

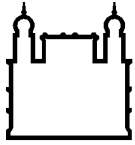
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Análise da resposta inflamatória em fígado e baço de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*

LEONARDO ALEXANDE DE SOUZA RUIVO

Rio de Janeiro, 24 de setembro de 2020.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

LEONARDO ALEXANDE DE SOUZA RUIVO

Análise da resposta inflamatória em fígado e baço de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Biologia Celular e Molecular.

Orientadores: Dr^a Fernanda Nazaré Morgado
Dr Renato Porrozzi de Almeida

RIO DE JANEIRO, 24 DE SETEMBRO DE 2020

Ruivo, Leonardo Alexandre de Souza.

Análise da resposta inflamatória em fígado e baço de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* / Leonardo Alexandre de Souza Ruivo. - Rio de Janeiro, 2020.

110 f.

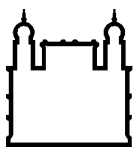
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2020.

Orientadora: Fernanda Nazaré Morgado.
Co-orientador: Renato Porrozzi de Almeida.

Bibliografia: f. 86-101

1. *Leishmania infantum*. 2. MAP4K4. 3. Cães. 4. Baço. 5. Fígado. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

LEONARDO ALEXANDE DE SOUZA RUIVO

Análise da resposta inflamatória em fígado e baço de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*

ORIENTADORES: Dr^a. Fernanda Nazaré Morgado
Dr. Renato Porrozzi de Almeida

Aprovada em:24/09/2020

EXAMINADORES:

Prof^a. Dra. Fátima Conceição-Silva - Presidente (Fiocruz)
Prof. Dr. Fabiano Borges Figueiredo (Fiocruz)
Prof. Dr. Fábio Alves Aguiar (Universidade Federal Fluminense)
Prof. Dr. Rodrigo Caldas Menezes (Fiocruz – Revisor e suplente)
Prof. Dr. Josue Lima Junior (Fiocruz - Suplente)

Rio de Janeiro, 24 de setembro de 2020.

Aos meus pais.
Em especial, minha mãe, meu eterno anjo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda força, energia boa, fagulha de vida que de alguma forma me permitiram não desistir e continuar até aqui, se o nome da chama que se mantém acesa foi Deus, que Ele continue a iluminar e a me mostrar qual o caminho certo a seguir.

Aos meus orientadores, Fernanda Morgado e Renato Porrozzi, não apenas por terem me acolhido no momento mais difícil do meu percurso no doutorado, mas também porque me fizeram não perder a fé em mim mesmo e acreditar que há humanidade, respeito e empatia na ciência, saibam que terão o meu eterno agradecimento por tudo.

Aos meus pais que mesmo a essa altura da vida, me permitiram parar e tentar aquilo que não parecia ser possível, saibam que aqui não estaria se não fosse pelo apoio de vocês.

Ao Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose que me recebeu de braços abertos no meio do meu percurso e me acolheram como se lá tivesse trabalhado desde a iniciação científica. A todos os pesquisadores, técnicos, bolsistas e estudantes do LPL, o meu muito obrigado. Um agradecimento especial para esse grupo que se tornou uma família: Aurea Virgínia, Tainã, Francine e Érika.

À Dra. Luiza do Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose que muito me ajudou e contribuiu no ensinamento e análise dos meus dados moleculares.

Às pessoas que me acompanharam desde o mestrado e sempre acreditaram ser possível eu chegar até aqui: Rhaissa Calixto, Priscila Farani, Cássia Rocha.

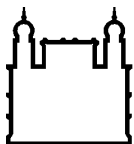
A todo o grupo do Tricô 40º que esteve ao meu lado em todos os momentos, em especial à Lílian Sant'Anna que nunca se esqueceu de mim nos meus momentos de ausência. Também, o meu carinho e obrigado a única pessoa que conseguia levantar o meu humor e me dar um abraço, quando ninguém mais conseguia, Verônica.

Aos amigos de infância e que não são do meio científico, mas que foram de vital importância para fazer a vida ser mais leve e normal: Bárbara Motta minha irmã de muitas vidas e alma. Também a Kátia Regina, Ana Nunes, Priscila Cavalcanti, Bruno Oliveira e Eduardo e Ana Paula Santana. Ao meu namorado, companheiro e amigo, Geovane, por aturar meus rompantes de tristeza e mau-humor, que não foram poucos, obrigado por estar comigo até hoje e não ter desistido de mim quando eu mesmo quis.

Por fim, agradeço as agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERJ que possibilitaram que eu chegasse até aqui, além da oportunidade de estudar e crescer como pessoa e profissional nessa instituição centenária que é a Fiocruz com toda a infraestrutura, profissionais de apoio, limpeza, segurança, enfim, a todos os que não foram citados, mas compõem a realidade do nosso dia a dia e fazem tudo isso ser possível, o meu muito obrigado.

Knit on, with confidence and hope,
through all crises.

Elizabeth Zimmermann



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

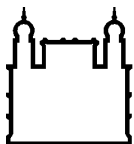
Análise da resposta inflamatória em fígado de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*: estudo comparativo com o baço

LEONARDO ALEXANDE DE SOUZA RUIVO

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença complexa e os sinais clínicos no cão se apresentam de forma muito semelhante aos que ocorrem em humanos. Entre os órgãos afetados pela LV o fígado e o baço aparentam ser afetados em diferentes tempos e com respostas imune e evolução clínica diferenciada. A via de sinalização da MAP4K4 está relacionada a mau prognóstico em diversas patologias além de ser responsável pela ativação, migração, proliferação e apoptose celular. Além disso, MAP4K4 está envolvida na produção de $TNF\alpha$ e dano tecidual. O presente trabalho tem como objetivo avaliar o escore clínico de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*, a carga parasitária dos animais e a organização do baço correlacionando esses dados com o perfil inflamatório em fígado e baço de cães por meio da expressão gênica e proteica de MAP4K4 e $TNF\alpha$ e expressão gênica de $IFN\gamma$, IL-10, CXCL-8 e CCL-2, além de analisar a presença ou não de dano tecidual nesses tecidos por meio da observação de alterações histológicas e deposição de laminina e fibronectina em baço e fígado e das enzimas hepáticas séricas. Após a separação dos grupos entre as diferentes organizações do baço e a carga parasitária dos animais e pelo escore clínico, não identificamos diferenças entre os diversos marcadores quando separados pela carga parasitária tanto em baço quanto em fígado. MAP4K4 e $TNF\alpha$ encontraram-se intimamente associadas a reações granulomatosas e a macrófagos hepáticos. Dano tecidual foi observado em baço e fígado através do aumento da deposição de fibronectina em animais com alto escore clínico. A expressão gênica de CXCL-8 se manteve relativamente constante em todos os grupos analisados e CCL-2 encontrou-se aumentada nos animais com baço desorganizado e alta carga (DAC) e em animais com médio escore clínico. Não foram observadas alterações, entre os grupos analisados, nas expressões de $IFN\gamma$ e IL-10 em baço e fígado dos animais. Observamos que a expressão gênica de $TNF\alpha$ estava aumentada em animais DAC, no fígado, quando comparados a animais com baço organizado e baixa carga (OBC) e no baço de animais que apresentaram médio escore clínico quando com parados a animais com baixo e alto escore. Além disso, MAP4K4 teve sua expressão aumentada no fígado de animais com baixo escore clínico quando comparados a animais de alto escore, esse aumento também foi observado no baço de animais OBC e DAC quando comparados a animais com baço desorganizado e baixa carga (DBC). O aumento da expressão gênica de MAP4K4 nos estágios iniciais da doença e a sua relação com áreas de reação granulomatosa sugerem que esta via de sinalização pode estar relacionada com a exacerbação inespecífica da resposta imune e da injúria tecidual, porém sem impactar na carga parasitária.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Analysis of the inflammatory response in the liver of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: a comparative study with the spleen

LEONARDO ALEXANDRE DE SOUZA RUIVO
ABSTRACT

PhD THESIS IN PARASITE BIOLOGY

Visceral Leishmaniasis (VL) is a complex disease and the clinical signs in the dog appear very similar to those that occur in humans. Among the organs affected by VL, the liver and spleen appear to be affected at different times and with different immune responses and clinical evolution. The MAP4K4 signaling pathway is related to poor prognosis in several pathologies in addition to being responsible for cell activation, migration, proliferation and apoptosis. In addition, MAP4K4 is involved in the production of TNF α and tissue damage. The present work aims to evaluate the clinical score of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*, the parasitic load of the animals and the organization of the spleen correlating these data with the inflammatory profile in the liver and spleen of dogs through the MAP4K4 gene and protein expression. and TNF α and gene expression of IFN γ , IL-10, CXCL-8 and CCL-2, in addition to analyzing the presence or absence of tissue damage in these tissues by observing histological changes and deposition of laminin and fibronectin in the spleen and liver and of serum liver enzymes. After separating the groups between the different spleen organizations and the parasitic load of the animals and the clinical score, we did not identify differences between the different markers when separated by the parasitic load in both the spleen and the liver. MAP4K4 and TNF α were found to be strongly associated with granulomatous reactions and hepatic macrophages. Tissue damage was observed in the spleen and liver by increasing the deposition of fibronectin in animals with a high clinical score. The gene expression of CXCL-8 remained relatively constant in all groups analyzed and CCL-2 was found to be increased in animals with disorganized spleen and high load (DS-HG) and in animals with a medium clinical score. There were no changes, between the groups analyzed, in the expressions of IFN γ and IL-10 in the spleen and liver of the animals. We observed that the gene expression of TNF α was increased in DS-HG animals, in the liver, when compared to animals with organized spleen and low load (OR-LW) and in the spleen of animals that presented medium clinical score when compared to animals with low and high score. In addition, MAP4K4 had its expression increased in the liver of animals with low clinical score when compared to animals with high score, this increase was also observed in the spleen of animals OR-LW and DS-HG when compared to animals with disorganized spleen and low load (DS-LW). The increase in MAP4K4 gene expression in the early stages of the disease and its relationship with areas of granulomatous reaction suggest that this signaling pathway may be related to the non-specific exacerbation of the immune response and tissue injury, but without impacting the parasitic burden.

Sumário

ÍNDICE DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS E QUADROS	XVIII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XIX
1. REVISÃO DE LITERATURA	20
2. LEISHMANIOSE	20
2.1. LEISHMANIOSE CANINA E HUMANA: EVOLUÇÃO E HISTÓRICO	20
2.2. EPIDEMIOLOGIA E (IMPORTÂNCIA DO CÃO NO CONTROLE EPIDEMIOLÓGICO).....	22
2.4. IMUNOPATOGENIA DA LEISHMANIOSE	25
2.5. QUIMIOCINAS CCL-2 E CXCL-8	27
2.6. FÍGADO E BAÇO DURANTE A INFECÇÃO PELA LEISHMANIOSE.....	30
2.7. AS MAPQUINASES E A MAP4K4	32
3. HIPÓTESE	36
4. OBJETIVO GERAL	36
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5.1. AMOSTRAS	37
5.2. AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS CÃES E COLETA DE AMOSTRAS	37
5.3. ASPECTOS ÉTICOS.....	38
5.4. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	38
5.5. IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	39
5.6. IMUNOFLUORESCÊNCIA	40
5.8. DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA POR qPCR	41
5.10. EXTRAÇÃO DO RNA E QUANTIFICAÇÃO DE MAP4K4 E CITOCINAS EM BAÇO E FÍGADO POR qRT-PCR	42
5.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
6. RESULTADOS	45
6.1. AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS SEGUNDO O ESCORE CLÍNICO.....	45
6.2. SEPARAÇÃO DOS GRUPOS ENTRE ÓRGÃOS PELA CARGA PARASITÁRIA	45
6.3. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E CLASSIFICAÇÃO DOS GRANULOMAS HEPÁTICOS E ORGANIZAÇÃO ESPLÊNICA POR MICROSCOPIA ÓPTICA.....	51
6.4. ANÁLISE DOS MARCADORES DE DANO TECIDUAL ATRAVÉS DAS ENZIMAS HEPÁTICAS	54
6.5. ANÁLISE DOS MARCADORES FENOTÍPICOS E FUNCIONAIS POR IMUNO-HISTOQUÍMICA E IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	56
6.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MOLÉCULAS INFLAMATÓRIAS EM FÍGADO E BAÇO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR <i>Leishmania infantum</i>	64
7. DISCUSSÃO	72
9. REFERÊNCIAS	86
10. FIGURAS SUPLEMENTARES	102
11. ANEXOS	107
11.1. RELAÇÃO ANIMAIS → ORG. BAÇO / ESCORE CLÍNICO / CARGA FÍGADO-BAÇO	107

11.2.	LICENÇA CEUA.....	108
11.3.	DECLARAÇÃO CEUA.....	109
11.4.	CERTIDÃO – CADASTRO Nº AFB4BD9.....	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01	Status da endemidade da leishmaniose visceral humana no mundo.....	22
Figura 02	Número de casos de leishmaniose visceral nos países da América do Sul com maior prevalência, 2001 -2017 (OMS, 2019).....	23
Figura 03	Figura 03: Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp. em vertebrados e invertebrados – Adaptado (Anversa et al., 2018).....	25
Figura 04	Esquema de sinalização das MAPquinases (adaptado) (Morrison, 2012).....	33
Figura 05	Esquema de sinalização da MAP4K4 (adaptado) (Morrison, 2012).....	34
Figura 06	Figura 06: Percentual de sinais clínicos de cães infectados naturalmente com <i>Leishmania infantum</i>. 41 animais foram incluídos neste estudo. Ceratoconjuntivite: 23,5%; Linfadenopatia: .23,6%; Alopecia: 38,2%; Perda de peso: 41,2%; Dermatite: 67,6%; Onicogrifose: 79,4.....	45
Figura 07	Figura 07: Quantificação da carga parasitária em amostras de fígado e baço de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i>. A quantificação foi realizada utilizando PCR em tempo real com primers específicos para sequência de DNA da menor subunidade ribossomal (ssrRNA). O gene constitutivo canino HPRT foi utilizado para normalizar as concentrações iniciais de cada amostra. A e B. Histograma de barras representando as classes de animais que pertenciam a uma mesma faixa de carga parasitária e curva normal da densidade de <i>L. infantum</i> de animais classificados como baixa carga (Low, n = 29 para o fígado e n = 32 para o baço) linha azul e animais classificados como alta carga (High, n = 12 para o fígado e n = 9 para o baço) linha vermelha. Tabelas indicam mínimo, máximo e média de parasitos por 10 ⁶ células caninas.....	47
Figura 08	Figura 08: Carga molecular parasitária do fígado e do baço de cães infectados naturalmente com <i>Leishmania infantum</i>. PCR em tempo real do gene ssrRNA de <i>Leishmania</i> sp. A. Pontos ligando diferenças de carga parasitárias entre fígado e baço no indivíduo. B. Pontos ligando diferenças de carga parasitárias entre fígado e baço no indivíduo, separados por grupo de evolução clínica. Concentração inicial de DNA normalizada pelo gene HPRT. (***) p < 0,0001. Teste de Wilcoxon.....	49
Figura 09	Figura 09: Carga molecular parasitária do fígado e do baço de cães infectados naturalmente com <i>Leishmania infantum</i>. A. Carga parasitária em fígado e baço, número de cópias do parasito (Log ₁₀) em 10 ⁶ células. B. Classificação da carga parasitária de acordo com a classificação clínica. B. Classificação da carga parasitária do fígado e do baço de acordo com a organização do baço. (**) p < 0,01 e (*) p < 0,05. ANOVA, Kruskal-Wallis test com teste de Dunn para comparações múltiplas. Teste Mann-Whitney para 2 grupos.....	50

Figura 10	Figura 10: Fotomicrografias mostrando cortes histológicos de baço de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> mostrando diferentes níveis de desorganização da polpa branca. A. Polpa branca organizada de animal com baixa carga parasitária; B. Polpa branca desorganizada de animal com baixa carga parasitária; C. Polpa branca desorganizada de animal com alta carga parasitária. A-C. Aumento 200X; C. Imagens representativas.....	51
Figura 11	Figura 11: Fotomicrografias mostrando cortes histológicos de fígados de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> mostrando diferentes níveis de maturação de granulomas. A e B. Fotos representativas de granulomas em tecido hepático em aumento 400X; C. Foto representativa que de granuloma em tecido hepático em aumento 1000X. Imagens representativas...	51
Figura 12	Figura 12: Fotomicrografias mostrando diferentes alterações histopatológicas observadas nos fígados de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>. A. Infiltrado inflamatório periportal, aumento 200X; B. Infiltrado inflamatório perivascular; C. Degeneração vacuolar de hepatócitos; D. Congestão; E. Deposição de colágeno no parênquima hepático, coloração de vermelho de Picrosírius. A. Aumento de 200X; B-F. Aumento de 400X. Imagens representativas.....	52
Figura 13	Figura 13: Representação gráfica da quantidade de células por granuloma e de granulomas por milímetros quadrados. A. Quantidade de células por granuloma entre animais com baço organizado e baixa carga (OBC) e desorganizado e baixa (DBC) ou alta carga parasitária (DAC); B. Quantidade de granulomas por mm ² em animais com baixo, médio e alto escore clínico. (*) p < 0,05. ANOVA, Kruskal-Wallis test com teste de Dunn para comparações múltiplas.....	53
Figura 14	Figura 14: Níveis séricos das transaminases: U/L: Unidades por litro; Valores de referência: ALT: 18 – 86; FA: 12 – 121; GGT: 2,0 - 10. (OBC) organizado e baixa carga, (DBC) desorganizado e baixa carga, (DAC) desorganizado e alta carga. A. Alanina-aminotransferase (ALT); B. Fosfatase Alcalina (FA); C. Gama Glutamil Transpeptidase (GGT). ANOVA, Kruskal-Wallis test com teste de Dunn para comparações múltiplas.....	55
Figura 15	Figura 15: Fotomicrografias mostrando cortes histológicos de fígados de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>. A e B mostrando controle negativo e marcação para laminina respectivamente, aumento 400X; C e D mostrando controle negativo e marcação para fibronectina respectivamente, aumento 400X. Imagens representativas.....	56
Figura 16	Figura 16: Fotomicrografias mostrando cortes histológicos de baço de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>. A e B mostrando controle negativo e marcação para laminina respectivamente, aumento 400X; C e D mostrando controle negativo e marcação para fibronectina respectivamente, aumento 400X. Imagens representativas.....	57

- Figura 17** **Figura 17: Representação gráfica do percentual de área marcada para laminina e fibronectina nos diferentes grupos de acordo com o escore clínico.** (OBC) organizado e baixa carga, (DBC) desorganizado e baixa carga, (DAC) desorganizado e alta carga. A. Percentual de área de deposição de laminina, e B. fibronectina nos grupos de acordo com diferentes escores clínicos: baixo (escore 0 a 2), médio (escore 3 a 7) e alto (escore 8 em diante). Média da área marcada de 5 campos diferentes de cada animal. (**) $p < 0,01$. ANOVA, Kruskal-Wallis test com teste de Dunn para comparações múltiplas... **58**
- Figura 18** **Figura 18: Fotomicrografias mostrando cortes histológicos de fígados e baço de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.** A e B mostrando controle negativo e marcação para $TNF\alpha$ em fígado respectivamente. C e D mostrando controle negativo e marcação para $TNF\alpha$ em baço respectivamente. Aumento 400X. Imagens representativas..... **59**
- Figura 19** **Figura 19: Representação gráfica do percentual de área marcada para $TNF\alpha$ em fígado e baço.** A. Percentual de área marcada para $TNF\alpha$ entre regiões de parênquima e áreas de reação granulomatosa. B. Percentual de área marcada para $TNF\alpha$ em fígado e baço entre animais com baço organizado e baixa carga (OBC), desorganizado e baixa carga (DBC) e desorganizado e alta carga (DAC). C. Percentual de área marcada para $TNF\alpha$ entre animais com baixo, médio e alto escore clínico. Média do percentual de área marcada de 5 campos diferentes de cada animal. (*) $p < 0,05$. Teste Mann Whitney para 2 grupos. ANOVA, Kruskal-Wallis test com teste de Dunn para comparações múltiplas..... **60**
- Figura 20** **Figura 20: Fotomicrografias mostrando a expressão de MAP4K4 em cortes histológicos de fígados de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.** A e B mostrando controle negativo e marcação para MAP4K4 respectivamente em parênquima, aumento 400X; C e D mostrando controle negativo e marcação para MAP4K4, em área de reação granulomatosa respectivamente, as setas marcam locais de reação positiva para MAP4K4. Aumento 400X. Imagens representativas..... **61**
- Figura 21** **Figura 21: Representação gráfica do percentual de área marcada para MAP4K4 em fígado de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*.** A. Percentual de área marcada para MAP4K4 entre regiões de parênquima e áreas de reação granulomatosa. B. Percentual de área marcada para MAP4K4 entre animais com baixo, médio e alto escore clínico C. Percentual de área marcada para MAP4K4 entre animais com baço organizado e baixa carga (OBC), desorganizado e baixa carga (DBC) e desorganizado e alta carga (DAC). Média do percentual de área marcada de 5 campos diferentes de cada animal. (****) $p < 0,001$. Teste Mann-Whitney para 2 grupos. ANOVA, Kruskal-Wallis test com teste de Dunn para comparações múltiplas..... **62**
- Figura 22** **Figura 22: Identificação por imunofluorescência da presença de MAP4K4, $TNF\alpha$ e macrófagos em fígado de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*.** Macrófagos+ marcados em vermelho (PE), MAP4K4 e $TNF\alpha$ marcados em verde (FITC) e núcleos celulares marcados em azul (DAPI). Merge marca a sobreposição de imagens, mostrando MAP4K4 e $TNF\alpha$ associados à marcação de macrófago..... **63**

- Figura 23** **Figura 23: Expressão gênica normalizada de CCL-2 do fígado de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*.** Análise *ex-vivo* por qPCR dos níveis de mRNA do fígado e baço de cães classificados de acordo com a organização e carga parasitária do baço e o escore clínico. A e C expressão normalizada de CCL-2 em fígado separados pela organização do baço e escore clínico respectivamente. B e D expressão normalizada de CCL-2 em baço separados pela organização do baço e escore clínico respectivamente. Valores de expressão normalizados para os genes constitutivos HPRT e GAPDH. (*) p <0,05; (**) p <0,01. ANOVA, Kruskal-Wallis test com teste de Dunn para comparações múltiplas. Teste Mann-Whitney para dois grupos..... **64**
- Figura 24** **Figura 24: Expressão gênica normalizada de CXCL-8 no fígado de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*.** Análise *ex-vivo* por qPCR dos níveis de mRNA do fígado e baço de cães classificados de acordo com a organização e carga parasitária do baço e o escore clínico. A e C expressão normalizada de CXCL-8 em fígado separados pela organização do baço e escore clínico respectivamente. B e D expressão normalizada de CXCL-8 em baço separados pela organização do baço e escore clínico respectivamente. Valores de expressão normalizados para os genes constitutivos HPRT e GAPDH. (*) p <0,05; (**) p <0,01, ANOVA, Kruskal-Wallis test com teste de Dunn para comparações múltiplas. Teste Mann-Whitney para dois grupos..... **65**
- Figura 25** **Figura 25: Expressão gênica de IL-10 e IFN γ no fígado e no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum*.** Análise *ex-vivo* por qPCR dos níveis de mRNA do fígado e baço de cães classificados de acordo com a organização e carga parasitária do baço e o escore clínico. A e C expressão normalizada de IL-10 em fígado separados pela organização do baço e escore clínico respectivamente. B e D expressão normalizada de IL-10 em baço separados pela organização do baço e escore clínico respectivamente. E e G expressão normalizada de IFN γ em fígado separados pela organização do baço e escore clínico respectivamente. F e G expressão normalizada de IFN γ em baço separados pela organização do baço e escore clínico respectivamente. Valores de expressão normalizados para os genes constitutivos HPRT e GAPDH. ANOVA, Kruskal-Wallis test com teste de Dunn para comparações múltiplas. Teste Mann-Whitney para dois grupos..... **67**
- Figura 26** **Figura 26: Expressão gênica da TNF α no fígado e no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum*.** Análise *ex-vivo* por qPCR dos níveis de mRNA do fígado e baço de cães classificados de acordo com a organização e carga parasitária do baço e o escore clínico. A e C expressão normalizada de TNF α em fígado separados pela organização do baço e escore clínico respectivamente. B e D expressão normalizada de TNF α em baço separados pela organização do baço e escore clínico respectivamente. Valores de expressão normalizados para os genes constitutivos HPRT e GAPDH. (*) p <0,05. ANOVA, Kruskal-Wallis test com teste de Dunn para comparações múltiplas. Teste Mann-Whitney para dois grupos..... **68**

Figura 27	Figura 27: Expressão gênica da MAP4K4 no fígado e no baço de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i>. Análise <i>ex-vivo</i> por qPCR dos níveis de mRNA do fígado de cães classificados de acordo com o escore clínico. A e C expressão normalizada de MAP4K4 em fígado separados pela organização do baço e escore clínico respectivamente. B e D expressão normalizada de MAP4K4 em baço separados pela organização do baço e escore clínico respectivamente. Valores de expressão normalizados para os genes constitutivos HPRT e GAPDH. (*) $p < 0,05$. ANOVA, Kruskal-Wallis test com teste de Dunn para comparações múltiplas. Teste Mean-Whitney para dois grupos.....	69
Figura Suplementar 01	Figura Suplementar 01: Representação gráfica da quantidade de células por granuloma e de granulomas por milímetros quadrados no fígado de animais naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i>. A. Quantidade de células por granuloma separados pela carga parasitária do fígado. B. Quantidade de granulomas por milímetros quadrados separados pela carga parasitária do fígado. Teste Mann-Whitney para 2 grupos.....	102
Figura Suplementar 02	Figura Suplementar 02: Níveis séricos das transaminases separados pela carga parasitária do fígado: U/L: Unidades por litro; Valores de referência: ALT: 18 – 86; FA: 12 – 121; GGT: 2,0 - 10. A. Alanina Aminotransferase (ALT); B. Fosfatase Alcalina (FA); C. Gama Glutamil Aminotransferase (GGT). Teste Mann-Whitney para 2 grupos.....	102
Figura Suplementar 03	Figura Suplementar 03: Representação gráfica do percentual de área marcada para laminina e fibronectina separados pela carga parasitária de seu respectivo órgão. A. Percentual de área de deposição de laminina em fígado, B. Percentual de área de deposição de fibronectina em fígado. C. Percentual de área de deposição de laminina em baço. D. Percentual de área de deposição de laminina em baço. Média da área marcada de 5 campos diferentes de cada animal. Teste Mann-Whitney para 2 grupos.....	103
Figura Suplementar 04	Figura Suplementar 04: Representação gráfica do percentual de área marcada para TNFα em fígado e baço. A. Percentual de área marcada para TNF α em fígado. B. Percentual de área marcada para TNF α em baço. Média do percentual de área marcada de 5 campos diferentes de cada animal. Teste Mann-Whitney para 2 grupos.....	103
Figura Suplementar 05	Figura Suplementar 05: Representação gráfica do percentual de área marcada para MAP4K4 em fígado de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i>. Percentual de área marcada para MAP4K4 separados pela carga parasitária em fígado. Teste Mann-Whitney para 2 grupos.....	104

**Figura
Suplementar 06**

Figura suplementar 06: Expressão gênica normalizada de CCL-2, IFN γ , CXCL-8, TNF α , IL-10 e MAP4K4 no fígado de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*.

