade H, Dalhoff K, Maass M, Solbach W, Laskay T. *Chlamydia pneumoniae* multiply in neutrophil granulocytes and delay their spontaneous apoptosis. *J Immunol*. 2004 Feb 1;172(3):1768-76.

Villalta F, Zhang Y, Bibb KE, Kappes JC, Lima MF. The cysteine-cysteine family of chemokines RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta induce trypanocidal activity in human macrophages via nitric oxide. *Infect Immun*. 1998 Oct;66(10):4690-5.

Vital WC, Aguiar RO, Roatt BM, Marques MJ, Carvalho AT, Giunchetti RC, Oliveira RC, Filho OAM, Reis AB. New proposals to evaluate immunological biomarkers in asymptomatic canine visceral leishmaniasis Will contribute to understand the mechanisms of infection resistance and in the studies of the immunogenicity pf vaccines. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2009; 42: Suplemento I, p. 539

Vouldoukis I, Bécherel PA, Riveros-Moreno V, Arock M, da Silva O, Debré P, Mazier D, Mossalayi MD. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation, Eur. J. Immunol. 1997;27:860–865.

Watanabe Y, Hamaguchi-Tsuru E, Morimoto N, Nishio Y, Yagyu K, Konishi Y, Tominaga M, Miyazaki J, Furuya M, Tominaga A. IL-5-Induced Eosinophils Suppress the Growth of *Leishmania amazonensis* In Vivo and Kill Promastigotes In Vitro in Response to Either IL-4 or IFN-gamma. DNA Cell Biol. 2004 Jul;23(7):412-8.

Wilson ME, Young BM, Davidson BL, Mente KA, McGowan SE. The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis. J Immunol. 1998 Dec 1;161(11):6148-55.

World Health Organization. Leishmaniasis: background information. Geneva: WHO, [s.d.]. Disponível em: < <http://www.who.int/leishmaniasis> >. Acesso em: 28 Fevereiro de 2009.

Zaph C, Scott P. Interleukin-12 regulates chemokine gene expression during the early immune response to *Leishmania major*. Infect Immun. 2003 Mar;71(3):1587-9.

Zhang DH, Yang L, Ray A. Differential responsiveness of the IL-5 and IL-4 genes to transcription factor GATA-3. J Immunol. 1998 Oct 15;161(8):3817-21.

Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. Cell. 1997 May 16;89(4):587-96.

Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu TT, Gavin MA, Rudensky AY. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. Nature. 2007;445:936-940.

Zlotnik A & Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity. 2000 Feb;12(2):121-7.