Análise *ex-vivo* por qPCR dos níveis de mRNA do fígado e baço de cães classificados de acordo com carga parasitária do fígado. A. expressão normalizada de CCL-2 em fígado separados pela carga parasitária do fígado. B. expressão normalizada de IFN γ em fígado separados pela carga parasitária do fígado. C. expressão normalizada de CXCL-8 em fígado separados pela carga parasitária do fígado. D. expressão normalizada de TNF α em fígado separados pela carga parasitária do fígado. E. expressão normalizada de IL-10 em fígado separados pela carga parasitária do fígado. F. expressão normalizada de MAP4K4 em fígado separados pela carga parasitária do fígado. Valores de expressão normalizados para os genes constitutivos HPRT e GAPDH. Teste Mann-Whitney para dois grupos.....

105

**Figura
Suplementar 07**

Figura suplementar 07: Expressão gênica normalizada de CCL-2, IFN γ , CXCL-8, TNF α , IL-10 e MAP4K4 no baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*.

Análise *ex-vivo* por qPCR dos níveis de mRNA do fígado e baço de cães classificados de acordo com carga parasitária do fígado. A. expressão normalizada de CCL-2 em baço separados pela carga parasitária do baço. B. expressão normalizada de IFN γ em baço separados pela carga parasitária do baço. C. expressão normalizada de CXCL-8 em baço separados pela carga parasitária do baço. D. expressão normalizada de TNF α em baço separados pela carga parasitária do baço. E. expressão normalizada de IL-10 em baço separados pela carga parasitária do baço. F. expressão normalizada de MAP4K4 em baço separados pela carga parasitária do baço. Valores de expressão normalizados para os genes constitutivos HPRT e GAPDH. Teste Mann-Whitney para dois grupos.....

106

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 01	Anticorpos utilizados para marcação dos alvos de interesse em imunohistoquímica.....	40
Tabela 02	Anticorpos utilizados para marcação dos alvos de interesse em imunofluorescência.....	41
Tabela 03	Genes alvos e respectivas sequências utilizados na quantificação da carga parasitária. S, senso; AS, anti-senso.....	42
Tabela 04	Genes alvos e desenho dos iniciadores para cDNA. S, senso; AS, anti-senso.....	43
Quadro 01	Resumo de resultados sinais clínicos e histologia.....	70
Quadro 02	Resumo de resultados da expressão gênica.....	71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i>
<i>L. donovani</i>	<i>Leishmania donovani</i>
<i>L. major</i>	<i>Leishmania major</i>
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
OMS	Organização Mundial da Saúde
BALB/c	Camundongos isogênicos (inbred) utilizados principalmente em imunologia, produção de anticorpo monoclonal, farmacologia e toxicologia.
J _h D BALB/c	Camundongo BALB/c deficiente na produção de células B
MAP4K4	Proteína (quinase, quinase, quinase, quinase) ativada por mitose do inglês: Mitogen Activated Protein kinase kinase kinase kinase
IL	Interleucina
IFN _γ	Interferon gama
TNF _α	Fator de necrose tumoral alfa, do inglês: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TGF _β	Fator de transformação de crescimento beta, do inglês: Transforming Growth Factor
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
C	Cisteína
CC	Cisteína justaposta a outra cisteína
CXC	Duas cisteínas separadas por um aminoácido
C ₃ XC	Três cisteínas separadas de uma cisteína por um aminoácido
CCL-2	Ligante de cisteína justaposta a outra cisteína 2
CXCL-8	Ligante de duas cisteínas separadas por um aminoácido 8
NH ₂	Terminal amino
L	Ligante
R	Receptor
OBC	Animais com baço organizado e baixa carga
DBC	Animais com baço desorganizado e baixa carga
DAC	Animais com baço desorganizado e alta carga

1. REVISÃO DE LITERATURA

2. Leishmaniose

2.1. Leishmaniose canina e humana: evolução e histórico

Embora os estudos de identificação e classificação das leishmanias tenham começado recentemente na história da humanidade, entre o final do século IX e o início do século X, não é surpresa supor que organismos ancestrais do gênero *Leishmania* sp. já circulassem pelo globo desde períodos pré-históricos (Steverding, 2017). Formas promastigotas, paramastigotas e amastigotas de espécies “*leishmania-like*” foram encontradas misturadas ao sangue de répteis localizado no aparelho bucal de flebótomos, conservados em âmbar, que datavam de mais de 100 milhões de anos (G. Poinar, 2004; G. J. Poinar & Poinar, 2004a; G. Poinar & Poinar, 2004b). A evolução das diferentes espécies desse parasito em paralelo com a evolução de hospedeiros invertebrados e vertebrados nos faz ter um panorama das dificuldades encontradas hoje para chegar à cura de uma doença causada por um patógeno com milênios de adaptação.

Assim como agentes patogênicos têm evoluído e se adaptado às diferentes espécies, em especial ao ser humano, o cão também tem uma história evolutiva de aproximação e cooperação com homínídeos que remontam de milhares de anos (Price, 1984; Wang et al., 2013). Essa aproximação foi crucial para que, em determinado momento na linha do tempo, o cão se tornasse hospedeiro e/ou reservatório de doenças que acometem o ser humano moderno (Takashima & Day, 2014). Embora a forma cutânea da leishmaniose já tivesse sido descrita pelos Persas em manuscritos do século X, a forma visceral que por muito tempo foi confundida com a malária, apenas foi descrita como uma nova doença no início do século XIX por William Twining, que publicou um artigo descrevendo pacientes apresentando caquexia, esplenomegalia e febre intermitente, em Bengal na Índia Gibson (1983; apud Steverding, 2017).

A leishmaniose visceral foi chamada inicialmente de “febre de Burdwan” (*Burdwan fever*), por ocasião de uma epidemia de febre que ocorreu na cidade de Burdwan no estado de Bengal na Índia, no início da década de 1860, e também foi chamada de

Kala-Azar devido a descoloração da pele dos pacientes no decorrer da infecção. Em 1900, após, quase um século depois dessas primeiras descrições, William Boog Leishman e Charles Donovan descreveram em um curto espaço de tempo entre publicações, formas ovoides encontradas em material *post-mortem* e em pacientes que apresentavam febre e esplenomegalia Gibson (1983; apud Steverding, 2017). A partir daí, não demorou muito para que formas semelhantes também fossem encontradas e descritas, o que ocorreu em 1908, pela primeira vez em cão (Nicolle & Comte, 1908). A doença foi denominada leishmaniose visceral, porque embora possa cursar com manifestações cutâneas em uma recidiva da doença, sendo também chamada de *post-Kala-Azar*, os principais órgãos afetados são o baço, o fígado e medula óssea (Kumar & Nylén, 2012; Mukhopadhyay et al., 2014)

No Brasil, o primeiro caso de leishmaniose visceral (LV) somente foi reportado na década de 30. Embora as espécies causadoras da LV conhecidas até aquele momento fossem a *Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania (Leishmania) infantum*, a impossibilidade de reproduzir a infecção experimental em cão, já descrita no Velho Mundo, fez com o que os autores descrevessem um novo gênero na América Latina denominando-a *Leishmania (Leishmania) chagasi (L. (L.) chagasi)* (Silveira & Corbett, 2010; Steverding, 2017). Contudo, pouco tempo depois, outro grupo conseguiu reproduzir os experimentos de infecção em animais e por meio de observações chegaram à conclusão de que se tratava da mesma espécie já descrita: a *Leishmania infantum* (Silveira & Corbett, 2010; Steverding, 2017). Cerca de cinquenta anos se passaram até que com o auxílio de técnicas moleculares pôde-se confirmar que a espécie circulante na América do Sul se tratava, de fato, da *L. infantum* (Steverding, 2017). Hoje, no Velho Mundo, temos duas espécies de *Leishmania* identificadas como causadoras da LV, a forma mais grave da doença. Na Índia e África oriental, a espécie identificada é *L. donovani*, que é transmitida entre seres humanos. Em países europeus do Mediterrâneo, África e Ásia, ocorre a espécie *L. infantum*. No Novo Mundo, incluindo o Brasil, a espécie circulante é a *L. infantum* e apesar de maiores estudos serem necessários, o cão ainda é considerado o principal reservatório da doença (Dantas-torres, 2007; Melo et al., 2016).

2.2. Epidemiologia e (importância do cão no controle epidemiológico)

Transmitida entre mamíferos por meio de um inseto vetor, da subfamília *Phlebotominae*, pertencentes a família *Psychodidae*, a leishmaniose possui diversas formas de manifestações clínicas: cutânea, muco-cutânea e visceral (Gramiccia & Gradoni, 2005; Shimabukuro & Galati, 2011). O ciclo de transmissão da LV pode ocorrer em ambientes silvestres onde os reservatórios são, principalmente, espécies de canídeos, marsupiais e pequenos roedores. Porém, é no ambiente doméstico, seja ele urbano ou rural, onde o maior número de casos da LV acontecem e, nesse contexto, o cão é considerado o principal animal reservatório (Cerqueira et al., 2014; Marcondes & Day, 2019; Ribeiro, Michalick, et al., 2018).

Atualmente, as leishmanioses estão presentes em cerca de 98 países distribuídos nos 5 continentes, principalmente em países subdesenvolvidos, onde as políticas públicas de saúde são precárias (Marcondes & Day, 2019; Ribeiro, Michalick, et al., 2018). Quando falamos mais especificamente da LV, é a segunda doença parasitária que mais causa mortes no mundo, sendo endêmica em 12 países. Entre 2001 e 2017 foram registrados nas Américas 59.769 novos casos totais com média de 3.516 ao ano, sendo deste total cerca de 96% dos casos provenientes do Brasil, com mais de cinquenta mil mortes ao ano (Figura 01) (Bi et al., 2018; OMS, 2019).

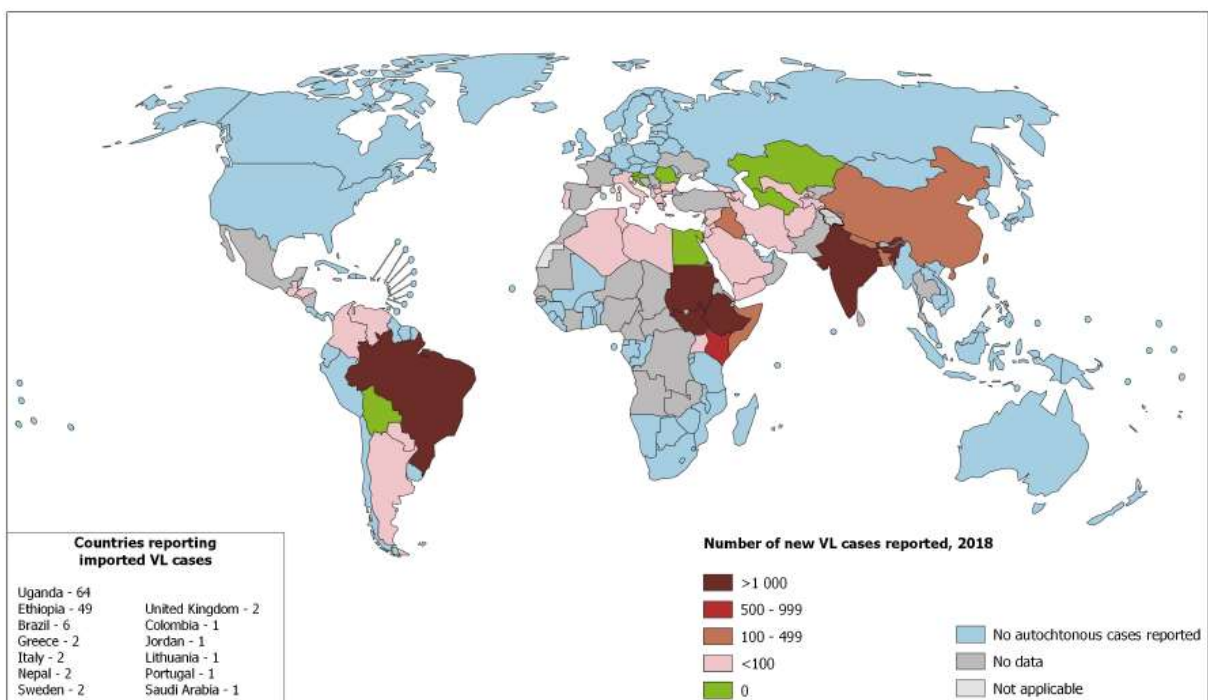


Figura 01: Status da endemidade da leishmaniose visceral humana no mundo (OMS, 2019)

Apesar de a OMS ter registrado uma diminuição do número de casos de LV, desde 2010 ao redor do mundo, muitos países não possuem um sistema de notificações confiável, levando a supor que estes números possam estar aquém da realidade (Bi et al., 2018). Até 2017, o Brasil tem registrado média superior à dos demais países da América Latina em números de casos de LV (Figura 02). Embora diversas medidas de controle sejam sugeridas pela literatura como controle de vetores e eutanásia de cães positivos, nenhuma delas ainda se mostrou totalmente eficaz (Nunes et al., 2018; Werneck, 2014).

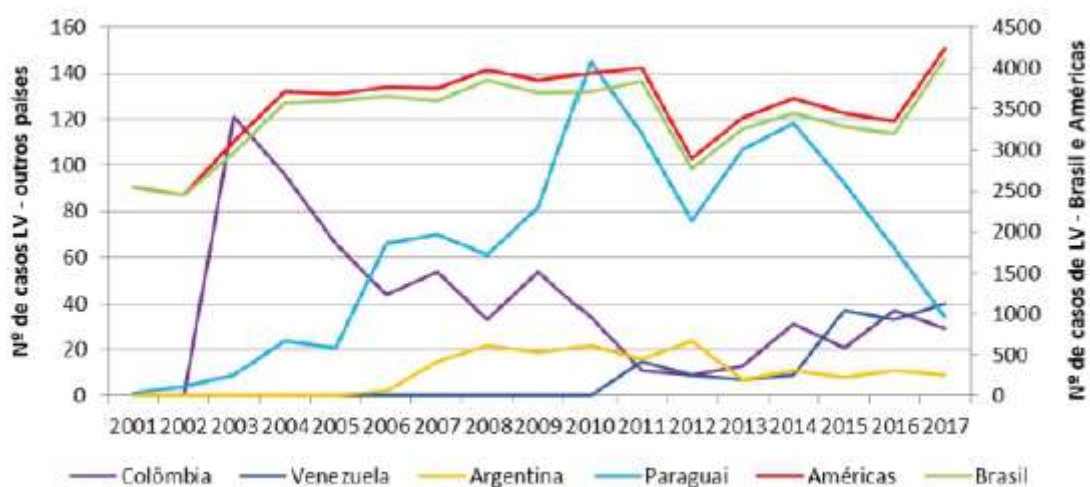


Figura 02: Número de casos de leishmaniose visceral nos países da América do Sul com maior prevalência, 2001 -2017 (OMS, 2019)

A histórica evolução do cão junto ao ser humano fez com que o cão passasse de instrumento de sobrevivência, auxiliando na caça e proteção, a animal de companhia, sendo considerado um membro da família nos dias atuais (Clutton-Brock & Flood, 2001). Hoje, o cão é considerado o animal doméstico que obteve o maior sucesso em aproximação com o ser humano e esse estreitamento social trouxe consigo o aparecimento de patógenos que completam seu ciclo de vida em ambas as espécies (Clutton-Brock & Flood, 2001; Schirmer et al., 2013). Estima-se que até 2013 existiam aproximadamente 700 milhões de cães ao redor do mundo e destes, cerca de 75% estão em condições de vulnerabilidade. Só no Brasil, este número chega a quase 53 milhões de cães, ficando em segundo lugar no ranking mundial segundo dados do IBGE (IBGE, 2013; Smith et al., 2019).

Políticas públicas de controle populacional de cães têm como objetivo evitar, entre outros, acidentes de trânsito, ataques por mordidas e transmissão de zoonoses sendo

as mais comuns a raiva (Knobel et al., 2005) e a leishmaniose (Quinnell & Courtenay, 2009). Infelizmente, apesar de as medidas de proteção contra o abandono e crueldade animal terem se intensificado, o número de cães abandonados vem crescendo a cada ano aumentando, assim, os riscos de transmissão de doenças entre espécies (Otranto et al., 2017). As manifestações clínicas da leishmaniose visceral em cães variam de indivíduo para indivíduo e mesmo cães clinicamente saudáveis são capazes de transmitir a doença para o inseto vetor (Ikeda-Garcia et al., 2010). As medidas tomadas até agora de controle populacional ou tratamentos usados sem um planejamento não têm sido suficientes para conter os surtos entre seres humanos e o número de casos de LV têm se mantido constante (Figura 02) (Cerqueira et al., 2014; Torres et al., 2019)

Muito ainda tem se discutido sobre o papel do cão na manutenção do ciclo da leishmaniose urbana e peri-urbana. Alguns autores sugerem que o aparecimento de novos casos de leishmaniose visceral em cães é um indicativo de surto na população humana (Silva, 2007). Contudo, estudos apontam que mesmo o controle e eliminação de animais soropositivos não é capaz de manter uma baixa incidência da doença por muito tempo (Torres et al., 2019). As características de densidade populacional, fatores individuais, cepa do parasito, a alta susceptibilidade do cão e a sua grande capacidade de transmitir a doença torna o conhecimento dos mecanismos que envolvem a manutenção do ciclo da LV, envolvendo o ser humano, de grande importância.

2.3. Ciclo biológico da *Leishmania infantum*

Em organismos vertebrados a formação da resposta imune frente à infecção por *Leishmania* se dá de forma complexa e começa logo após a inoculação do agente infeccioso pelo inseto vetor. As formas infectantes da leishmaniose são denominadas promastigotas metacíclicas que, ao serem regurgitadas na pele, podem ser fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear, se diferenciando na forma amastigota em seu interior. Ao ganharem a corrente sanguínea, preferencialmente no interior de células fagocitárias, as formas amastigotas podem se alojar em diversos órgãos do indivíduo tais como baço, fígado, medula óssea e linfonodos (Reis et al., 2009; Sanchez et al., 2004). Mecanismos de evasão do parasito, ainda não muito bem esclarecidos, permitem que este sobreviva no interior de células do sistema fagocítico

mononuclear como macrófagos, podendo ser novamente ingeridos em um novo repasto sanguíneo (Figura 03) (Anversa et al., 2018).

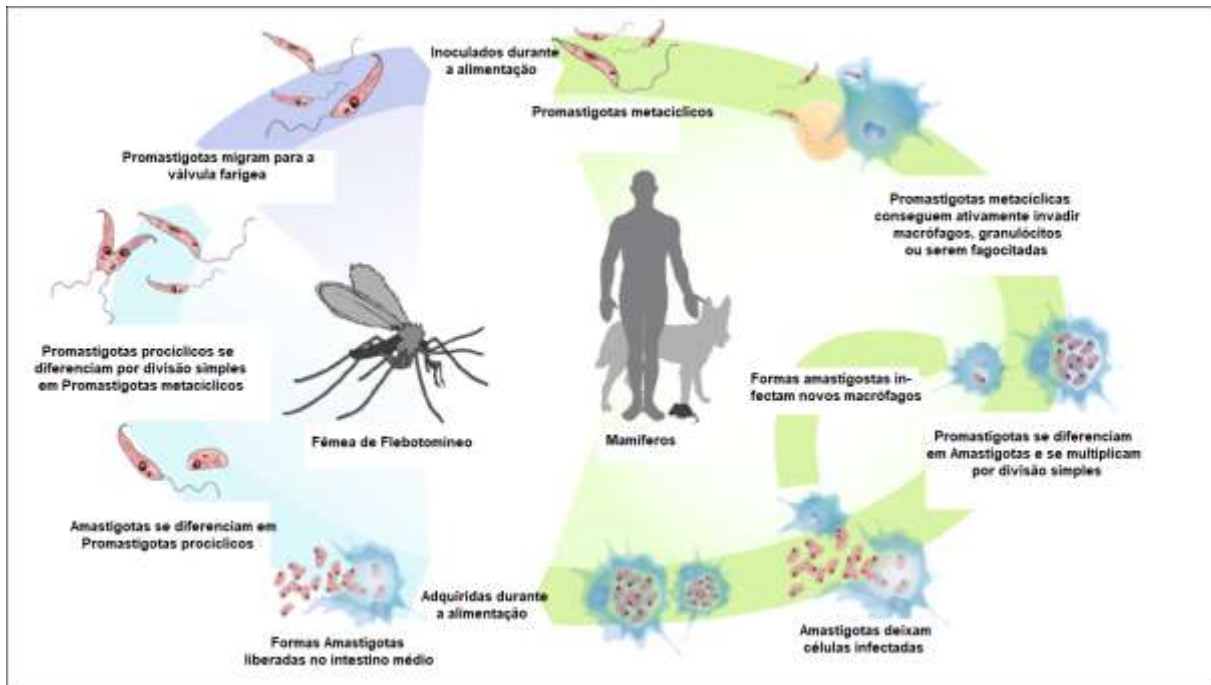


Figura 03: Ciclo biológico da *Leishmania* spp. em vertebrados e invertebrados – Adaptado (Anversa et al., 2018).

2.4. Imunopatogenia da leishmaniose

O período de incubação em cães, pode ocorrer num intervalo de poucas semanas a vários meses para o aparecimento dos primeiros sintomas e outros podem manter-se assintomáticos. Durante este período, mesmo cães assintomáticos podem transmitir o parasita a novos insetos que venham a se alimentar do seu sangue (Ribeiro et al., 2018). No ser humano, assim como no cão, o período de incubação e a gravidade da doença irão depender de diversos fatores, desde a cepa do parasito inoculado até genética e susceptibilidade do indivíduo e a resposta imune que será formada (Michalick et al., 2005). Os sinais clínicos podem variar de leves a graves e apesar de apresentarem sintomatologia semelhante e a leishmaniose visceral (LV) acometer principalmente as vísceras no ser humano, o cão, frequentemente apresenta alterações de pele como descamação, alopecia, ceratoconjuntivite, onicogribose além de lesões ulceradas (Moreira et al., 2018; Toepp & Petersen, 2020).

A principal resposta efetora contra protozoários é mediada por uma resposta celular, contudo, parasitos como a leishmania são capazes de evadir o sistema imune e sobreviver no interior de células como macrófagos, não sendo afetadas por seus mecanismos oxidativos para eliminação de patógenos (Gupta et al., 2013). Ainda, protozoários do gênero *Leishmania* spp. têm demonstrado habilidade de modificar a resposta imune, promovendo liberação de citocinas que favoreçam a sua permanência no organismo vertebrado (Kima & Soong, 2013).

A dicotomia observada pela literatura entre respostas causadas pela infecção por *Leishmania* spp. tem sido muito bem documentada em modelos experimentais (Anversa et al., 2018). Camundongos BALB/c que são suscetíveis à infecção por *Leishmania major*, apresentam perfil de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, TGF β e IL-10 (perfil TH2), enquanto que linhagens de camundongos naturalmente resistentes apresentam um painel de citocinas pró-inflamatórias representadas principalmente pelas IL-2, IFN γ e TNF α (perfil TH1) (Rogers et al., 2002; Stanley & Engwerda, 2007). Por outro lado, a depender do modelo utilizado, ou mais especificamente na leishmaniose visceral canina, essa diferenciação de perfis imunológicos e curso clínico da doença parece não acontecer de forma tão simples (Alexander & Brombacher, 2012; Loría-Cervera & Andrade-Narváez, 2014). O baço de cães infectados com *L. infantum* não apresentaram diferenças entre animais sintomáticos e assintomáticos com relação aos níveis de TNF α (Michelin et al., 2011). Em outro estudo, no qual se analisou a expressão gênica de diversas citocinas, foi observado que aumento na carga parasitária estava associado com alta expressão de IL-10 e IFN γ , sugerindo que um equilíbrio na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, talvez contribua para a progressão da doença em cães (Lage et al., 2007).

Ainda nos primeiros momentos da infecção por *Leishmania* spp., há uma expansão policlonal exacerbada e que leva a uma hipergamaglobulinemia inespecífica com ativação policlonal de células B, gerando um favorecimento da infecção com aumento da carga parasitária (Deak et al., 2011; Silva-Barrios et al., 2016). Tem-se observado que durante LV, cães assintomáticos apresentam uma baixa frequência ou até mesmo ausência de anticorpos enquanto que cães sintomáticos apresentam altos títulos de imunoglobulinas (Martínez-Moreno et al., 1995; Silva-Barrios et al., 2016). Deak et al. (2011) observaram que camundongos J_hD BALB/c, deficientes na liberação de

imunoglobulinas do tipo IgM no soro, se mostraram resistentes à doença, no entanto, a reconstituição passiva de imunoglobulinas nestes animais os tornou novamente suscetíveis à infecção por *L. infantum*.

Outros autores também observaram diferenças na evolução clínica da doença, dosando níveis de subclasses de imunoglobulinas. Em estudo composto por grupos de cães naturalmente e experimentalmente infectados, com e sem sintomatologia e tratados ou não com Antimoniato de Meglumina e Alopurinol ou somente Alopurinol, mostrou que os níveis de IgG total e IgG2 estavam aumentados em animais sintomáticos tanto nos grupos naturalmente quanto no grupo experimentalmente infectados e que os níveis de IgG1 foram variáveis durante o estudo (Solano-Gallego et al., 2001). Eles observaram ainda que, após o tratamento, os níveis de IgG total e IgG2 decaíram lentamente, enquanto que os níveis de IgG1 tiveram uma diminuição drástica e melhor resposta clínica, sugerindo ainda que IgG1 esteja relacionada com a doença e não IgG2 (Solano-Gallego et al., 2001).

Ainda que alguns autores se valham da resposta imunológica clássica (TH1/TH2) para diferenciar resistência ou suscetibilidade à infecção entre animais assintomáticos e sintomáticos (Pinelli et al., 1994), nem sempre é o que tem sido observado pela literatura. Em estudo utilizando-se de amostras de baço e fígado de animais naturalmente infectados, foram observados maiores níveis de TGF β e IL-10, moléculas pertencentes ao painel de citocinas do perfil TH2, em animais assintomáticos quando comparados com animais sintomáticos (Corrêa et al., 2007). Ainda, neste mesmo estudo, foi observado perfil de respostas diferentes (TH1/TH2) entre os órgãos estudados, indicando uma compartimentalização imunológica e que ambos perfis podem coexistir no mesmo indivíduo (Koutinas & Koutinas, 2014). A separação de perfis TH1/TH2 ou resistente/suscetível não ocorre da mesma forma entre leishmanioses (tegumentar/visceral) ou mesmo entre modelos (experimental/naturalmente infectados). Assim, os mecanismos que levam à cura ou a progressão da doença e o porquê de cães serem os principais reservatórios da doença precisam ser melhor elucidados.

2.5. Quimiocinas CCL-2 e CXCL-8

Citocinas quimiotáticas ou simplesmente quimiocinas do inglês *chemokines* (*chemotactic* + *cytokines*), são moléculas capazes de promover uma quimioatração

celular específica por meio de um gradiente de concentração (Mackay, 2001). Compreendem uma superfamília formada por aproximadamente 50 tipos de moléculas capazes de se ligar em 20 receptores conhecidos (Gangur et al., 2002; Mehrad et al., 2007). São proteínas relativamente pequenas (8 – 10 kDa) e têm sua nomenclatura baseada na proximidade dos resíduos de Cisteína (**C**) ao terminal amino (-NH₂), sendo por isso divididas em quatro subfamílias: **CXC**, **CC**, **C** e **C₃XC** (Gangur et al., 2002; Mackay, 2001). Até a sua descoberta, os fatores de atração conhecidos, promoviam quimioatração de uma ampla variedade de leucócitos (Gangur et al., 2002). Hoje sabe-se que além da sua importância na formação da resposta imune, um desbalanço na resposta inflamatória, com maior expressão ou mesmo maior tempo de liberação de determinadas quimiocinas, podem ser responsáveis por mediar uma série de patologias, desde cardiovasculares (Sheikine & Hansson, 2004) a angiogênese e metástases em tumores (Chow & Luster, 2014).

Durante a infecção natural na leishmaniose, é na pele onde a resposta imune se inicia e onde também aparecem as primeiras citocinas e quimiocinas que irão atrair tipos celulares e direcionar a resposta inflamatória para diferentes perfis, podendo a partir daí, definir o desfecho da infecção (Maran et al., 2016; Menezes-Souza et al., 2012). Foi observado que a pele de cães naturalmente infectados com *L. infantum* e que evoluíram sintomaticamente apresentando caquexia, onicogribose, ceratoconjuntivite e lesões cutâneas, também tinham aumento significativo de diversas quimiocinas estudadas e entre elas estavam a CXCL-8 (antiga IL-8) e a CCL-2 (antiga MCP-1) (Gangur et al., 2002; Menezes-Souza et al., 2012).

Descoberta na década de 80 e considerada a primeira quimiocina isolada da história, a molécula de CXCL-8 é conhecida por ser uma quimiocina de fase aguda, promovendo principalmente a atração de neutrófilos, monócitos e em menor grau linfócitos (Baggiolini, 2015; Gerszten et al., 2006; Menezes-Souza et al., 2012; Yoshimura, 2015). Apesar de necessária para a formação da resposta celular, a subfamília **CXC** de quimiocinas, quando aumentada ou persistente em processos crônicos, tem sido reportada como sinal de mau prognóstico em doenças inflamatórias e câncer (Bie et al., 2019; Ha et al., 2017; Mehrad et al., 2007). Esta subfamília pode ainda ser subdividida por meio da presença ou ausência de uma trinca de aminoácidos (ELR: ácido glutâmico – leucina – arginina) que, quando presentes, irão definir a sua função e especificidade em atrair neutrófilos (Mehrad et al., 2007).

Já a subfamília **CC** de quimiocinas foi primeiramente descrita como atratora de monócitos e macrófagos (Yung & Farber, 2013). O principal membro desta subfamília talvez seja a CCL-2. Sua ligação ao receptor CCR-2 atrai especificamente monócitos inflamatórios da corrente sanguínea para o órgão ou tecido que sofreu algum tipo de injúria (Yung & Farber, 2013). A molécula de CCL-2 tem, junto com a molécula de CXCL-8, um importante papel no controle da inflamação, proliferação e ativação celular além do remodelamento tecidual (Mackay, 2001; Yung & Farber, 2013). Contudo, aumentos nos níveis de CCL-2 e sua permanência no sítio de infecção em processos crônicos, podem causar injúria tecidual (Ziraldo et al., 2013). CCL-2 também tem sido exaustivamente estudada durante a infecção por *Leishmania* spp. (Díaz et al., 2013; Oghumu et al., 2010; Teixeira et al., 2006).

CXCL-8 e CCL-2 também têm sido reportadas por favorecer a infecção por *L. infantum*. Em estudo no qual se buscou associar o perfil inflamatório na pele de cães naturalmente infectados com *L. infantum* e o escore clínico dos animais, foi observado que cães com alta carga parasitária na pele e alto escore clínico também apresentaram alta expressão de CCL-2 e CXCL-8 (Menezes-Souza et al., 2012). Além disso, os autores notaram que a atração de monócitos e macrófagos promovida por estas quimiocinas não teve efeito protetivo como descrito em outros trabalhos (Bhattacharyya et al., 2002) e pareceu favorecer a permanência do parasito, sugerindo ainda que essas quimiocinas talvez atraiam células imaturas ou células inábeis em promover o controle parasitário (Menezes-Souza et al., 2012).

Ainda que não tenham estudado especificamente quimiocinas, Van Zandbergen et al. (2004) observaram que neutrófilos, quando parasitados por *L. major*, tinham seu processo de apoptose retardado por até 48h. Esse retardo na eliminação dessas células foi descrito por não somente facilitar a sua fagocitose por macrófagos, que chegam tardiamente ao local de infecção, mas também por induzirem a formação de um perfil TH2 com liberação de TGF β e favorecimento da infecção pelo parasito (van Zandbergen et al., 2004). Dados que compuseram a tese de doutorado da Dra. Amanda Cavalcanti, observou que o fígado de cães naturalmente infectados com *L. infantum* apresentaram alta expressão de CXCL-8 e CCL-2 em animais com alta carga parasitária (Cavalcanti et al, dados não publicados), mostrando que talvez essas duas quimiocinas tenham papel fundamental na formação da resposta imune bem como serem potenciais marcadores de prognóstico da doença.

2.6. Fígado e baço durante a infecção pela leishmaniose

Desde o início do desenvolvimento embrionário, fígado e baço passam por transformações não apenas morfológicas, mas também funcionais (Dyce et al., 2010). Formado entre o 26º e 27º dias de gestação em cães e entre a 3ª e 4ª semana de gestação em humanos, o fígado passa de órgão hematopoiético durante os primeiros estágios fetais a maior glândula existente em vertebrados possuindo inúmeras funções que vão de digestivas e regulatórias até a biotransformação de drogas e toxinas (Diehl-Jones & Askin, 2002; Pieri et al., 2015). Além disso, o fígado possui uma imunologia própria albergando um grande número de macrófagos residentes denominados células de Kupffer, sendo capaz de induzir tolerância imunológica e, ainda assim, ser capaz de construir uma resposta imune eficiente contra microorganismos patogênicos (Gao, 2016; Horst et al., 2016).

Assim como o fígado, o baço também é um órgão hematopoiético durante os primeiros estágios fetais para após, se tornar o maior órgão linfóide presente nos vertebrados (Stevens et al., 2000). Formado entre o 27º e o 28º dia em cães e durante a quinta semana de gestação em humanos, é neste órgão onde, durante a vida adulta de ambas as espécies, ocorre a eliminação de partículas estranhas provindas da circulação sistêmica, remoção de células vermelhas senescentes e outras em processo de apoptose (Roballo et al., 2019; Stevens et al., 2000; Tarantino et al., 2013). Sua divisão anátomo-histológica começa após a entrada da artéria esplênica no *hilum* que se divide em diversos “braços” arteriolares. Esses ramos são rodeados por linfócitos T e B formando a polpa branca e a bainha periarteriolar (Tarantino et al., 2013). A polpa vermelha compreende a maior parte do tecido esplênico e tem como principal função filtrar o sangue eliminando restos celulares, plaquetas, hemácias e imunocomplexos (Stevens et al., 2000). Durante processo infecciosos, é também no baço onde ocorre a maior parte da apresentação antigênica, ativação de células T e B e a maior produção de anticorpos, principalmente imunoglobulinas de fase aguda (IgM), sendo extremamente importante na formação da resposta imune primária (Stevens et al., 2000; Tarantino et al., 2013).

Com esses papéis, não é estranho imaginar que tenham grande influência e protagonismo na eliminação de agentes patogênicos. Durante a leishmaniose visceral experimental em camundongos, baço e fígado apresentam diferentes mecanismos de

eliminação do parasito (Sanchez et al., 2004). Embora a LV atinja diversos órgãos, em modelo experimental, o fígado apresenta uma rápida resolução da doença, com mínimo ou nenhum dano tecidual, além de adquirir resistência a uma nova infecção (Stanley & Engwerda, 2007). Em contrapartida, o baço parece se tornar o foco da infecção, apresentando persistência do parasitismo com a progressão da doença, inabilidade na formação de granulomas eficazes em eliminar o parasito, além da perda de sua microarquitetura folicular, atrofia da polpa branca, perda dos folículos linfoides e divisão das zonas marginais além da ausência de divisão entre polpas branca e vermelha (Engwerda et al., 2002; Hermida et al., 2018; Stanley & Engwerda, 2007).

Embora a infecção no fígado de camundongos pareça ocorrer de forma que tenha um início, um auge e caminhe para a resolução, em modelo de infecção natural, alguns aspectos da doença se apresentam de forma diferente (Loría-Cervera & Andrade-Narváez, 2014; Melo et al., 2008). Em cães infectados por *L. infantum*, o fígado parece não conseguir eliminar completamente o parasito, apresentando formação de granulomas e infiltrado inflamatório mesmo entre animais assintomáticos (Sant’Ana et al., 2007). O fígado é um órgão que está constantemente sendo exposto a diferentes estímulos externos provindos da circulação entérica (Robinson et al., 2016). Por esse motivo, é de extrema importância identificar e manter tolerância a moléculas “estranhas”, porém inofensivas, e ao mesmo tempo manter vigilância contra organismos patogênicos e células malignas (Robinson et al., 2016). A alta capacidade do fígado em manter tolerância e eliminar moléculas menores localmente, evita uma excessiva ativação sistêmica do sistema imune (Robinson et al., 2016). Todavia, micro-organismos patogênicos, como a *L. infantum*, conseguem romper essa perfeita homeostase e, assim, alterações morfológicas e estruturais podem ocorrer (Melo et al., 2008; Melo et al., 2009).

Melo et al. (2008) observaram que cães naturalmente infectados com *L. infantum* tinham formação de tecido fibroso intralobular em todos os animais estudados. Além disso, foi verificado que animais sintomáticos apresentavam maior deposição de colágeno e componentes da matriz extracelular como a fibronectina e a laminina do que animais assintomáticos e que o aumento na deposição de colágeno estava relacionado com a carga parasitária (Melo et al., 2008; Melo et al., 2009). A deposição de componentes da matriz extracelular e colágeno com formação de fibrose pode ser considerada como parte dos mecanismos normais de autorregeneração do fígado e

manutenção da homeostase, contudo, essas alterações podem se tornar relevantes em processos inflamatórios excessivos (Hag et al., 1994; Robinson et al., 2016).

Enquanto o fígado, ainda que de forma ineficiente, conduz seus mecanismos de defesa no sentido de manter a homeostase de sua funcionalidade, o baço parece evoluir para uma piora progressiva no decorrer da LVC (Khadem et al., 2016; Melo et al., 2020). Diversos são os estudos que apontam o baço como o foco de infecção e permanência do parasito durante a LVC e que a perda de sua organização e estrutura estão relacionadas com a piora no quadro clínico (Cavalcanti et al., 2015; da Silva et al., 2018; Hermida et al., 2018). Com a progressão da doença, além da perda de sua microarquitetura já mencionada, o tecido esplênico também passa a expressar maior deposição de laminina, fibronectina e colágeno (Silva et al., 2018). Essa maior deposição de componentes da matriz extracelular foi relacionada à piora do quadro clínico e a uma maior carga parasitária (Silva et al., 2018). Os dados até aqui apresentados mostram que fígado e baço trabalham de forma orquestrada, porém nem sempre eficaz contra agentes externos. Um olhar mais atento ao que acontece em cada órgão pode nos ajudar a colocar mais uma peça nesse quebra-cabeça que é a leishmaniose visceral canina.

2.7. As MAPquinases e a MAP4K4

Proteínas-quinase ativadas por mitógenos (do inglês: MAPK – *Mitogen Activated Protein Kinase*) são pertencentes a família Sterile20 (Ste20) de sinalização existentes em células eucariotas capazes de controlar uma grande diversidade de ações (Whitmarsh, 2007). Migração celular, proliferação, produção de citocinas e quimiocinas, podem ser ativados por meio de sinalização extracelular por estas moléculas (Morrison, 2012). Um estímulo extracelular pode desencadear uma cascata de sinalização que, de forma clássica, sinaliza através de MAP kinase kinase kinase (MAP3K) e subsequentemente ativa MAP2K. Essa cascata termina na fosforilação de um terminal proteico catalítico (treonina-tirosina) por meio dos quatro principais efetores dessa via de sinalização: Extracelular signal-Regulated Kinase (ERK), c-Jun N-terminal Kinase (JNK), p38 e Extracelular signal-Regulated Kinase 5 (ERK5) (Figura 04) (Morrison, 2012; Whitmarsh, 2007).

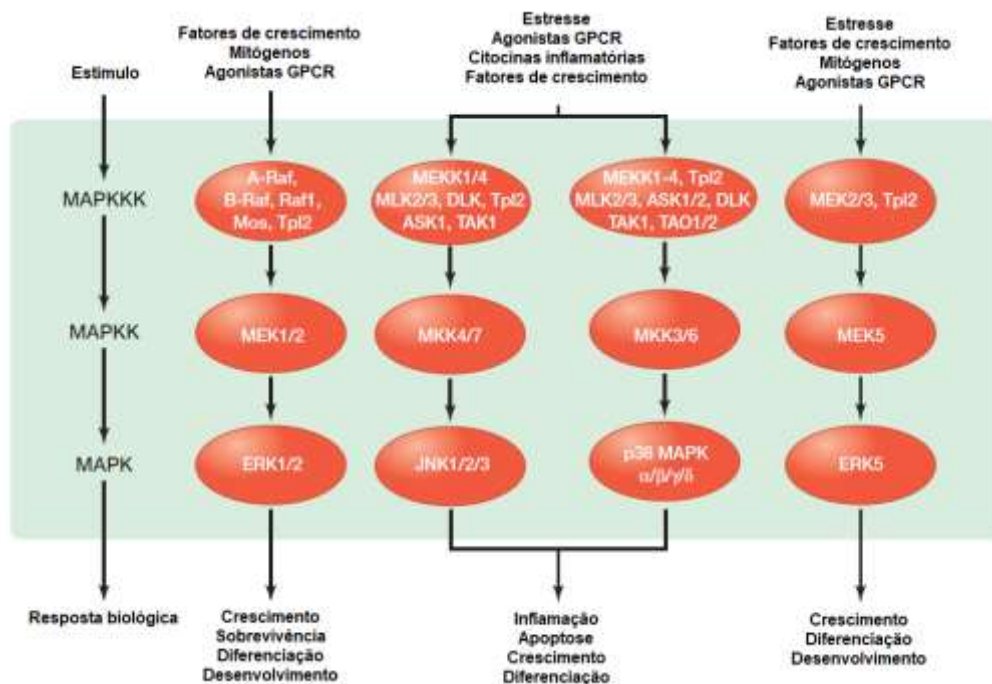


Figura 04: Esquema de sinalização das MAPquinasas (adaptado) (Morrison, 2012).

Frequentemente, a ativação da MAP3K ocorre através de proteínas ligadas a GTP (trifosfato de guanossina), entretanto, em alguns casos, o início dessa ativação pode ser através de MAP kinase kinase kinase kinase (MAP4K4) (Chuang et al., 2016; Cuevas et al., 2007). MAP4K também faz parte de uma família homóloga à proteína sterile20 sinalizando através de um terminal catalítico serina/treonina (Chuang et al., 2016). Existem seis subtipos de MAP4K (MAP4K1, MAP4K2, MAP4K3, MAP4K4, MAP4K5 e MAP4K6) e todos eles são supostos sinalizarem principalmente através de JNK (Chuang et al., 2016). Dentre os subtipos de MAP4K, a MAP4K4 foi reportada por ativar JNK especificamente através de TAK1 (Figura 05) (Chuang et al., 2016) estando envolvida em patologias metabólico-inflamatórias (Flach et al., 2019), cardiovasculares (Fiedler et al., 2019) e câncer (Liang et al., 2008).

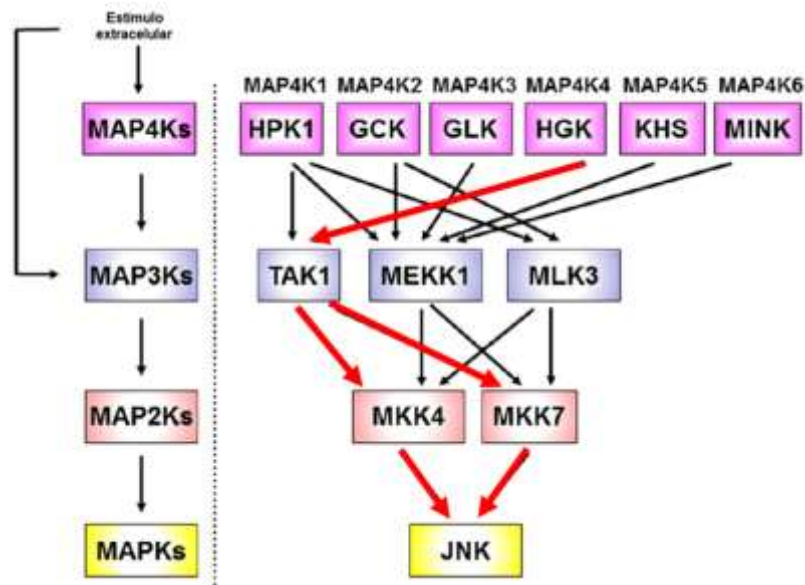


Figura 05: Esquema de sinalização da MAP4K4 (adaptado) (Morrison, 2012).

A formação da resposta imune depende de como e onde essas vias de sinalização serão ativadas. A indução de sinalização na membrana pode tomar caminhos diferentes a depender do órgão ou compartimento onde as células estão inseridas (Rao, 2015). Em doenças infecciosas como a leishmaniose, mecanismos de evasão do parasito podem inibir a sinalização das MAPquinases levando a um favorecimento da permanência do parasito no organismo hospedeiro (Gupta et al., 2013). Estudos mostraram que protozoários da ordem Kinetoplastida conseguem induzir silenciamento imunológico no interior de macrófagos, promovendo falhas nos mecanismos de fagocitose e de resposta ao $IFN\gamma$, além de inibir a expressão do gene iNOS por meio das subfamílias de MAPquinases (p38, ERK1/2 e JNK) (Gregory & Olivier, 2005).

Citocinas e quimiocinas também podem ter a sua expressão alterada pela interferência na sinalização de MAPquinases durante a infecção por *Leishmania* spp. (Ha et al., 2017; Kar et al., 2010). Privé & Descoteaux (2000) observaram que macrófagos *naïve* derivados da medula óssea de camundongos e infectados com *L. donovani* foram capazes de bloquear parcialmente vias de sinalização MAPquinase dependente, como a p38 e a ERK1/2, bem como impediram a fosforilação de JNK (Privé & Descoteaux, 2000). Em outro estudo, pacientes com *post kala-azar* apresentaram menor população celular inflamatória e menor expressão de CXCL-8 em lesões maculares quando comparado a pacientes com lesões nodulares (Singh et

al., 2018). Essa menor presença de células no local de lesão e menor expressão de CXCL-8 foi atribuída a menor ativação das MAPquinases por meio de p38 e ERK1/2 (Singh et al., 2018).

Até aqui, observamos que a literatura tem evidenciado que desbalanço ou exacerbação da resposta imune, durante a leishmaniose, pode impedir uma resposta mais eficiente e específica no controle da carga parasitária (Menezes-Souza et al., 2012), lesão tecidual (Silva et al., 2018) e evolução clínica da doença (Solano-Gallego et al., 2001). Ainda, essa resposta pode ser diferente entre órgãos e não acontecer da mesma maneira entre espécies (Loría-Cervera & Andrade-Narváez, 2014; Sanchez et al., 2004). Os mecanismos que levam a essa regulação, com expressão de quimiocinas e citocinas são dependentes de estímulos e vias de sinalização como as MAPquinases (Morrison, 2012). A MAP4K4 é uma via específica que sinaliza preferencialmente através de JNK e sua ação em processos inflamatórios, metabólicos, cardiovasculares além de tumores é preditiva de mau prognóstico (Fiedler et al., 2019; Liang et al., 2008; Liu et al., 2011). Os dados recentes, não publicados, do nosso laboratório mostram aumento da expressão da MAP4K4, CXCL-8 e CCL-2 relacionada a maior carga parasitária, e sugerem que esta via de sinalização pode estar sendo usada pelo parasito como mecanismo de evasão.

O presente trabalho busca tentar entender e discutir o perfil encontrado dessas moléculas inflamatórias em fígado e baço de cães naturalmente infectados por *L. infantum* com perspectivas de sugerir novos estudos na busca de ferramentas que identifiquem o estadiamento da doença, bem como novas terapias que auxiliem no controle da carga parasitária e que possa reduzir a transmissibilidade entre o cão e o ser humano.

3. Hipótese

Alteração na expressão de MAP4K4 pode interferir no perfil inflamatório e na expressão de quimiocinas como a CXCL-8 e CCL-2 presentes nas células do fígado e baço de cães infectados naturalmente com *L. infantum*, levando ao dano tecidual e interferindo no controle e/ou eliminação do parasito, permitindo a progressão da doença.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de MAP4K4 em baço e fígado de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* correlacionando com a resposta inflamatória, sinais clínicos e carga parasitária.

4.1. Objetivos Específicos

1. Classificar os animais quanto aos aspectos clínicos;
2. Avaliar a carga parasitária tecidual;
3. Classificar o tecido hepático de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* em termos de números de granuloma e celularidade;
4. Classificar o tecido esplênico de acordo com a sua organização estrutural;
5. Avaliar o dano hepático através das enzimas alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e gama glutamil transferase presentes no plasma dos cães infectados;
6. Avaliar o dano ao tecido hepático e esplênico através da deposição de Laminina e Fibronectina;
7. Avaliar a expressão de proteica de MAP4K4 e TNF α do fígado e de TNF α do baço;
8. Avaliar o perfil de expressão gênica da MAP4K4, CXCL-8, CCL-2, TNF α , IFN γ e IL-10 em fígado e baço de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.
9. Relacionar os achados dos objetivos anteriores com o escore clínico dos animais, carga parasitária e a organização e carga parasitária do baço.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Amostras

Amostras de conveniência de quarenta e um cães, onde não foi possível verificar informações a respeito de idade e tempo de infecção, provenientes da cidade de Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, entre os anos de 2013 e 2014, com diagnóstico confirmado de leishmaniose visceral através dos exames de DPP e Elisa e encaminhados para a eutanásia compulsória de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde, no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (FIOCRUZ-RJ) foram avaliados.

5.2. Avaliação clínica dos cães e coleta de amostras

A avaliação clínica foi realizada por dois médicos veterinários, considerando os 6 sinais clínicos típicos da LVC: dermatite, onicogribose, conjuntivite, emagrecimento, alopecia e linfadenopatia. Cada sinal clínico foi avaliado em uma escala variando de 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado) a 3 (grave) pontos segundo (Quinnell et al., 2001). A classificação final foi dada pela soma dos pontos obtidos, podendo o animal ter baixo escore clínico (0 a 2 pontos), médio (3 a 6) e alto (7 a 18).

Amostras de sangue foram coletadas da veia cefálica, o soro foi separado por centrifugação e armazenado a -20°C. A eutanásia foi realizada pelos médicos veterinários do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO-INI-FIOCRUZ), utilizando 1,0 mL/kg de thiopental 1,0% (Thiopentax®, Cristália) intravenoso (CFMV, 2013). Após a detecção de ausência de reflexo córneo, induzido por anestesia profunda, foram administrados 10 mL de cloreto de potássio 19,1% (Isofarma) intravenoso. O material avaliado foi obtido durante a necropsia dos animais, momento em que foram coletadas as amostras do baço e sangue periférico, assim como os dados clínicos.

Imediatamente após a eutanásia, fragmentos de baço e fígado foram coletados e armazenadas em solução tampão (10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris HCl) para extração de DNA e em solução RNeasy® (Ambion, Applied Biosystems, Life Technologies Corporation) para extração de RNA, ambos transportados a 4 °C e estocados a -70 °C.

5.3. Aspectos éticos

As amostras biológicas utilizadas neste estudo são oriundas de necropsias realizadas pelo Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO, INI, FIOCRUZ), local onde é feito o diagnóstico dos cães como leishmaniose visceral e encaminhamento para eutanásia. É lá onde também é feita a caracterização das leishmanias após a coleta das amostras. As amostras foram obtidas de necropsias, portanto, o presente estudo foi encaminhado para avaliação ética e, segundo orientação do Comitê de Ética em Uso de Animais da Fiocruz e de acordo com a lei brasileira 11794/08, não houve necessidade de licença (Anexos 11.2 a 11.4).

5.4. Análise histopatológica

Fragmentos teciduais de fígado e baço foram fixados em solução tamponada de formalina a 10% (Merck, Darmstadt, Alemanha) e inseridos em parafina (Synth, Diadema, Brasil). Cortes com 5 µm de espessura foram afixados em lâminas de microscopia e corados com hematoxilina e eosina (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido), para posterior análise em microscópio óptico (Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

Para a organização do tecido linfóide esplênico da polpa branca, zona marginal e polpa vermelha foram analisadas como descrito por Santana et al. (2008). Os parâmetros avaliados foram periesplenite (ausência, pouco, médio, intenso), presença de granulomas (ausência, pouco, médio, intenso) e grau de organização da polpa branca. Neste último caso, foi considerada organizada a polpa branca que apresentou bainha periarteriolar, centro germinativo, zona do manto e zona marginal distintos. Pouco desorganizada, aquela com alguma mudança hiperplásica ou hipoplásica levando a perda de definição de alguma das regiões da polpa branca. Moderadamente desorganizadas, aquelas com polpa branca evidente, porém suas regiões são pouco individualizadas ou indistintas. Intensa desorganização quando a estrutura folicular foi pouco distinguível da polpa vermelha e da área de células T.

No tecido hepático, o grau de degeneração e o infiltrado inflamatório no espaço porta e no parênquima, presença ou ausência de colestase e congestão foram

avaliados em uma escala semiquantitativa atribuindo as condições: ausente, 1+, 2+, 3+ e 4+. A avaliação dos granulomas considerou a presença ou ausência, e o número de granulomas por campo foi estimado contando-se o número de granulomas existentes em vinte campos diferentes em um aumento de 400X e a média do número total de granulomas foi dividida pela área corrigida em mm² (0,083583) da objetiva utilizada. O número de células totais formadoras do granuloma foi obtido pela média simples da contagem de células/granuloma para cada animal analisado.

5.5. Imuno-histoquímica

Visando analisar cortes de tecidos seriados para observação dos marcadores de interesse, a análise imuno-histoquímica foi feita através do método de imuno-peroxidase. Para a realização desta metodologia, imediatamente após a coleta dos fragmentos de tecidos (baço e fígado) foram incluídos em carboximetilcelulose (Tissue Tek OCT Compound, Miles Inc., EUA) e armazenados em nitrogênio líquido até sua utilização. Cortes seriados de 5µm foram feitos em criostato (Reichert-Jung Cryocut 1800, Alemanha) a -25 °C e aderidos a lâminas silanizadas. Após secagem à temperatura ambiente, os cortes foram fixados com acetona durante 20 minutos e as lâminas armazenadas em freezer -20°C até o momento do uso. Para a marcação, os cortes de tecidos foram hidratados por 10 minutos em PBS, posteriormente submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 1 minuto. Após, foram lavados 2 vezes durante 5 minutos com PBS (pH 7,2-7,4) e os receptores Fc e possíveis ligações inespecíficas foram bloqueadas com albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumine* - Sigma-Aldrich / Missouri-EUA) a 0,4% por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados os anticorpos primários purificados (Tabela 01) durante 18 horas (*overnight*) em câmara úmida a temperatura de 4°C. No dia seguinte a primeira incubação, os cortes foram lavados 2 vezes com PBS durante 5 minutos cada e foram adicionados os anticorpos secundários ligados à biotina (Tabela 01) durante 30 minutos em câmara úmida. Seguiram-se 2 lavagens de 5 minutos cada com PBS e então os cortes foram incubados com o revelador estreptoavidina-peroxidase (Amershan, United Kingdom) durante 30 minutos em câmara úmida. Após 2 lavagens com PBS durante 5 minutos, os cortes foram revelados com utilizando-se o kit AEC (Invitrogen, Carlsbad, USA). As lâminas foram colocadas em câmara escura para revelação acompanhada periodicamente ao

microscópio óptico. A fim de paralisar a revelação, as lâminas foram imersas em água tipo II e, em seguida, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) durante 20 minutos e depois contrastados em água durante alguns minutos também com observação ao microscópio óptico. As lâminas foram secas e cobertas com meio de montagem aquoso Faramount (DAKO - California - USA) e sobrepostas por lamínula. Os cortes foram analisados ao microscópio óptico (Zeiss) e as quantificações de área marcada e número de células por milímetro quadrado (mm²) foram feitas utilizando-se software ImageJ 1.48 (NIH, EUA), sendo os resultados demonstrados como percentagem de área marcada.

Tabela 01: Anticorpos utilizados para marcação dos alvos de interesse em imuno-histoquímica.

Anticorpos	Clone/Origem/Fornecedor	Diluição
MAP4K4	Policlonal/Rabbit/abcam	1/50
TNFα	Policlonal/Rabbit/abcam	1/100
Fibronectina	Policlonal/Rabbit/abcam	1/200
Laminina	Policlonal/Rabbit/abcam	1/200

5.6. Imunofluorescência

Amostras de tecido esplênico incluídos em carboximetilcelulose (Tissue Tek OCT Compound, Miles Inc., EUA) e armazenados em nitrogênio líquido até sua utilização foram crio-seccionadas a 5 μ m, e os fragmentos colocados em lâminas silanizadas (Dako, Carpinteria, CA, EUA) e fixados em lâmina com acetona P.A. (Merck) durante 10 minutos para evitar que os cortes soltem das lâminas. Para o bloqueio das ligações inespecíficas os cortes foram incubados em solução contendo 0,4% BSA por 20 minutos a temperatura ambiente. O excesso de solução de bloqueio foi descartado e foram adicionados os anticorpos primários para detecção dos marcadores de interesse (MAP4K4, TNF e Macrófago) por 18 horas à 4°C. A reação foi revelada por anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugado a ficoeritrina (PEvermelho) e anti-IgG de coelho conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC). A incubação com os anticorpos secundários foi feita em câmara escura por 30 minutos e temperatura ambiente. As lâminas foram montadas utilizando-se o meio Fluoromount-g contendo DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (Thermo Fisher Scientific). A

leitura da reação foi realizada em microscópio de fluorescência. As imagens foram processadas e sobrepostas em programa ImageJ (NIH, EUA).

Tabela 02: Anticorpos utilizados para marcação dos alvos de interesse em imunofluorescência.

Anticorpos	Clone/Origem/Fornecedor	Diluição
MAP4K4	Policlonal/Rabbit/abcam	1/50
TNFα	Policlonal/Rabbit/abcam	1/100
Macrófago	MAC387/mouse/AbD Serotec	1/200

5.7. Análises bioquímicas das funções hepáticas

As análises bioquímicas realizadas neste trabalho de Alanina Aminotransferase (ALT), Gamaglutamiltransferase (GGT) e Fosfatase Alcalina (FA) no soro dos animais, foram realizadas em laboratório de análises clínicas veterinário privado.

5.8. Determinação da carga parasitária por qPCR

A carga de parasitos foi estimada por PCR em tempo real em amostras de baço como descrito no item 6.2 e método como previamente descrito por Cavalcanti et al. (2015). Utilizaram-se iniciadores HPRT (Tabela 3) para normalizar as concentrações de DNA canino em cada amostra. Para quantificar o número de cópias do DNA referente aos parasitos, os iniciadores SSrRNA (Tabela 3) descritos por (Prina et al., 2007) foram utilizados para amplificar o gene que codifica o RNA de subunidade menor ribossomal (ssrRNA, gene de múltiplas cópias no genoma). As reações de qPCR foram realizadas no equipamento Step One (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc., Foster City, EUA), utilizando o sistema de detecção Power Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc., Foster City, EUA). Adicionou-se 2 μ L do DNA total purificado (100 ng) a um volume final de reação de PCR de 20 μ L contendo Power Sybr Green 1X, 300 nM de cada iniciador para HPRT ou 500 nM para ensaios de PCR de ssrRNA. O qPCR foi realizado com uma etapa de ativação a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação e anelamento/extensão (95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto e 68°C durante 30 segundos). Realizou-se uma curva padrão para cada alvo específico.

Todas as reações foram realizadas em duplicata para cada alvo e ambos os alvos foram executados na mesma placa para a mesma amostra.

As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de cães não infectados e culturas em massa de promastigotas de *Leishmania infantum* (MCAN/BR/2007/CG-1) foram determinadas utilizando um contador de células (Z1™ COULTER COUNTER®, Beckman Coulter, Fullerton, EUA). O DNA total foi extraído a partir de $1,0 \times 10^6$ células PBMC e $1,0 \times 10^7$ de promastigotas. As curvas padrão para os genes HPRT e ssrRNA foram preparadas utilizando diluições em série de 10 vezes de 10^{-2} a 10^7 de DNA purificado total. Os animais foram agrupados como carga parasitária alta ou baixa como descrito por (Cavalcanti et al., 2015). Todas as leituras quantitativas e qualitativas de PCR do presente trabalho, foram realizadas em Plataforma Multiusuário localizadas no Instituto Oswaldo Cruz - Manguinhos - Pavilhão Leônidas Deane / Hélio e Peggy Pereira.

Tabela 03: Genes alvos e respectivas sequências utilizados na quantificação da carga parasitária. S, senso; AS, anti-senso.

Gene alvo	Nº de acesso ou referência		Sequência 5'-3'	Tamanho em pares de base
HPRT alvo canino	NW_003726126.1	S	AAAACAATGCAGACTTTGCT	58
		AS	CCTTGACCATCTTTGGATTA	
SsrRNA alvo parasita <i>Leishmania (L) infantum</i>	Prina et al. 2007	S	TACTGGGGCGTCAGAG	153
		AS	GGGTGTCATCGTTTGC	

5.10. Extração do RNA e quantificação de MAP4K4 e citocinas em baço e fígado por qRT-PCR

O RNA total foi extraído de fragmentos teciduais de fígado e baço pelo método Trizol® (Invitrogen, Grand Island, NY) e RNeasy kit (Qiagen), de acordo com protocolo dos fabricantes. O RNA foi quantificado por espectrofotometria em Nanodrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, EUA) e 2 µg de RNA foram tratados com RNase-free DNase® (Ambion, Grand Island, NY). A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada com High Capacity cDNA Syntesis kit (Applied Biosystems). As reações de qPCR foram realizadas utilizando o sistema Power Sybr Green Master MIX® (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc) no equipamento ViiA 7 (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc). Foram preparadas reações com volume final de

10 µL contendo iniciadores (Tabela 4), 5 µL de SYBR 2X e 1µL de cDNA. O ciclo térmico consistiu em uma etapa de ativação a 95°/10 min, seguida de 45 ciclos de desnaturação a 95°C/15 s e anelamento/extensão a 60°C/1 min. Uma curva de dissociação (95°C/15 seg, 60°C/1 min e 95°C/15 s) foi realizada para avaliação de amplificação inespecífica. Para os alvos MAP4K4 e CXCL-8 uma etapa de leitura foi adicionada a 78°C e 79°C, respectivamente, logo após a etapa de anelamento/extensão. A quantificação relativa dos genes de interesse foi determinada pelo método do ddCT (Hellemans et al., 2008; Pfaffl, 2001), onde HPRT e GAPDH (Cavalcanti et al., 2015) foram utilizados como referências. As eficiências foram determinadas experimentalmente por diluições seriais de cDNAs de cão. Todas as reações foram realizadas em duplicata e controles negativos foram incluídos em todos os ensaios.

Tabela 04: Genes alvos e desenho dos iniciadores para cDNA. S, senso; AS.

Gene alvo	Nº de acesso ou referência		Sequência 5'-3'	Tamanho em pares de base
HPRT alvo canino	NW_003726126.1	S	AAAACAATGCAGACTTTGCT	58
		AS	CCTTGACCATCTTTGGATTA	
GAPDG alvo canino	XM_003434387.2	S	ATGCCCAACATTGGTTATGG	103
		AS	CTCTTTCCACGATGGCTTTG	
CXCL-8 alvo canino	AF048717	S	ACACTCCACACCTTTCCATi	116
		AS	GGCACACCTCATTTCATTG	
CCL-2 alvo canino	NM_001003297.1	S	AGCAAGTGTCCCAAAGAAGC	122
		AS	TGGGTTTGGCTTTTCTTGTC	
MAP4K4 alvo canino	XM_003431519.2	S	TGAACGCAATGACAAGGTC	94
		AS	GCTCAGAAGAGAAGTCCTGC	
TNF α alvo canino	NM_001003244.4	S	CAAATGGCCTCCAATAATCA	100
		AS	TCGGGGTTTGCTACAACAT	
IFN γ alvo canino	NM_001003174.1	S	CCAGATCATTCAAAGGAGCA	116
		AS	CGTTCACAGGAATTTGAATCAG	
IL-10 alvo canino	NM_001003077.1	S	GAGAGAAGCTCAAGACCCTCAG	118

Todas as leituras quantitativas e qualitativas de PCR do presente trabalho, foram realizadas em Plataforma Multiusuário localizadas no Instituto Oswaldo Cruz - Manguinhos - Pavilhão Leônidas Deane / Hélio e Peggy Pereira.

5.11. Análise Estatística

O estudo utilizou amostras de conveniência, e para efeito de análise, os animais foram divididos em 3 grupos de acordo com os sinais clínicos: 1- baixo escore clínico; 2- médio escore clínico; 3- alto escore clínico. Também foi considerada para a análise, a organização do tecido linfóide esplênico e a carga parasitária: 1- organizado/baixa carga; 2- desorganizado/baixa carga; 3- desorganizado/alta carga. Foram utilizados os testes não paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal Wallis para amostras independentes e o teste de correlação de postos de Spearman utilizando o programa GraphPadPrism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para a análise de expressão gênica foram utilizados os testes de ANOVA, Tukey e Mann Whitney para 2 grupos. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Os dados foram representados por mediana e intervalo interquartil.

6. Resultados

6.1. Avaliação dos animais segundo o escore clínico

No presente trabalho, 41 animais foram diagnosticados com leishmaniose visceral canina (LVC). Os principais sinais clínicos encontrados foram a onicogrifose (79,4%), dermatite (67,6%), perda de peso (41,2%), alopecia (38,2%), linfadenopatia (23,5%) e ceratoconjuntivite (23,5%) (Figura 06). Os animais foram classificados em 3 grupos com base no escore clínico: 1 – baixo escore (N = 13, 31,7%); 2 – médio escore (N = 15; 36,6%); 3 – alto escore clínico (N = 13, 31,7%).

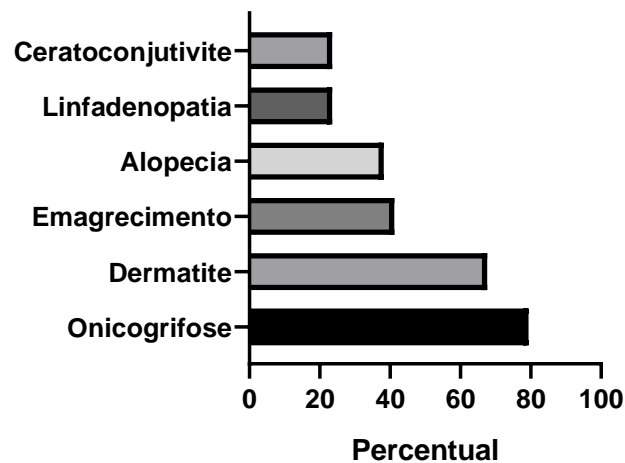
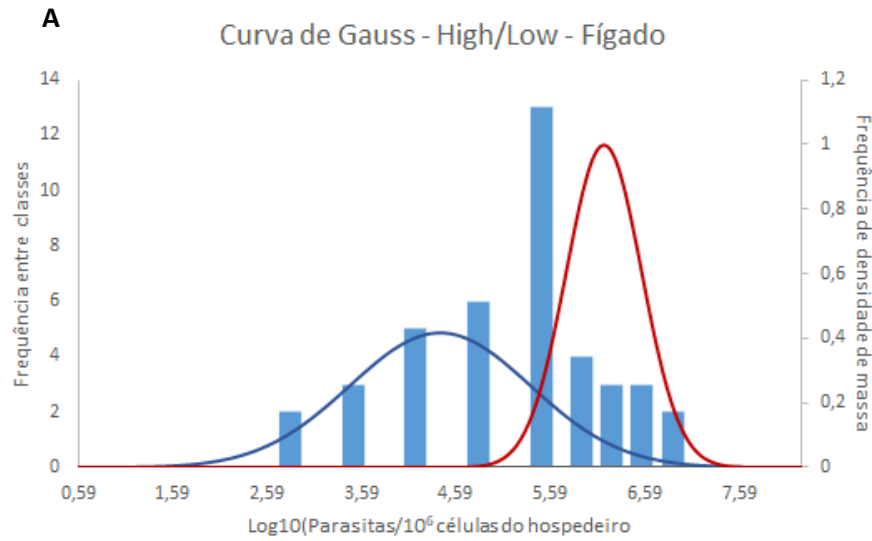


Figura 06: Percentual de sinais clínicos de cães infectados naturalmente com *Leishmania infantum*. 41 animais foram incluídos neste estudo. Ceratoconjuntivite: 23,5%; Linfadenopatia: 23,6%; Alopecia: 38,2%; Perda de peso: 41,2%; Dermatite: 67,6%; Onicogrifose: 79,4%.

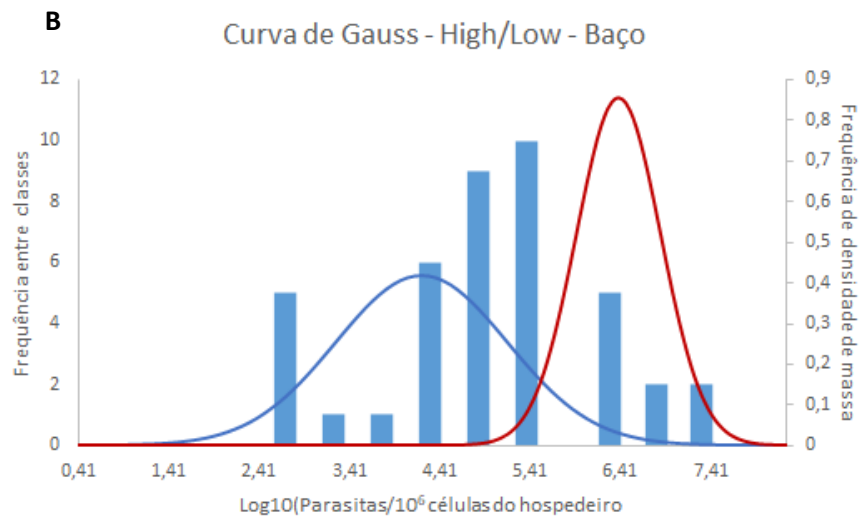
6.2. Separação dos grupos entre órgãos pela carga parasitária

Neste estudo, avaliamos cães naturalmente infectados com *L. infantum*, e por esse motivo não temos conhecimento sobre o tempo de infecção de cada animal. Assim, os animais foram agrupados de diferentes maneiras para que pudéssemos responder aos nossos questionamentos. Sendo assim, primeiro observamos a carga parasitária e separamos os grupos entre alta carga (High) e baixa carga (Low). Para a separação dos grupos em função da carga, um limite de detecção foi estabelecido para cada gene alvo de acordo com o background dos ciclos iniciais (6 a 15) em todas as reações válidas. Os valores médios do ciclo de corte (cycle threshold, Ct) foram

determinados por duplicatas técnicas. Os valores de Ct foram plotados em função das diluições (\log_{10}) e as curvas padrão para cada alvo determinadas por regressão linear, com os coeficientes de determinação (R^2) usados como controle de qualidade. Em seguida, as curvas padrão do gene *ssrRNA* foram utilizadas para estimar o número total de parasitas na amostra e o gene *HPRT* usado para normalização do número de células caninas. Assim, foi possível obter o número de parasitas por $1,0 \times 10^6$ células. A baixa carga parasitária variou entre 147,91 e $3,09 \times 10^5$ no fígado e no baço entre 145,47 e $2,34 \times 10^5$ e a alta carga variou entre $3,93 \times 10^5$ e $7,66 \times 10^6$ no fígado e $5,98 \times 10^5$ e $2,03 \times 10^7$ no baço (Figura 6A e B). A distribuição entre animais que pertenciam a mesma classe/faixa de carga parasitária foi heterogênea em ambos os órgãos. A curva gaussiana indica a densidade de massa ou de parasitos dentro daquele grupo e o cruzamento das curvas indica o ponto de corte para separação entre baixa e alta carga parasitária (Figura 7A e B).



Grupos (n)	Número de parasitos / $1,0 \times 10^6$ células hepáticas caninas		
	Mínimo	Máximo	Média
Low (29)	147,91	$3,09 \times 10^5$	$9,45 \times 10^4$
High (12)	$3,93 \times 10^5$	$7,66 \times 10^6$	$2,11 \times 10^6$



Grupos (n)	Número de parasitos / $1,0 \times 10^6$ células esplênicas caninas		
	Mínimo	Máximo	Média
Low (32)	145,47	$2,34 \times 10^5$	$5,24 \times 10^4$
High (9)	$5,98 \times 10^5$	$2,03 \times 10^7$	$4,41 \times 10^6$

Figura 07: Quantificação da carga parasitária em amostras de fígado e baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. A quantificação foi realizada utilizando PCR em tempo real com primers específicos para sequência de DNA da menor subunidade ribossomal (ssrRNA). O gene constitutivo canino HPRT foi utilizado para normalizar as concentrações iniciais de cada amostra. A e B. Histograma de barras representando as classes de animais que pertenciam a uma mesma faixa de carga parasitária e curva normal da densidade de *L. infantum* de animais classificados como baixa carga (Low, n = 29 para o fígado e n = 32 para o baço) linha azul e animais classificados como alta carga (High, n = 12 para o fígado e n = 9 para o baço) linha vermelha. Tabelas indicam mínimo, máximo e média de parasitos por 10^6 células caninas.

Embora alguns animais tenham apresentado concordância de cargas em ambos os órgãos (Low/Low – High/High), dentro do nosso grupo de estudo observamos que houve diferença entre as cargas parasitárias de fígado e baço do mesmo animal, (Figura 8A). A maior parte dos animais apresentou baixa carga parasitária em ambos os órgãos (n=22), dezessete animais apresentaram cargas parasitárias discordantes entre baço e fígado e apenas dois animais apresentaram alta carga parasitária em ambos os órgãos. Por este motivo, este grupo contendo apenas dois animais foi retirado das análises futuras, já que um número de dois animais não nos retornaria resultados confiáveis (Figura 8B).

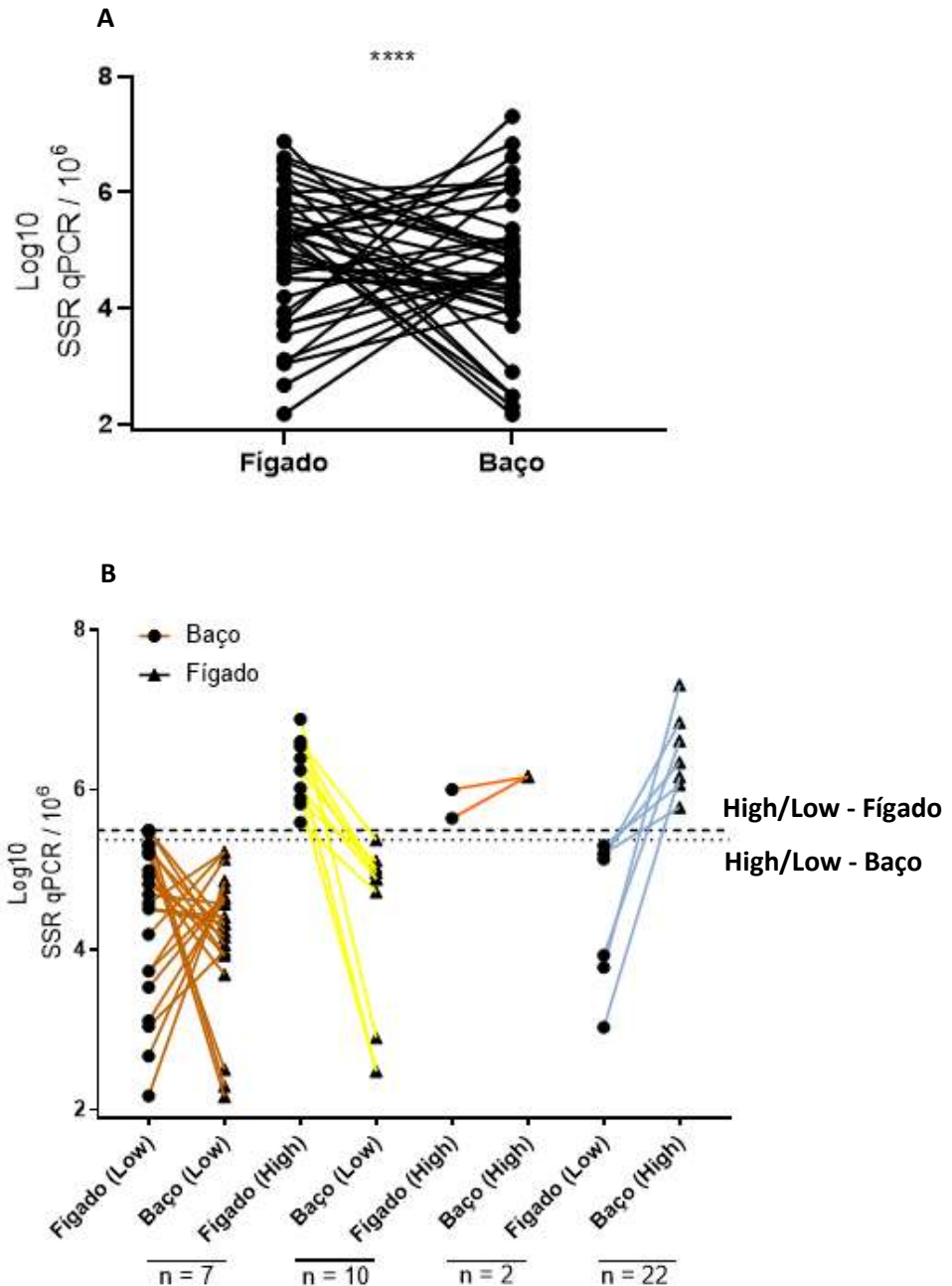


Figura 08: Carga molecular parasitária do fígado e do baço de cães infectados naturalmente com *Leishmania infantum*. PCR em tempo real do gene *ssrRNA* de *Leishmania* sp. A. Pontos ligando diferenças de carga parasitárias entre fígado e baço no indivíduo. B. Pontos ligando diferenças de carga parasitárias entre fígado e baço no indivíduo, separados por grupo de evolução clínica. Concentração inicial de DNA normalizada pelo gene *HPRT*. (****) $p < 0,0001$. Teste de Wilcoxon.

Não houve associação estatisticamente significativa entre as cargas parasitárias do fígado quando comparadas com o baço (Figura 9A) e entre os diferentes escores clínicos (Figura 9B). Por outro lado, ao comparar a carga parasitária de ambos os órgãos de acordo com a organização da polpa branca esplênica, observamos que

animais que apresentaram o baço desorganizado e com baixa carga tiveram maior parasitismo no fígado e que animais com o baço desorganizado e com alta carga tiveram maior parasitismo no baço. Assim, tomando como base os dados até agora expostos, nossos grupos para as demais análises dos dados de fígado serão divididos entre grupos de organização e carga parasitária do baço, além do escore clínico. As análises separando os grupos por carga parasitária do fígado e do baço foram todas realizadas e encontram-se nas figuras suplementares.

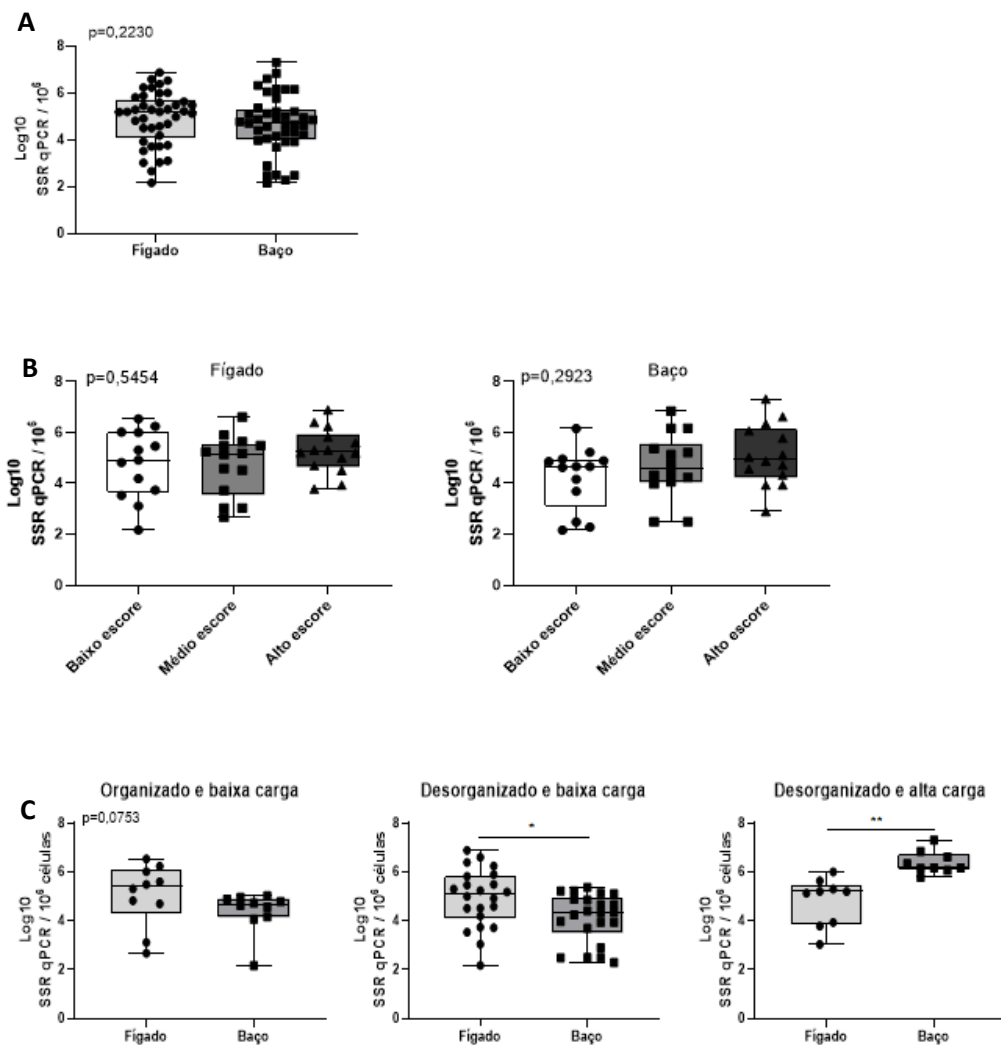


Figura 09: Carga molecular parasitária do fígado e do baço de cães infectados naturalmente com *Leishmania infantum*. A. Carga parasitária em fígado e baço, número de cópias do parasito (Log₁₀) em 10⁶ células. B. Classificação da carga parasitária de acordo com a classificação clínica. C. Classificação da carga parasitária do fígado e do baço de acordo com a organização do baço. (**) $p < 0,01$ e (*) $p < 0,05$. ANOVA, Kruskal-Wallis test com teste de Dunn para comparações múltiplas. Teste Mann-Whitney para 2 grupos.

6.3. Análise histopatológica e classificação dos granulomas hepáticos e organização esplênica por microscopia óptica.

A histologia do fígado e baço dos animais foi realizada através de cortes de tecido parafinizados corados com hematoxilina e eosina. A análise dos cortes de baço mostrou que 24,4% dos animais possuíam polpa branca esplênica organizada com distinta bainha linfocitária periarteriolar, centro germinativo, zona de manto e zona marginal (Figura 10A). Mais da metade dos animais (75,6%), apresentou algum grau de desorganização podendo variar de leve a intensa desorganização da polpa branca com diminuição da definição das suas regiões (Figura 10B-C).

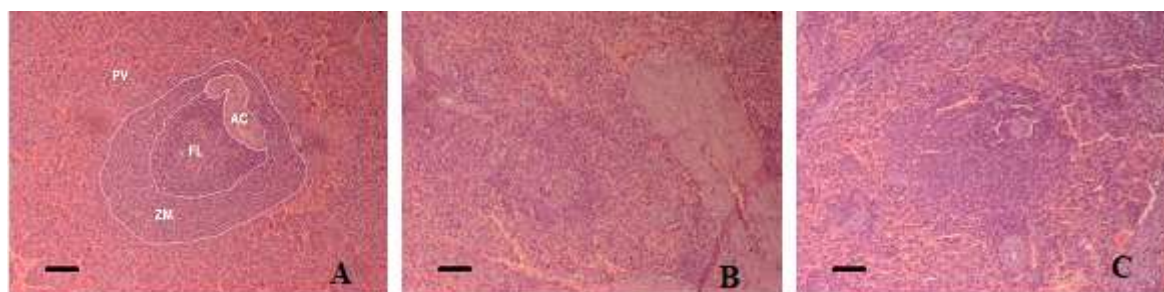


Figura 10: Fotomicrografias mostrando cortes histológicos de baço de cães naturalmente infectados por *L. infantum* mostrando diferentes níveis de desorganização da polpa branca. A. Polpa branca organizada de animal com baixa carga parasitária apresentando áreas bem delimitadas: PV: Polpa vermelha; ZM: Zona marginal; FL: Folículo linfóide; AC: Arteriola central.; B. Polpa branca desorganizada de animal com baixa carga parasitária; C. Polpa branca desorganizada de animal com alta carga parasitária. A-C. Aumento 200X; C. Imagens representativas.

A observação dos cortes histológicos corados por HE do fígado, revelou presença de granulomas nos fígados dos animais em diferentes níveis de organização (Figura 11A-C),

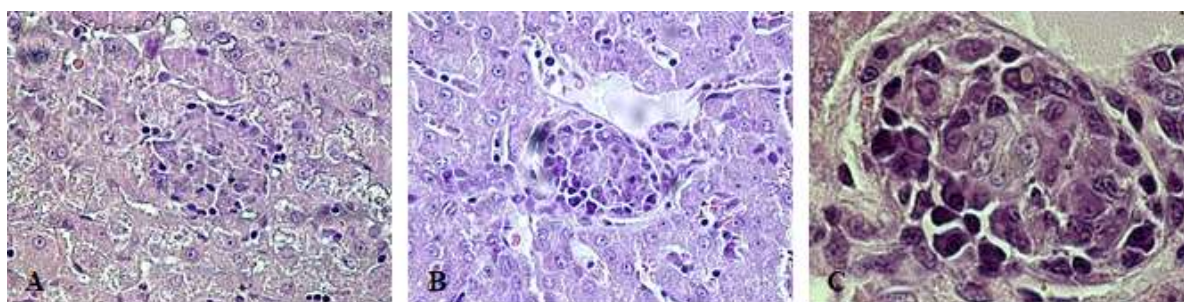


Figura 11: Fotomicrografias mostrando cortes histológicos de fígados de cães naturalmente infectados por *L. infantum* mostrando granulomas maduros e bem formados. A e B. Fotos

representativas de granulomas em tecido hepático em aumento 400X; C. Foto representativa que de granuloma em tecido hepático em aumento 1000X. Imagens representativas.

Ainda, foi possível observar alterações histológicas como infiltrado inflamatório periportal (56,09% dos animais) (Figura 12A) além de infiltrado inflamatório perivascular (48,7% dos animais) (Figura 12B), ambos com intensa presença de células mononucleares ao redor. A degeneração vacuolar estava presente em 63,4% dos animais, bem como congestão em 21,9% do total de animais (Figura 12C-D). Deposição de colágeno foi observada de focal a difusa através da coloração de vermelho de Picrosírius e estava aumentada com 3+ em três (7,31%) dos quarenta e um animais analisados (Figura 12E).

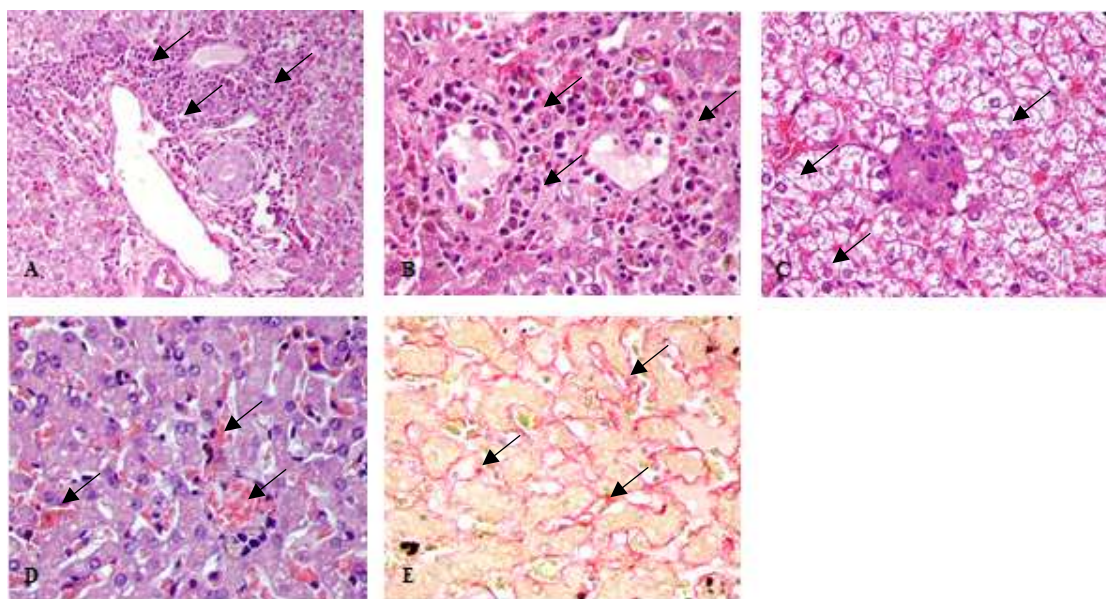


Figura 12: Fotomicrografias mostrando diferentes alterações histopatológicas observadas nos fígados de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. A. Infiltrado inflamatório periportal, aumento 200X; B. Infiltrado inflamatório perivascular; C. Degeneração vacuolar de hepatócitos; D. Congestão; E. Deposição de colágeno no parênquima hepático, coloração de vermelho de Picrosírius. A. Aumento de 200X; B-F. Aumento de 400X. Imagens representativas.

Em seguida, com o intuito de verificar se o escore clínico ou a carga e organização do baço poderiam ser indicativos da evolução clínica da doença ou estariam pareadas com a organização e carga do baço, fizemos a contagem do número de granulomas por milímetros quadrados (mm²) e o número de células totais

que formavam o granuloma. Não foram observadas diferenças significativas quando os grupos foram separados pela carga parasitária de cada órgão (Figura Suplementar 01). Observamos que a contagem de células por granuloma e de granulomas por milímetros quadrados no fígado, estava aumentada nos animais com baço desorganizado e alta carga parasitária quando comparados aos animais com baço organizado e baixa carga (Figura 13A e B). Chamamos a atenção também para uma tendência ($p=0,0502$) de aumento no número de células por granuloma e de granulomas por milímetros quadrados entre animais com baço organizado e baixa carga e animais com baço desorganizados e baixa carga parasitária (Figura 13A e B).

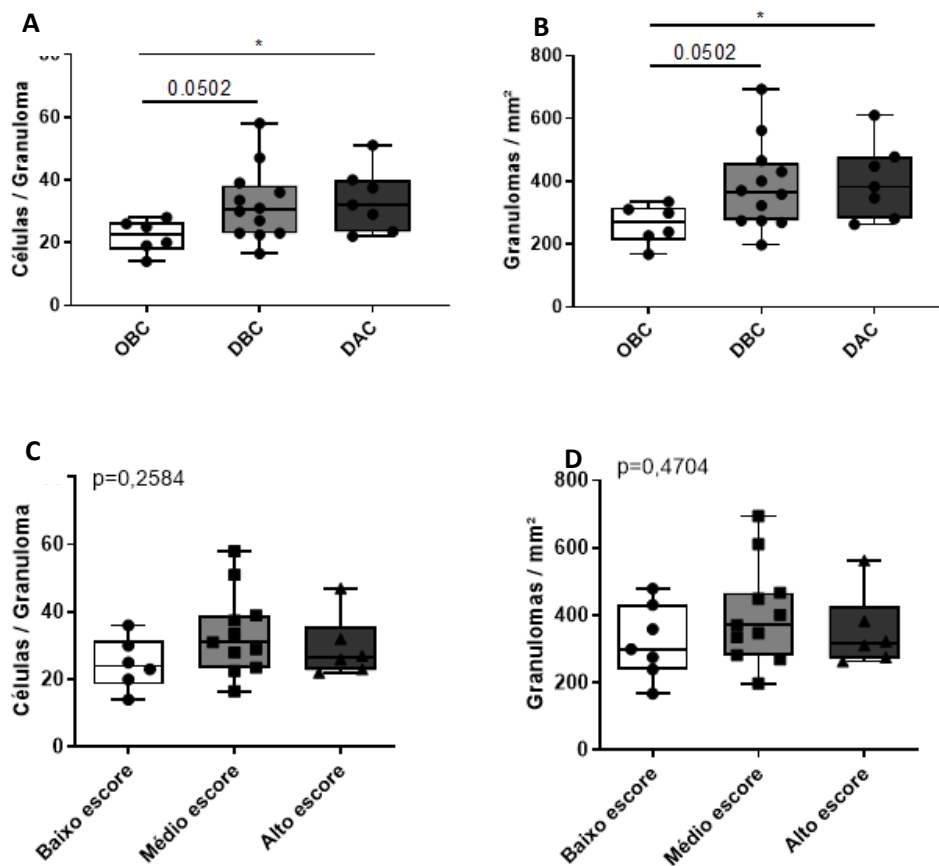


Figura 13: Representação gráfica da quantidade de células por granuloma e de granulomas por milímetros quadrados. A e B. Quantidade de células por granuloma entre animais com baço organizado e baixa carga (OBC) e desorganizado e baixa (DBC) ou alta carga parasitária (DAC); C e D. Quantidade de granulomas por mm² em animais com baixo, médio e alto escore clínico. (*) $p < 0,05$. ANOVA, Kruskal-Wallis test com teste de Dunn para comparações múltiplas.

6.4. Análise dos marcadores de dano tecidual através das enzimas hepáticas

Dentro do nosso grupo de estudo não observamos alterações entre grupos separados entre baixa e alta carga do fígado e do baço (Figura Suplementar 02) ou entre os diferentes escores clínicos e entre os grupos de organização e carga parasitária do baço (Figura 14A-C).

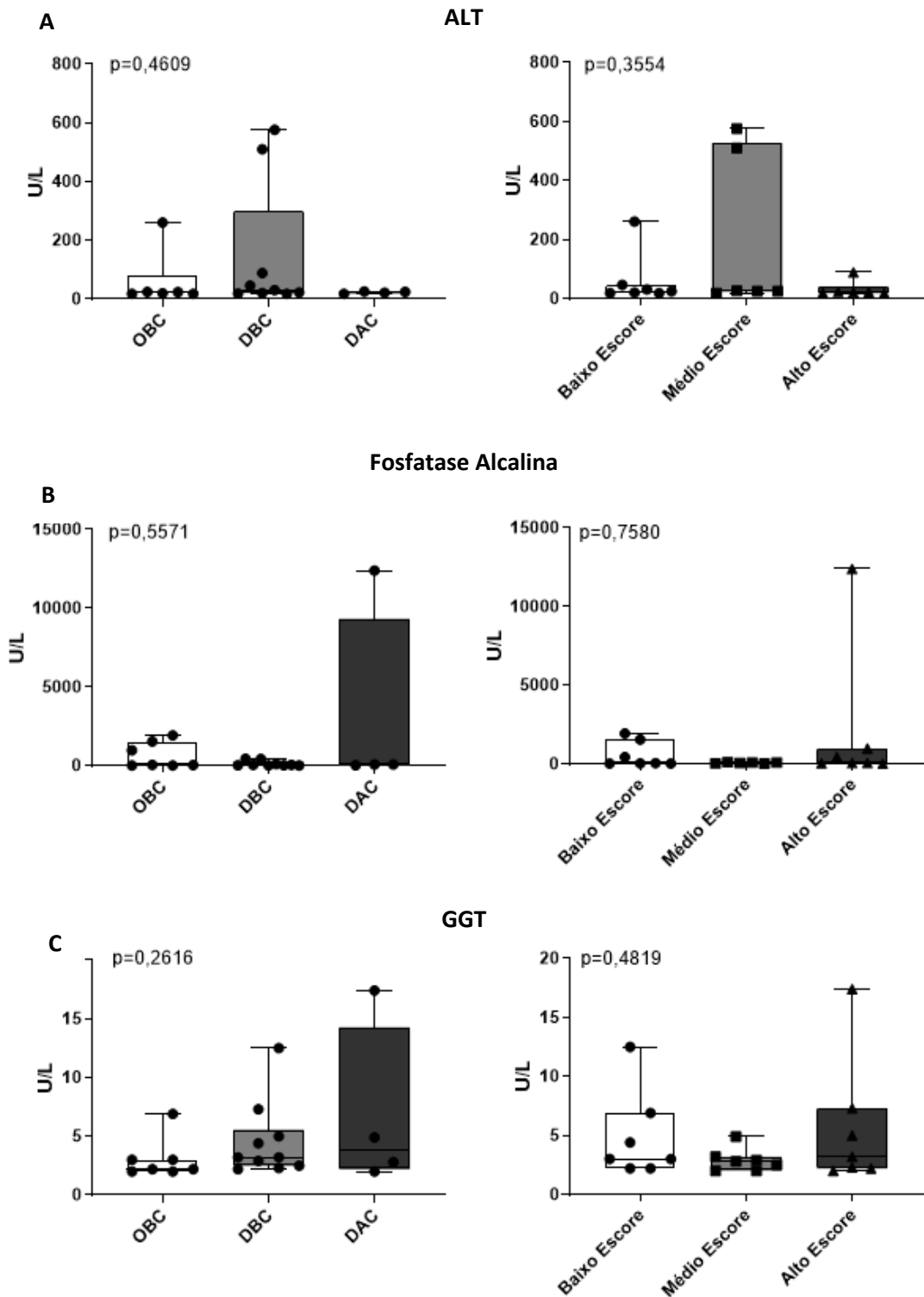


Figura 14: Níveis séricos das transaminases: U/L: Unidades por litro; Valores de referência: ALT: 18 – 86; FA: 12 – 121; GGT: 2,0 - 10. (OBC) organizado e baixa carga, (DBC) desorganizado e baixa carga, (DAC) desorganizado e alta carga. A. Alanina-aminotransferase (ALT); B. Fosfatase Alcalina (FA); C. Gama Glutamil Transpeptidase (GGT). ANOVA, Kruskal-Wallis test com teste de Dunn para comparações múltiplas.

6.5. Análise dos marcadores fenotípicos e funcionais por imunohistoquímica e imunofluorescência

Após estudar marcadores séricos de dano tecidual, fomos avaliar *in situ* o perfil das células inflamatórias no fígado e no baço, além da expressão de alguns marcadores funcionais e de moléculas de matriz extracelular por imunohistoquímica. Nosso objetivo foi avaliar se havia dano tecidual e se este se relacionaria com alterações na composição dos granulomas e na organização da matriz extracelular. Os marcadores analisados foram: laminina, fibronectina, $TNF\alpha$ e MAP4K4. As Figuras 15 e 16 (A a D) mostram imagens representativas das marcações para laminina e fibronectina e seus respectivos controles em fígado e baço de cão naturalmente infectado com *L. infantum*, respectivamente.

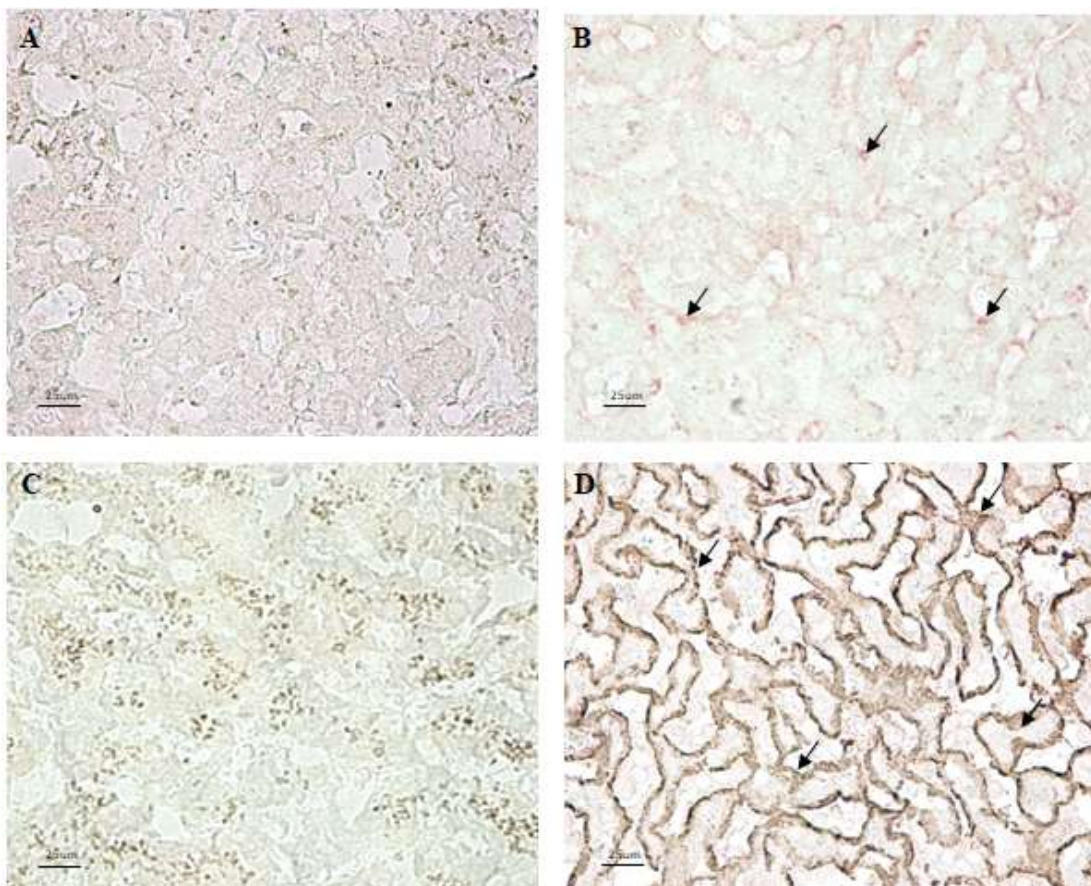


Figura 15: Fotomicrografias mostrando cortes histológicos de fígados de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. A e B mostrando controle negativo e marcação para laminina respectivamente, aumento 400X; C e D mostrando controle negativo e marcação para fibronectina respectivamente, aumento 400X. Imagens representativas.

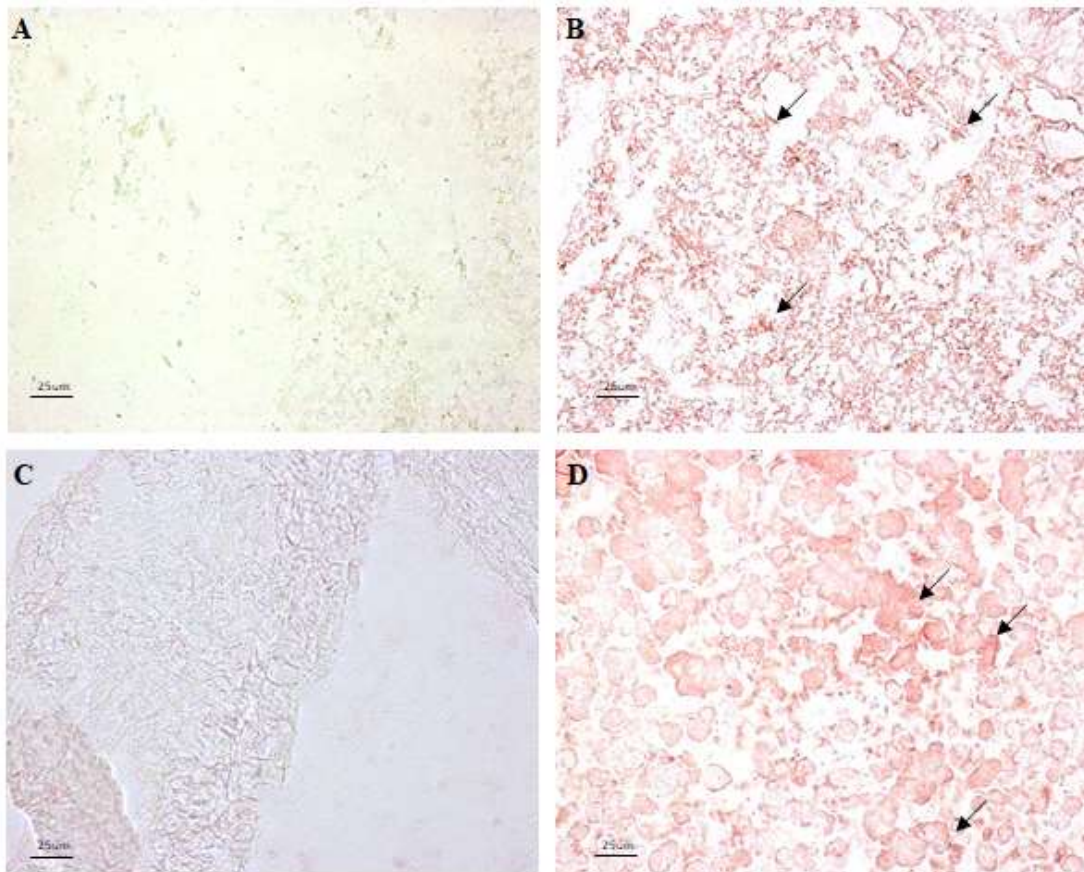


Figura 16: Fotomicrografias mostrando cortes histológicos de baço de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. A e B mostrando controle negativo e marcação para laminina respectivamente, aumento 400X; C e D mostrando controle negativo e marcação para fibronectina respectivamente, aumento 400X. Imagens representativas.

Para determinar se a infecção por *L. infantum* promove alteração da matriz extracelular hepática ou esplênica, foi mensurada a deposição de laminina e fibronectina por porcentagem de área marcada positiva. Não foram observadas diferenças na deposição de laminina e fibronectina no fígado e no baço quando animais que apresentaram baixa e alta carga parasitária foram comparados (Figura Suplementar 03).

Em seguida, comparamos os dados entre os grupos de animais de acordo com os diferentes escores clínicos e entre a organização e carga parasitária do baço. A análise revelou aumento na deposição de fibronectina no fígado e no baço de animais classificados com alto escore clínico quando comparados a animais de baixo escore clínico (Figura 17B). Não foram observadas diferenças na deposição de laminina entre os grupos estudados (Figura 17A).

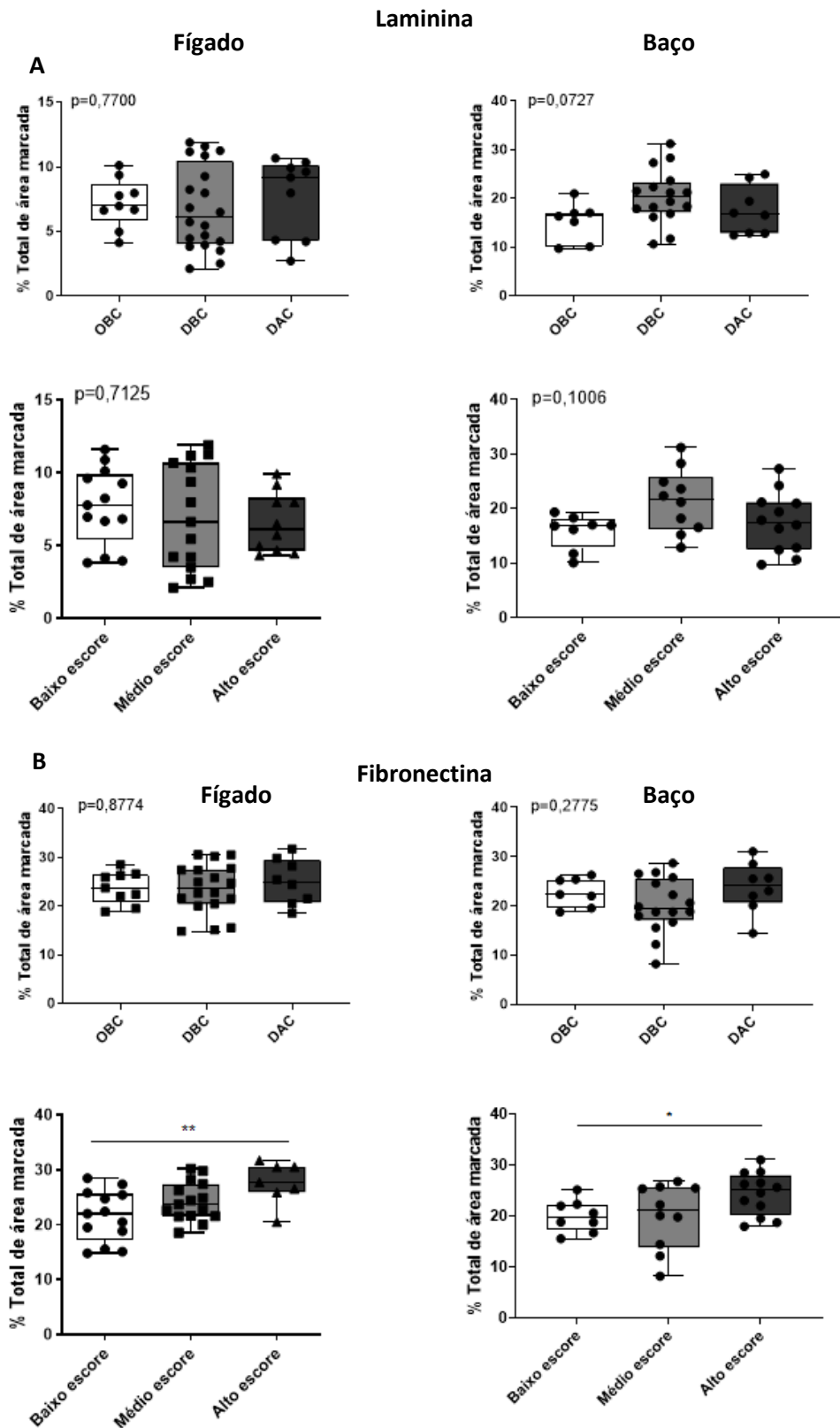


Figura 17: Representação gráfica do percentual de área marcada para laminina e fibronectina nos diferentes grupos de acordo com o escore clínico. (OBC) organizado e baixa carga, (DBC) desorganizado e baixa carga, (DAC) desorganizado e alta carga. A. Percentual de área de deposição de laminina, e B. fibronectina nos grupos de acordo com diferentes escores clínicos: baixo (escore 0 a 2), médio (escore 3 a 7) e alto (escore 8 em diante). Média da área marcada de 5 campos diferentes de cada animal. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$. ANOVA, Kruskal-Wallis test com teste de Dunn para comparações múltiplas.

Para determinar a expressão de moléculas inflamatórias marcamos pela técnica de imuno-histoquímica o perfil da expressão de $TNF\alpha$ em cortes de tecido hepático e esplênico (Figura 18). As figuras 18 (A e B) mostram fotos representativas das marcações para $TNF\alpha$ em fígado e as figuras 18 (C e D) em baço, cada uma com seus respectivos controles.

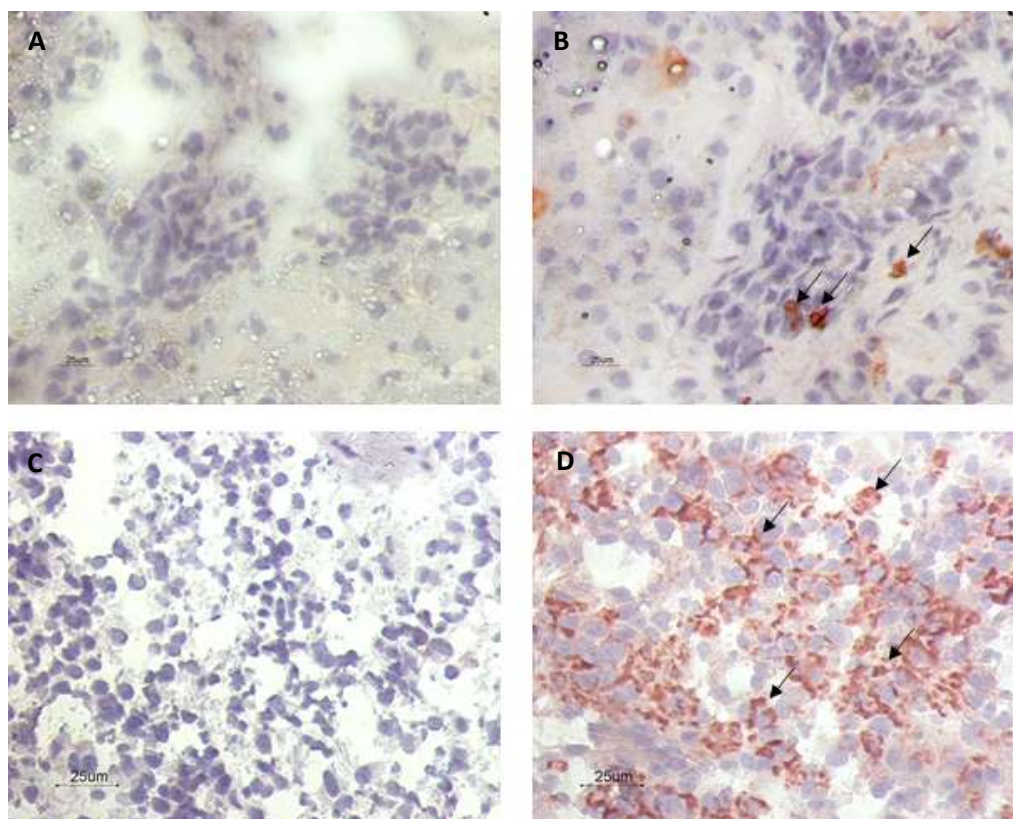


Figura 18: Fotomicrografias mostrando cortes histológicos de fígados e baço de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. A e B mostrando controle negativo e marcação para $TNF\alpha$ em fígado respectivamente. C e D mostrando controle negativo e marcação para $TNF\alpha$ em baço respectivamente. Aumento 400X. Imagens representativas.

Observamos que em campos com presença de reação granulomatosa houve aumento da expressão de $TNF\alpha$ quando comparado a áreas de parênquima (Figura 19A). Por outro lado, não observamos diferenças na expressão de $TNF\alpha$ entre os grupos de organização e carga parasitária do baço ou entre os diferentes escores clínicos tanto em fígado quanto em baço (Figura 19B-C). Também, não observamos alterações na expressão de $TNF\alpha$ tanto em baço quanto em fígado quando comparamos animais com baixa e alta carga parasitária (Figura Suplementar 04).

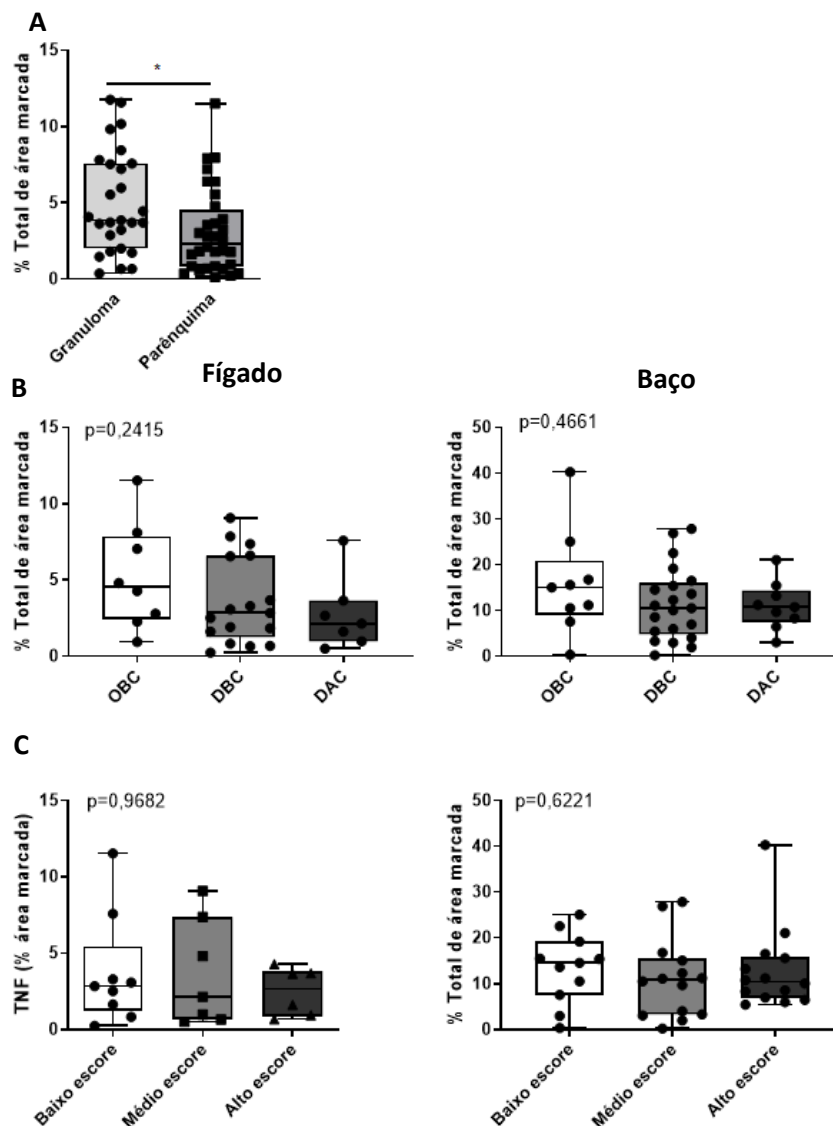


Figura 19: Representação gráfica do percentual de área marcada para TNF α em fígado e baço.

A. Percentual de área marcada para TNF α entre regiões de parênquima e áreas de reação granulomatosa. B. Percentual de área marcada para TNF α em fígado e baço entre animais com baço organizado e baixa carga (OBC), desorganizado e baixa carga (DBC) e desorganizado e alta carga (DAC). C. Percentual de área marcada para TNF α entre animais com baixo, médio e alto escore clínico. Média do percentual de área marcada de 5 campos diferentes de cada animal. (*) $p < 0,05$. Teste Mann Whitney para 2 grupos. ANOVA, Kruskal-Wallis test com teste de Dunn para comparações múltiplas.

A molécula de MAP4K4, alvo de nosso estudo, também foi analisada em cortes de tecido. Infelizmente, por limitações técnicas e de tempo, não foi possível a sua análise em tecido esplênico e, por esse motivo, apresentaremos apenas os dados em tecido hepático. A avaliação da expressão de MAP4K4 utilizando imuno-histoquímica foi realizada em áreas de parênquima, onde foi possível observar os hepatócitos e

sinusóides (Figuras 20A e B) e em áreas onde havia aglomeração celular visualmente semelhantes a uma reação granulomatosa (Figuras 20C e D).

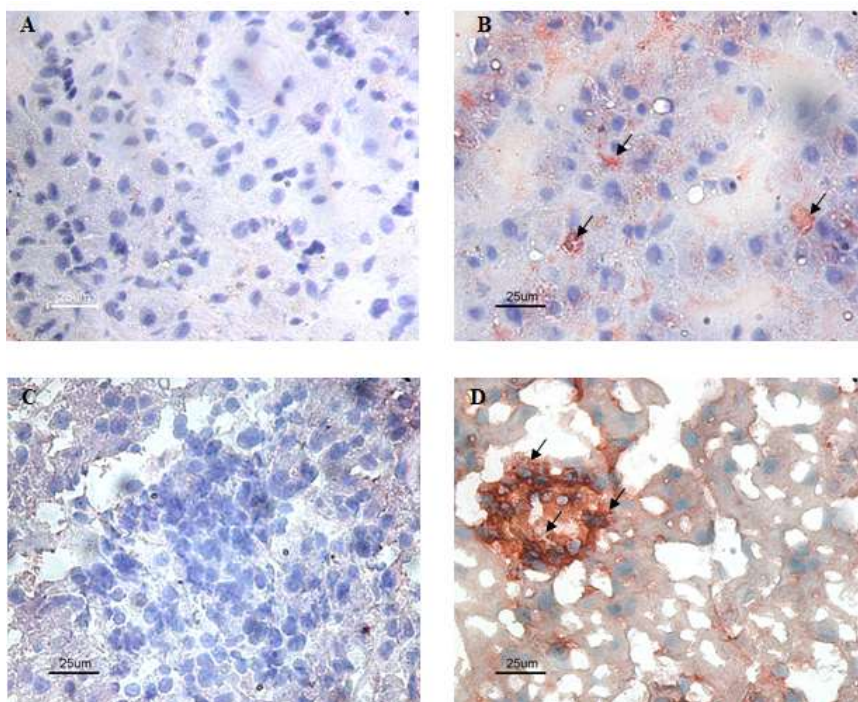


Figura 20: Fotomicrografias mostrando a expressão de MAP4K4 em cortes histológicos de fígados de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. A e B mostrando controle negativo e marcação para MAP4K4 respectivamente em parênquima, aumento 400X; C e D mostrando controle negativo e marcação para MAP4K4, em área de reação granulomatosa respectivamente, as setas marcam locais de reação positiva para MAP4K4. Aumento 400X. Imagens representativas.

Assim como os marcadores anteriores, a análise do percentual de área marcada para MAP4K4 foi realizada. Não foram observadas diferenças significativas na porcentagem da área marcada pela MAP4K4 entre os grupos de baixa e alta carga parasitária (Figura Suplementar 05).

Da mesma forma que o observado na análise da expressão de $TNF\alpha$, ao analisar campos com presença ou ausência de reação granulomatosa, verificou-se aumento significativo na marcação para MAP4K4 em áreas com presença de granuloma (Figura 21A). Não foram observadas diferenças na expressão de MAP4K4 quando animais com diferentes níveis de organização e carga do baço ou entre os diferentes escores clínicos foram comparados (Figura 21B e C).

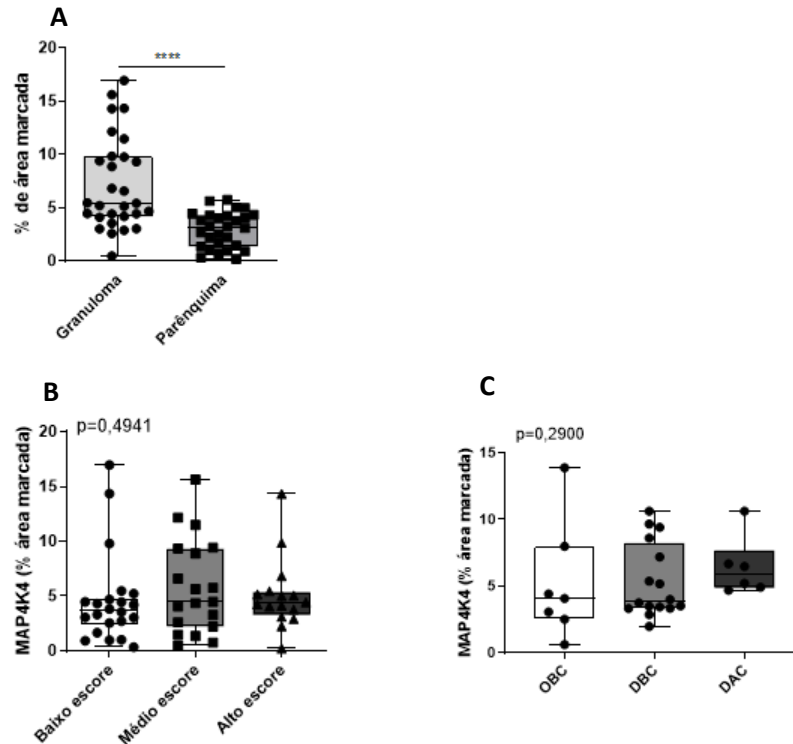


Figura 21: Representação gráfica do percentual de área marcada para MAP4K4 em fígado de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. A. Percentual de área marcada para MAP4K4 entre regiões de parênquima e áreas de reação granulomatosa. B. Percentual de área marcada para MAP4K4 entre animais com baixo, médio e alto escore clínico C. Percentual de área marcada para MAP4K4 entre animais com baço organizado e baixa carga (OBC), desorganizado e baixa carga (DBC) e desorganizado e alta carga (DAC). Média do percentual de área marcada de 5 campos diferentes de cada animal. (****) $p < 0,001$. Teste Mann-Whitney para 2 grupos. ANOVA, Kruskal-Wallis test com teste de Dunn para comparações múltiplas.

Por fim, fomos investigar em qual tipo celular as moléculas de MAP4K4 e de $TNF\alpha$ seriam expressas, analisando de forma qualitativa através da técnica de imunofluorescência. Observamos que tanto a marcação para MAP4K4 quanto o $TNF\alpha$ estava intimamente associada a macrófagos e que provavelmente são essas células as maiores responsáveis pela sua expressão em tecido hepático (Figura 22).

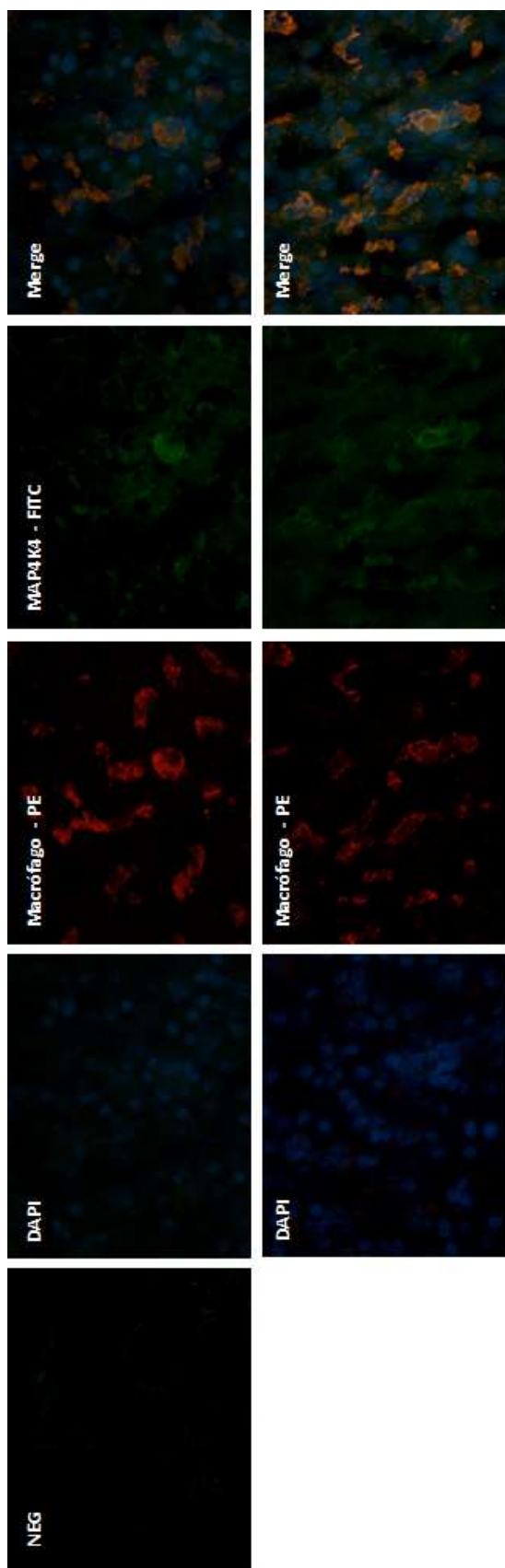


Figura 22: Identificação por imunofluorescência da presença de MAP4K4, TNF α e macrófagos em fígado de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. Macrófagos+ marcados em vermelho (PE), MAP4K4 e TNF α marcados em verde (FITC) e núcleos celulares marcados em azul (DAPI). Merge marca a sobreposição de imagens, mostrando MAP4K4 e TNF α associados à marcação de macrófago

6.6. Análise da expressão gênica de moléculas inflamatórias em fígado e baço de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*

Nosso último ponto foi avaliar se a infecção por *Leishmania infantum* é capaz de promover alterações na via de sinalização de MAP4K4 e, esta, levar a consequências na resposta imune favorecendo ou não a infecção. Não observamos alterações na expressão de CCL-2 no fígado independente da separação de grupos experimentais (Figura 23A), ou quando separamos os grupos pela carga parasitária em ambos os órgãos estudados (Figuras Suplementares 06 e 07). Por outro lado, identificamos aumento da expressão de CCL-2 em animais com baço desorganizado e alta carga parasitária quando comparados a animais com baço organizado e baixa carga parasitária (Figura 23B). Também, quando separamos os grupos por evolução clínica da doença, notamos que animais com médio escore clínico apresentaram alta expressão de CCL-2 nos esplenócitos quando comparados a animais de baixo e alto escore clínico (Figura 23D).

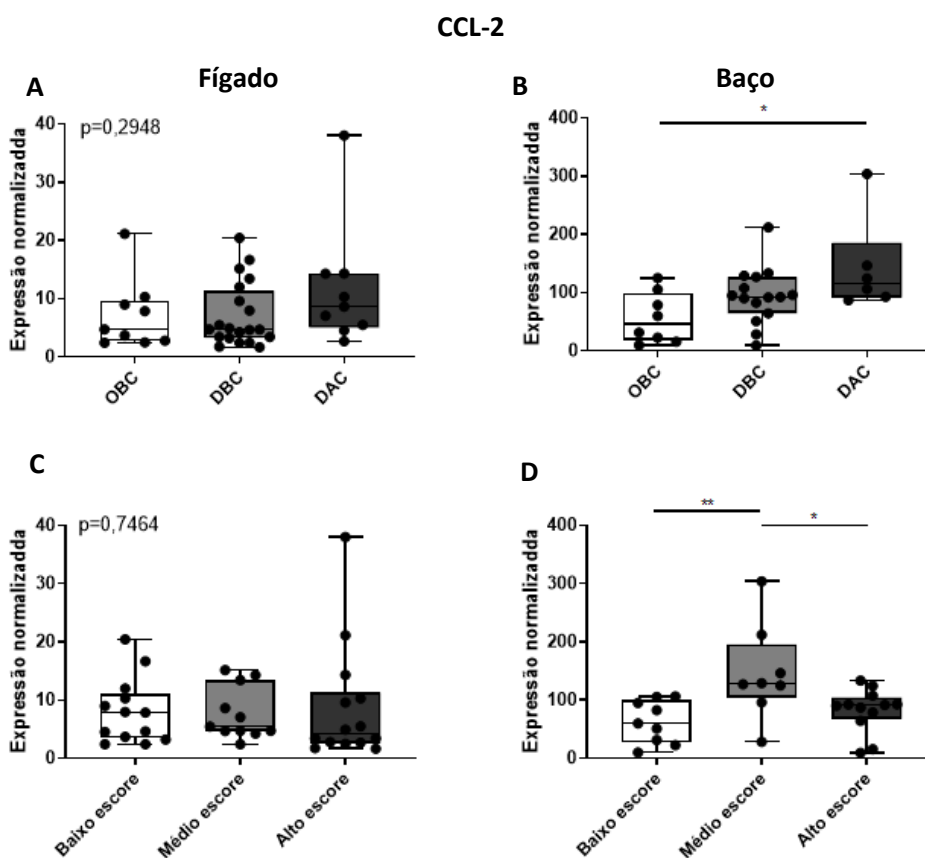
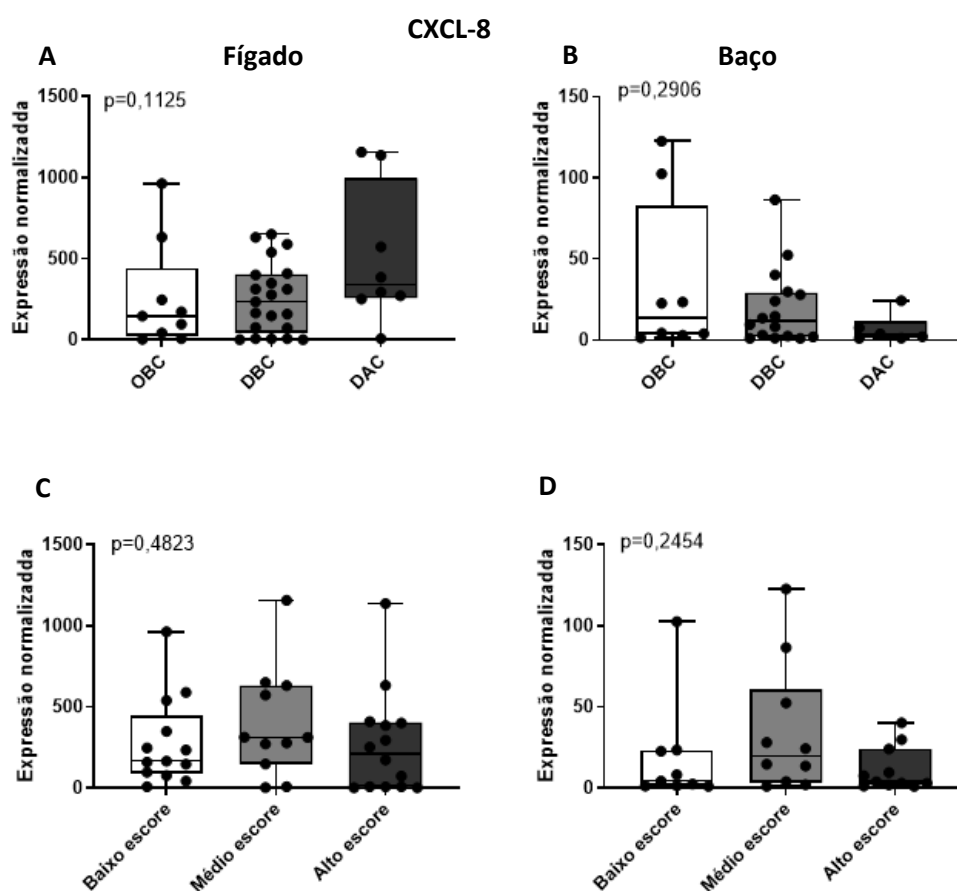


Figura 23: Expressão gênica normalizada de CCL-2 do fígado de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. Análise *ex-vivo* por qPCR dos níveis de mRNA do fígado e baço de cães classificados de acordo com a organização e carga parasitária do baço e o escore clínico. A e C

expressão normalizada de CCL-2 em fígado separados pela organização do baço e escore clínico respectivamente. B e D expressão normalizada de CCL-2 em baço separados pela organização do baço e escore clínico respectivamente. Valores de expressão normalizados para os genes constitutivos HPRT e GAPDH. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$. ANOVA, Kruskal-Wallis test com teste de Dunn para comparações múltiplas. Teste Mann-Whitney para dois grupos.

Não observamos no fígado e no baço, diferenças significativas na expressão de CXCL-8 entre animais com baixa e alta carga parasitária (Figuras Suplementares 06 e 07). Da mesma forma, não foram observadas diferenças na expressão de CXCL-8, em ambos os órgãos, quando os grupos foram separados quanto a organização e carga parasitária do baço ou pelos diferentes escores clínicos dos animais (Figura 24A - D)



A seguir, com a finalidade de observar o perfil inflamatório predominante em nosso grupo experimental, fomos avaliar a expressão de citocinas que pertencem ao painel de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e citocinas pró-inflamatórias, aqui contempladas com o IFN γ e o TNF α . Ao compararmos os grupos de diferentes organizações do baço e os escores clínicos, não observamos diferenças na expressão da citocina IL-10 e IFN γ tanto em fígado quanto em baço (Figura 25A - H) ou quando analisamos dividindo os grupos entre as cargas parasitárias de cada órgão (Figuras Suplementares 06 e 07).

IL-10

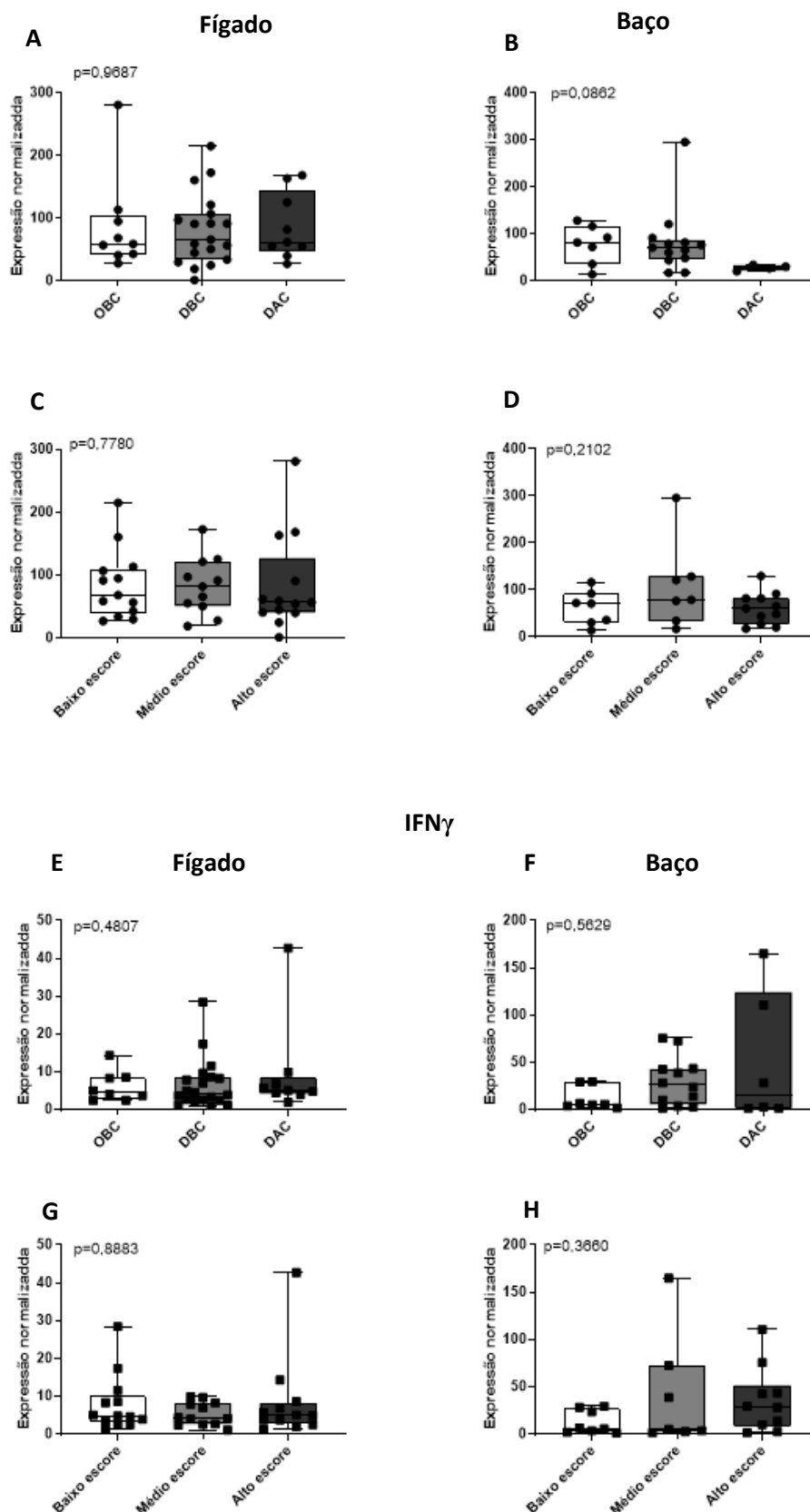


Figura 25: Expressão gênica de IL-10 e IFN γ no fígado e no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Análise *ex-vivo* por qPCR dos níveis de mRNA do fígado e baço de cães classificados de acordo com a organização e carga parasitária do baço e o escore clínico. A e C expressão normalizada de IL-10 em fígado separados pela organização do baço e escore clínico respectivamente. B e D expressão normalizada de IL-10 em baço separados pela organização do baço e escore clínico

respectivamente. E e G expressão normalizada de $IFN\gamma$ em fígado separados pela organização do baço e escore clínico respectivamente. F e G expressão normalizada de $IFN\gamma$ em baço separados pela organização do baço e escore clínico respectivamente. Valores de expressão normalizados para os genes constitutivos HPRT e GAPDH. ANOVA, Kruskal-Wallis test com teste de Dunn para comparações múltiplas. Teste Mann Whitney para dois grupos.

Por outro lado, ao analisarmos a expressão normalizada de $TNF\alpha$, identificamos aumento na expressão desta citocina no fígado de animais que apresentaram o baço desorganizado e alta carga quando comparados aos animais de baço organizado e baixa carga (Figura 26A e C). Quando estudamos a expressão de $TNF\alpha$ no baço, animais com médio escore clínico apresentaram maior expressão desta citocina quando comparados a animais de baixo e alto escore (Figura 26B e D).

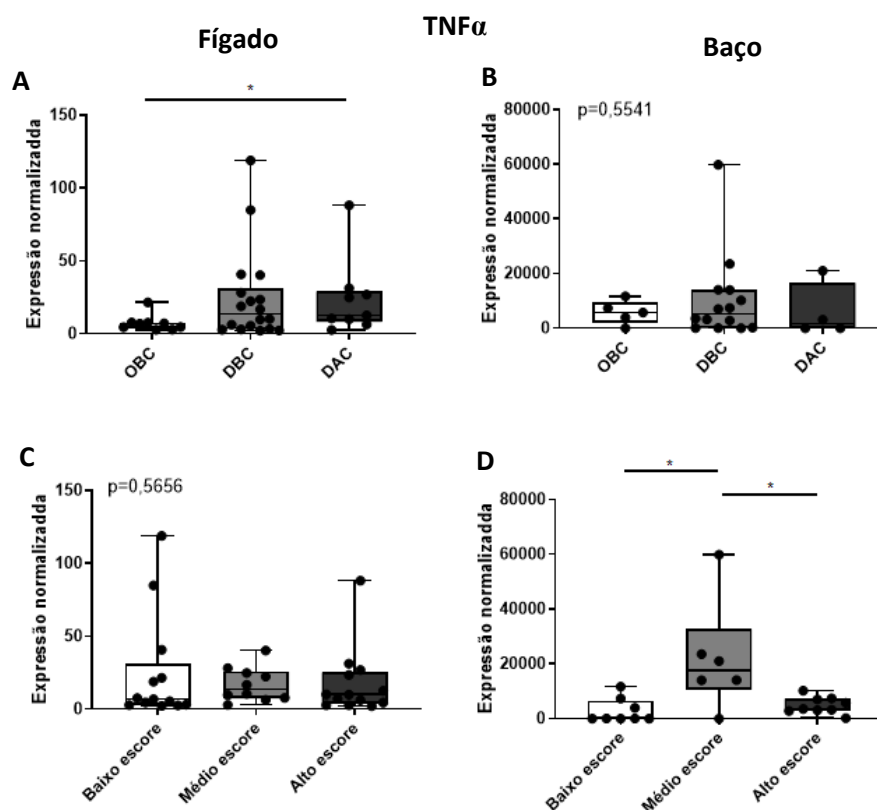


Figura 26: Expressão gênica da $TNF\alpha$ no fígado e no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Análise *ex-vivo* por qPCR dos níveis de mRNA do fígado e baço de cães classificados de acordo com a organização e carga parasitária do baço e o escore clínico. A e C expressão normalizada de $TNF\alpha$ em fígado separados pela organização do baço e escore clínico respectivamente. B e D expressão normalizada de $TNF\alpha$ em baço separados pela organização do baço e escore clínico respectivamente. Valores de expressão normalizados para os genes constitutivos HPRT e GAPDH. (*) p < 0,05. ANOVA, Kruskal-Wallis test com teste de Dunn para comparações múltiplas. Teste Mann-Whitney para dois grupos.

Observamos que no fígado de animais com alto escore clínico, a expressão da MAP4K4 estava diminuída quando comparada a animais que apresentaram baixo escore clínico (Figura 27C) o mesmo não foi observado no baço (Figura 27D). De modo contrário, quando separamos os grupos pela organização e carga parasitária, identificamos o baço de animais que apresentaram a polpa branca desorganizada e baixa carga apresentaram menor expressão de MAP4K4 quando comparados a animais de baço organizado e baixa carga e com animais de baço desorganizado e alta carga (Figura 27B). Nenhuma diferença foi observada no fígado desses animais quando avaliados sob os mesmos parâmetros (Figura 27A).

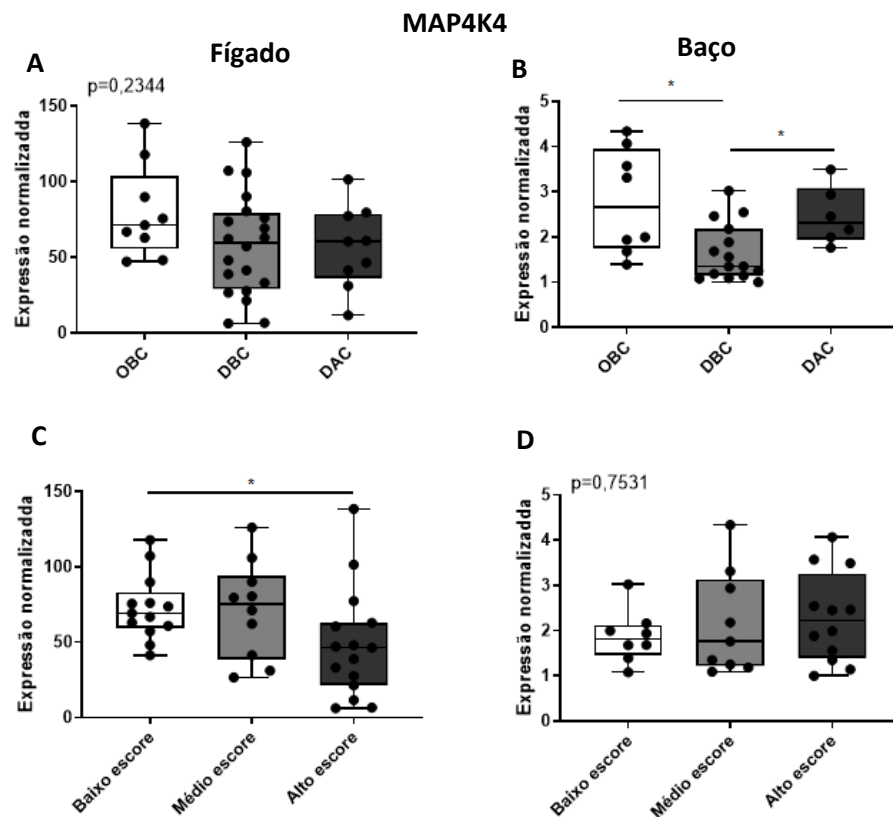


Figura 27: Expressão gênica da MAP4K4 no fígado e no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Análise *ex-vivo* por qPCR dos níveis de mRNA do fígado de cães classificados de acordo com o escore clínico. A e C expressão normalizada de MAP4K4 em fígado separados pela organização do baço e escore clínico respectivamente. B e D expressão normalizada de MAP4K4 em baço separados pela organização do baço e escore clínico respectivamente. Valores de expressão normalizados para os genes constitutivos HPRT e GAPDH. (*) p < 0,05. ANOVA, Kruskal-Wallis test com teste de Dunn para comparações múltiplas. Teste Mean-Whitney para dois grupos.

Quadro 01: Resumo de resultados sinais clínicos e histologia									
Sinais clínicos	Escore clínico	Separação de grupos pela carga parasitária	Separação de grupos pela organização do baço	União de resultados: grupos carga parasitária + organização do baço	Histologia do Fígado	Enzimas hepáticas	Imuno-histoquímica Fígado	Imuno-histoquímica Baço	
Ceratoconjuntivite 23,5%	Baixo escore (N = 13, 31,7%)	Fígado	24,4% apresentou polpa branca organizada.	Baço organizado e baixa carga: N=10	Infiltrado inflamatório periportal: N=56,9%	Não houve diferenças significativas entre os grupos estudados.	Fibronectina Baixo escore / ↑Alto escore	Fibronectina Baixo escore / ↑Alto escore (*)	
Linfadenpatia 23,6%		Baixa carga: N=29 Alta carga: N=12			Infiltrado inflamatório perivascular: N=48,7%				
Alopecia 38,2%	Médio escore (N = 15; 36,6%)	Baço	75,6% apresentou algum grau de desorganização	Baço desorganizado e baixa carga: N=22	Degeneração vacuolar: N=63,4		TNF α Pareng/ ↑Gran (*)	Não foram observadas diferenças na expressão de TNF α entre os grupos estudados.	
Emagrecimento 41,2%					Congestão: N=21,9%		MAP4K4 Pareng/ ↑Gran (****)		
Dermatite 67,6%	Alto escore (N = 13, 31,7%).	Baixa carga: N=32 Alta carga: N=9							
Onicogribose 79,4%									

*O ensaio de imuno-fluorescência sugere que TNF α e MAPK4 estão intimamente associadas aos macrófagos

Quadro 01: Resumo resultados de sinais clínicos e histológicos no fígado e no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum*. (·) p <0,05. (**) p <0,01. (****) p <0,001. (/): Indica presença de diferença significativa entre os marcadores separados por barra. (†): Indica entre os marcadores separados por barra, aquele que apresentou expressão elevada quando comparado ao seu par. ANOVA, Kruskal-Wallis test com teste de Dunn para comparações múltiplas. Teste Mean-Whitney para dois grupos.

Quadro 02: Resumo de resultados da expressão gênica											
CCL-2		CXCL-8		IL-10		IFN γ		TNF α		MAP4K4	
Fígado	Baço	Fígado	Baço	Fígado	Baço	Fígado	Baço	Fígado	Baço	Fígado	Baço
Não foram observadas alterações entre os grupos estudados.	OBC / ↑DAC (*)	Não foram observadas alterações entre os grupos estudados.	Não foram observadas alterações entre os grupos estudados.	Não foram observadas alterações entre os grupos estudados.	Não foram observadas alterações entre os grupos estudados.	Não foram observadas alterações entre os grupos estudados.	Não foram observadas alterações entre os grupos estudados.		Baixo escore / ↑Médio escore (*)	↑Baixo escore / Alto escore (*)	↑OBC /DBC (*)
Não foram observadas alterações entre os grupos estudados.	Baixo escore / ↑Médio escore (**)	Não foram observadas alterações entre os grupos estudados.	Não foram observadas alterações entre os grupos estudados.	Não foram observadas alterações entre os grupos estudados.	Não foram observadas alterações entre os grupos estudados.	Não foram observadas alterações entre os grupos estudados.	Não foram observadas alterações entre os grupos estudados.	OBC / ↑DAC (*)	↑Médio escore / Alto escore (*)		DBC / ↑DAC (*)
	↑Médio escore / Alto escore (*)										

Quadro 02: Resumo resultados da expressão gênica de CCL-2, CXCL-8, IL-10, IFN γ , TNF α e MAP4K4 no fígado e no baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. Análise *ex-vivo* por qPCR dos níveis de mRNA do fígado e baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. (*) p <0,05. () p <0,01. (/): Indica presença de diferença significativa entre os marcadores separados por barra. (↑): Indica entre os marcadores o que apresentou expressão elevada quando comparado ao seu par. ANOVA, Kruskal-Wallis test com teste de Dunn para comparações múltiplas. Teste Mean-Whitney para dois grupos.**

7. DISCUSSÃO

Neste trabalho, buscamos estudar uma possível relação entre a resposta granulomatosa/inflamatória e a expressão de MAP4K4, CXCL-8, CCL-2, TNF α , IFN γ , e IL-10 no fígado e no baço de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Inicialmente, observando que a carga parasitária de ambos os órgãos não seria um bom parâmetro para separação dos grupos experimentais, passamos então a fazer as análises dos nossos dados pela organização e carga parasitária do baço e pelo escore clínico dos animais. Os dados estudados revelaram aumento do número de células por granuloma e de granuloma por milímetro quadrado no fígado de animais com baço desorganizado e alta carga parasitária. A imuno-histoquímica revelou aumento na deposição de fibronectina em fragmentos de fígado e baço de animais que apresentaram um alto escore clínico, quando comparados a animais de baixo escore. Além disso, demonstramos que as moléculas de MAP4K4 e TNF α estão intimamente relacionadas aos macrófagos hepáticos. As análises moleculares mostraram que houve diferenças significativas entre órgãos e grupos experimentais para as moléculas de CCL-2, TNF α e MAP4K4. Animais com médio escore clínico apresentaram maior expressão de CCL-2 e TNF α no baço quando comparados a animais de baixo e alto escore. Essas duas moléculas estavam aumentadas no fígado e no baço que apresentavam alta desorganização da polpa branca e carga quando comparados a animais de baço organizado e baixa carga parasitária. Por fim, a molécula de MAP4K4 encontrava-se diminuída em animais com baço desorganizado e baixa carga e no fígado de animais com alto escore clínico. Os dados até aqui apresentados mostram que a MAP4K4 pode estar envolvida no desbalanço imunológico entre órgãos e encontra-se ativada em diferentes momentos da infecção.

Trabalhos que utilizam modelos experimentais controlados que visam o entendimento da patogênese e formação da resposta imune granulomatosa na leishmaniose, apresentam divergências entre si e nem sempre são a melhor maneira de investigar uma doença que acontece naturalmente em outras espécies como o cão (Madeira et al., 2003; Murray, 2001). Por outro lado, modelos de infecção natural, em indivíduos não isogênicos, podem refletir melhor o que acontece na natureza (Jones et al., 2015; Sarasa & Pesini, 2009). É claro que em leishmaniose, o modelo canino naturalmente infectado, contribui não apenas para o entendimento da doença em humanos, mas também ajuda a responder questões sobre o papel dos cães como

animais reservatórios na LV, bem como o porquê de programas de eutanásia desses animais, em determinadas regiões, não impactarem na redução do número de novos casos em seres humanos (Costa et al., 2013).

Embora seja uma doença sistêmica, e que possa acometer diversos órgãos, o baço, seguido do fígado, têm sido exaustivamente estudados devido a observação de alterações nas suas características histológicas e funcionais (Hermida et al., 2018). Além disso, tanto em modelos experimentais como em estudos de infecção natural, o baço apresentou alterações progressivas e bem definidas na polpa branca. Estas alterações podem ser de pouco a muito significativas e estarem associadas ao aumento da carga parasitária e piora no escore clínico do animal (Silva et al., 2018; Hermida et al., 2018). De modo contrário, em modelo murino, o fígado parece ter um curso inverso ao baço, apresentando diminuição da carga parasitária e melhora no status histológico com a evolução clínica da doença (Mukherjee et al., 2003; Murray, 2001). Em nosso grupo experimental, a diversidade de estágios clínicos entre animais e características próprias ao tecido hepático não nos permitiu fazer um estadiamento da doença ou mesmo separação de grupos experimentais que fossem possíveis de serem analisados com segurança a partir de dados obtidos apenas do fígado. Trabalho recente, que buscou associar o escore clínico ao escore histológico do fígado de cães naturalmente infectados com *L. infantum*, fez a separação de parte de seus grupos experimentais por meio da carga parasitária observada em baço (Lima et al., 2019). Assim, pelas características do fígado de controlar de forma parcial a infecção e, do baço, onde o aumento da carga parasitária está associado à desorganização tecidual e progressão da doença, passamos a analisar os nossos dados de fígado separando os grupos pela carga parasitária e organização da polpa branca do baço, além de tentar associar nossos dados com o escore clínico desses animais.

Ainda que haja tropismo do parasito por diversos órgãos como baço, linfonodos e medula óssea (Harhay et al., 2011), o fígado continua sendo uma incógnita no curso da Leishmaniose Visceral Canina (LVC), apresentando uma resposta imune própria e diferente dos demais órgãos (Rodríguez-Cortés et al., 2016). Outras patologias que também têm como característica a formação de granulomas, como a tuberculose, o entendimento sobre a formação do granuloma, os tipos celulares envolvidos, bem como mecanismos de defesa têm sido de vital importância para o entendimento da

patogênese de enfermidades que cursem com a presença de granulomas (Guirado & Schlesinger, 2013; Kaye et al., 2016).

Apesar de controlar melhor o processo inflamatório do que o baço, o fígado de cães não se mostra capaz de promover a cura parasitológica como no modelo murino, isto talvez seja pelo fato de que outros órgãos, como medula óssea e linfonodos ou até mesmo o baço possam estar funcionando como fonte de liberação de parasitos e assim mantendo a formação constante de granulomas. Estudo com cães infectados naturalmente com *L. infantum* e com baixa carga parasitária, apresentaram uma robusta formação de granulomas organizados no fígado, enquanto que animais com alta carga apresentaram granulomas mal formados e pouco evidentes (Sanchez et al., 2004). Outra associação com relação à formação de granulomas também foi observada em estudos *in vitro* e em pacientes onde granulomas formados principalmente por células epitelióides e multinucleadas foram associados como benéficos e com boa resposta, enquanto que a presença de necrose e células polimorfas são indícios de uma resposta deficitária do sistema imune (Pampiglione et al., 1974). De forma contrária, Lima et al. (2019) observaram que fígados de cães com granulomas bem formados e organizados tiveram parasitológico positivo para *L. infantum* e aumento da carga parasitária em baço. Esses achados foram relacionados a inabilidade do sistema imune em responder a infecção, contradizendo o que tem sido descrito pela literatura até o momento (Lima et al., 2019).

No presente trabalho, observamos aumento do número de células por granuloma e de granulomas por mm² em animais com baço desorganizado e alta carga neste órgão. Embora tenhamos encontrado maior celularidade nos granulomas hepáticos de animais DAC, não identificamos diferenças na expressão de mRNA de quimiocinas como a CCL-2 e a CXCL-8 que justifique uma maior atração de células para este órgão e consequente formação de granulomas. Entretanto, a expressão dessas quimiocinas se manteve em quantidade considerável em todos os grupos analisados no fígado, sugerindo que a entrada de células como neutrófilos e monócitos provindos da circulação possa ter acontecido de forma constante. Em modelo experimental, o curso da leishmaniose e a carga parasitária em fígado e baço acontece com picos de parasitismo em momentos diferentes (Mukherjee et al., 2003). Enquanto o fígado parece ter um aumento precoce da carga parasitária, o baço começa a ter o seu pico quando o fígado já está se recuperando (Mukherjee et al., 2003). Embora em nosso

modelo não sabemos em que momento da infecção nossos animais estavam, a separação dos grupos pela carga parasitária em cada órgão como *high* e *low*, nos sugere que grande parte dos animais contidos em nosso trabalho estão em início de infecção. Além disso, os animais que compõem este trabalho são semi-domiciliados e provenientes de área endêmica e, portanto, a reinfecção por picadas de flebotomíneos também pode justificar a manutenção na liberação de quimiocinas de fase aguda como a CXCL-8.

Já no baço, a expressão gênica de CCL-2 aumentou de forma gradativa conforme a desorganização e carga parasitária aumentavam. Também foi observado aumento na expressão desta quimiocina e de $TNF\alpha$ em animais com médio escore clínico, mas não em animais que tinham a sua condição clínica piorada ou em animais DAC. É possível que de forma precoce, células do sistema imune passem a apresentar características de exaustão, não se tornando eficazes em eliminar o patógeno. Souza et al., (2019) observou que animais com baço OBC apresentaram alta expressão de moléculas de exaustão como CTLA-4, PD-L1 e LAG-3, sugerindo que haja uma modulação do sistema imune logo nos momentos iniciais da infecção. Em nosso trabalho encontramos no baço de animais OBC níveis aumentados da MAP4K4, quando comparado a animais com maior grau de desorganização. Estando envolvida em diversos processos patológicos, não é difícil imaginar que esta via de sinalização também esteja relacionada ao processo precoce de exaustão celular. Embora não tenhamos encontrado diferenças da MAP4K4 no fígado de animais OBC quando comparados a animais DBC e DAC, notamos que mesmo com a dispersão, houve um aparente aumento desta molécula em animais com baço organizado e baixa carga.

Ao contrário do fígado, onde apenas notamos uma tendência de aumento, no baço, a MAP4K4 encontrou-se aumentada em animais OBC e DAC quando comparados a animais DBC. É também no baço, como órgão linfóide secundário, onde constantemente há a recirculação de linfócitos e outras células do sistema imune, que reconhecem agentes patogênicos e ali são ativadas (Pabst & Westermann, 1991). Assim, essa diferença na expressão da MAP4K4 pode ser decorrente da constante chegada de células em diferentes momentos da infecção neste órgão. Contudo, essa diminuição da resposta inflamatória em momentos cruciais da infecção, pode ser uma das peças que falta para entender o porquê fígado e baço, além de não conseguirem eliminar o patógeno, respondem de forma tão diferente. Em modelo onde se buscou

avalizar a citotoxicidade de células T CD8 em combater células tumorais, animais deficientes em MAP4K4 apresentaram uma maior frequência de células T CD8 citotóxicas além de menor expressão de PD-L1 e CTLA-4 (Esen et al., 2020). Este mesmo estudo demonstrou que células do sistema imune possuem alta expressão de MAP4K4 incluindo monócitos e células B (Esen et al., 2020).

Em processos inflamatórios é comum o aumento na deposição de componentes da matriz extracelular em tecidos. Essa deposição pode fisiologicamente auxiliar na adesão e migração celular e conseqüentemente na formação da resposta imune (Simon & Bromberg, 2017; Yáñez et al., 2016). Estudos têm demonstrado que alguns patógenos, incluindo leishmanias, são capazes não apenas de se ligar aos componentes da matriz extracelular, mas também de degradá-los ao seu redor interferindo na resposta imune e favorecendo a infecção (Silva et al., 2018; Silva-almeida et al., 2012). No presente trabalho verificamos que animais que apresentaram um alto escore clínico também tinham um maior percentual de área marcada em fígado e baço para fibronectina, quando comparados aos animais de baixo escore. Já foi descrita pela literatura, a associação entre a infecção por *L. infantum* e a presença de danos teciduais caracterizados pela reação granulomatosa e pelo aumento da deposição de moléculas de matriz extracelular, como laminina, fibronectina e colágeno tanto no fígado quanto no baço de cães (Silva et al., 2018; Melo et al., 2009).

A formação de tecido fibroso está relacionada com a perda da função do órgão (Yang & Seki, 2015) ainda que não tenhamos visto, dentro do nosso grupo experimental, lesões hepáticas muito acentuadas, o aumento na deposição de fibronectina em animais com avançada evolução clínica, sugere que o processo de injúria estava em curso. Silva et al. (2018) observaram que animais com baço com média a intensa desorganização possuíam um menor número de folículos linfoides e de células T e B na polpa vermelha. Os autores sugerem ainda que essa desorganização impediu ou dificultou o transito celular para a polpa branca onde acontece a apresentação de antígenos e ativação celular (Silva et al., 2018; Stäger & Bankoti, 2012). Em nosso trabalho encontramos diminuição da expressão de CCL-2 e de TNF α em animais com alto escore clínico quando comparados a animais de médio escore. Essa diminuição na expressão dessas moléculas, em momento tão crítico da infecção poderia ser explicada pela injúria tecidual observada nos animais desse grupo, já que também apresentaram maior deposição de fibronectina não

apenas em baço, mas também em fígado. Esse dano tecidual pode ter afetado não apenas a atração, mas também ter dificultado o trânsito de células inflamatórias produtoras de $TNF\alpha$ para o local. Ainda que tenhamos observado que animais com alto escore clínico apresentaram menor expressão de MAP4K4, foi possível notar que macrófagos foram os principais responsáveis pela expressão dessa quinase no ensaio de imunofluorescência. Durante processos infecciosos do fígado, não apenas as células residentes são recrutadas para combater a infecção, mas também monócitos circulantes. A maior deposição de fibronectina e em animais com alto escore clínico acompanhada de menor expressão da MAP4K4 nesses mesmos animais poderia ter sido causada por um menor aporte de células migrantes para este órgão, principalmente monócitos, já descritos por apresentarem alta expressão da MAP4K4.

A análise da expressão gênica revelou maior expressão de $TNF\alpha$ no fígado de animais DAC quando comparados a animais OBC, o mesmo não foi observado com MAP4K4 que se manteve constante nessa análise. Isso pode indicar que o aumento nos níveis de MAP4K4 talvez ocorra de forma precoce na infecção e, posteriormente, por mecanismos ainda não esclarecidos do fígado, os seus níveis ficariam estáveis. Essa estabilização do fígado talvez possa ser explicada pela sua capacidade de regeneração e manutenção da homeostase que permite a este órgão controlar processos inflamatórios (Lang & Lang, 2015; Robinson et al., 2016). Esse fato talvez explique também o motivo de MAP4K4 estar mais expressa no fígado do que no baço e ainda assim ter menor expressão de $TNF\alpha$. Não podemos também deixar de considerar as limitações do nosso estudo, já que não foi possível incluir um grupo de animais controle. É possível que em uma análise do fígado e do baço de animais não infectados, a expressão de algumas dessas moléculas estejam em níveis muito basais ou mesmo ausentes indicando que o processo inflamatório persiste e é constante. Em nossos estudos, não observamos aumento expressivo de $TNF\alpha$ de forma generalizada, por imuno-histoquímica, em cortes de tecido hepático e esplênico. Por outro lado, aumento da expressão proteica de $TNF\alpha$ e MAP4K4 apenas pôde ser observado em áreas com reação granulomatosa, enquanto que áreas de parênquima hepático não se mostraram inflamadas. O fígado tem grande capacidade de manter a homeostase mesmo com o constante desafio de eliminar partículas e patógenos provindos da circulação entérica (Robinson et al., 2016). Essa capacidade do fígado em regular seus processos inflamatórios impede uma resposta exacerbada não

apenas localmente, mas também sistêmica (Robinson et al., 2016). Contudo, as diferentes maneiras de baço e fígado lidarem com a infecção talvez comprometam a resolução da doença. Em doenças virais, o fígado pode se favorecer de sua localização recebendo diretamente da veia esplênica células T CD8 primadas do baço, que irão auxiliar nos mecanismos de defesa hepático (Lang & Lang, 2015). Esta também pode ser uma porta de entrada constante de novas células infectadas quebrando o equilíbrio homeostático desse órgão. Essas considerações podem indicar que, diferente do que é observado em modelo murino, onde após duas semanas o fígado desses animais consegue resolver completamente a infecção (Loría-Cervera & Andrade-Narváez, 2014; Murray, 2001), na LVC a reação granulomatosa desenvolvida no início da infecção talvez perdure durante todos os estágios da doença. É possível que em camundongos resistentes à infecção, a resposta inicial seja gradativa, permitindo que o parasito seja eliminado sem que haja injúria ao tecido.

A ação da MAP4K4 tem sido exaustivamente estudada em processos patológicos como câncer, doenças cardiovasculares e metabólicas como o diabetes (Flach et al., 2015, 2019; Liu et al., 2011). A MAP4K4 pertence a uma família de quinases com mais de trinta membros e possui diversas isoformas presentes em todos os tecidos analisados até hoje (Yao et al., 1999). Além disso, MAP4K4 está associada com exacerbação da resposta inflamatória induzida por $TNF\alpha$ e o bloqueio desta via de sinalização foi capaz de reduzir lesões vasculares em modelo de arteriosclerose (Flach et al., 2015). Embora diversas ações da MAP4K4 já tenham sido descritas, a concentração de suas isoformas não é a mesma nos diferentes tecidos e tipos celulares (Gao et al., 2016). Segundo Gao e et al. (2016), estas diferenças podem retornar funções distintas, ainda não conhecidas em cada tipo celular, e o aumento observado da MAP4K4 não acompanhado também de um aumento de $TNF\alpha$ em nosso estudo pode ser mais uma peça desse “quebra-cabeça” que precisa ainda ser melhor esclarecido. Importante ainda salientar que MAP4K4 está envolvida em diversos processos que não apenas citocinas como o $TNF\alpha$ (Chuang et al., 2016). Rao (2015) observou que a forma como a cascata de MAP4K4 irá ser gerada, não depende apenas do tipo celular onde ela é ativada, mas também do compartimento e do microambiente onde essa célula está inserida. Assim, poderíamos estar nos deparando com um evento novo e que precisa ainda ser melhor estudado.

Para o diagnóstico de doença hepatobiliar em cães, são considerados alguns marcadores laboratoriais que podem indicar dano celular (ALT) ou mesmo marcadores que indicam colestase (FA e GGT) (Lawrence, 2017), que é a incapacidade do fluido biliar chegar ao duodeno. Embora existam outras moléculas para análise da função hepática como a Aspartato Aminotransferase (AST), esta se apresenta menos específica e com menor meia vida, em caninos, quando comparada às anteriores (Alvarez & Whittemore, 2009) e por este motivo não foi incluída em nossas análises. Ainda que sejam testes de uso comum na rotina clínica veterinária, é preciso que os resultados sejam avaliados com muita cautela já que a sua interpretação separada de uma boa anamnese e histórico clínico podem levar a prognósticos/diagnósticos errôneos (Lawrence, 2017). Em nosso grupo experimental, encontramos animais com altos níveis de ALT que apresentaram histologia com pouca ou nenhuma alteração. O contrário também pôde ser observado, com análises histológicas de tecido degenerado e níveis de transaminases normais. Embora alterações extra-hepáticas também possam levar a alterações nos níveis enzimáticos, era de se supor que as alterações já observadas em fígado causadas pela LVC fossem acompanhadas por altos níveis do produto de extravasamento celular. Entretanto, embora mais da metade dos animais tenha apresentado algum grau de degeneração hepática, este foi de forma muito leve e discreta e apenas acentuada em alguns, o que talvez explique o baixo número de amostras que apresentaram alterações bioquímicas com presença de marcadores de lesão tecidual. Além disso, apesar de estarem bem acondicionadas, o tempo entre a coleta do material e a realização dos exames foi superior a um ano, o que poderia ser uma limitação aos dados encontrados bem como um viés aos nossos questionamentos. Uma análise posterior com soro recente e grupos bem definidos será de vital importância para incluir estes parâmetros como marcadores de prognóstico na LVC.

A literatura tem evidenciado um padrão de respostas imunes frente a infecção por leishmanias, ora associadas a proteção com um perfil mais inflamatório (TH1) e liberação principalmente de $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$ (Soares et al., 2017), ora associadas à susceptibilidade com um ambiente anti-inflamatório (TH2) envolvendo citocinas como a IL-10 e $TGF\beta$ (Dayakar et al., 2019; Nylén & Sacks, 2007). Contudo, essa diferenciação de respostas bem definidas parece representar melhor modelos experimentais controlados principalmente com leishmaniose tegumentar (Loría-

Cervera & Andrade-Narváez, 2014). Em nosso trabalho, não encontramos relação entre a expressão de IFN γ e IL-10 nos tecidos hepático e esplênico com a carga parasitária (Figuras Suplementares) ou mesmo com a organização do baço ou o escore clínico dos animais. Ainda que alguns estudos tenham atribuído ao IFN γ função essencial para formação de uma resposta que confira resistência e a IL-10 fazendo parte do grupo de citocinas que conferem suscetibilidade (Reiner & Locksley, 1995), outros afirmam que não apenas a IL-10, mas também o IFN γ contribuam para o favorecimento do parasito durante a infecção (Lage et al., 2007). As diferentes espécies de leishmania podem demandar cada uma, por si só, um tipo de resposta diferenciada do organismo para o seu controle. Em modelo utilizando camundongos resistentes (C57Bl/6) à infecção por *L. major*, a formação da resposta com perfil TH1 e presença de IFN γ acontece logo nas primeiras semanas de infecção. Por outro lado, Pinheiro e Rossi-Bergmann (2007) observaram que camundongos C57Bl/6 não eram resistentes a *Leishmania amazonensis* (*L. amazonensis*). Esses autores demonstraram que IFN γ se faz necessário algumas semanas após a infecção para conferir resistência e para a formação de um perfil TH1 (Pinheiro & Rossi-Bergmann, 2007). A não observância de diferenças nos níveis de IFN γ e IL-10 não significa que essas citocinas não tenham importância no curso da LV. Diversos fatores podem ter contribuído para a ausência de significância em nossos resultados. Talvez o principal deles seja a não comparação com amostras não infectadas, o que poderia indicar que tanto IFN γ quanto IL-10 estão aumentadas desde o início da infecção e não variam com o passar do tempo.

Apesar de uma resposta pró-inflamatória estar associada a proteção, animais assintomáticos com perfil TH1 e liberação de citocinas inflamatórias ainda são capazes de transmitir o parasito para o inseto vetor (Solano-Gallego et al., 2011). Outro dado importante e crucial aos nossos questionamentos é que diversos estudos têm associado aumentos nos níveis da MAP4K4 a maiores níveis de TNF α com aumento da resposta inflamatória (Bouzakri et al., 2009; Flach et al., 2019). O que vimos até agora em nosso modelo é que a elevação nos níveis de expressão de MAP4K4 não ocorreu de forma simultânea com o aumento da expressão de TNF α e que isto também não foi capaz de promover aumento proteico de suas moléculas entre os grupos estudados de forma generalizada. Ainda assim, é importante perceber que estamos falando de órgãos com características diferentes, o fígado um órgão

metabólico com grande capacidade regenerativa e reguladora (Robinson et al., 2016). MAP4K4 encontrou-se aumentada no fígado de animais com baixo escore clínico e diminuiu em um momento crítico da doença em animais com alto escore sem impactar na expressão de $TNF\alpha$. É possível que mecanismos homeostáticos estejam ativados e impeçam o aumento da MAP4K4 promovendo inclusive sua diminuição. Contudo, doenças crônicas são capazes que “quebrar” essa estabilidade hepática e a partir daí sim se desenvolver um processo inflamatório com formação inclusive de cirrose hepática (Robinson et al., 2016). Os danos histológicos observados em nossos animais talvez não tenham sido suficientes para promover a quebra dessa homeostasia. Já o baço é um órgão linfóide secundário por onde não somente o trânsito de células é constante, mas também a recirculação das mesmas (Pabst & Westermann, 1991). Aqui, foi observado, que MAP4K4 estava elevada em animais que ainda estavam com o baço organizado e baixa carga e que essa expressão diminuiu em animais DBC. Essa diminuição nos níveis de MAP4K4 observada em animais com baço desorganizado e baixa carga poderia ser devida a outras ações atribuídas a essa quinase como a apoptose. Souza et al., (2019) demonstrou que as células dos animais com baço desorganizado não expressavam apenas moléculas de exaustão, mas também estavam sofrendo um processo de apoptose, o que explicaria a diminuição nos níveis dessa quinase nesse grupo. Ainda, a observação do aumento nos níveis dessa quinase ainda nos primeiros estágios do dano tecidual, no baço, pode sugerir que o perfil de resposta formado não seja crucial para a cura parasitológica, mas sim a intensidade com que a resposta imune é formada.

A expansão policlonal de células B é frequentemente abordada pela literatura e relacionada ao agravamento da doença (Deak et al., 2010). É também no baço onde ocorre a maior parte dessa expansão com produção principalmente de imunoglobulinas M (IgM). Deak et al. (2011) observaram em modelo murino, que a exacerbação da leishmaniose visceral pode estar associada a uma resposta policlonal, com produção inespecífica de imunoglobulinas durante a infecção. Eles observaram que animais deficientes na liberação de imunoglobulinas (IgM) se mostraram resistentes à infecção e que a reconstituição desses animais com IgG ou IgM os tornava suscetíveis à doença. MAP4K4 foi encontrada expressa em altos níveis em células B (Esen et al., 2020). Este dado sugere que a ativação dessa célula por esta via poderia desencadear a expansão policlonal por células B, já observada nos

primeiros momentos de infecção por leishmaniose (Silva-Barrios et al., 2016). Com isso, podemos supor que talvez sejam as células B, no baço, as responsáveis pelas variações nos níveis de MAP4K4 neste órgão. Podemos ainda propor que o uso de um bloqueador de sinalização da MAP4K4 possa criar um ambiente mais regulado já nos primeiros momentos da infecção e que poderia favorecer uma resposta mais direcionada e específica. Outra possibilidade, seria uma associação de um inibidor de MAPK4K4 a uma droga leishmanicida na LV o que poderia minimizar não somente o dano observado no baço e impedir a quebra da estabilidade do fígado, mas possivelmente em outros órgãos como a medula óssea. Dados da literatura têm demonstrado que a maneira como a resposta imune é formada pode definir o curso da infecção (Rossi & Fasel, 2018). É possível que a modulação desta via possa ter efeitos benéficos com melhor prognóstico em um tratamento combinado com a droga parasiticida.

A via de sinalização da MAP4K4 faz parte de uma família de quinases responsável pela modulação de diversas atividades celulares incluindo ativação, proliferação, migração e morte programada (Yao et al., 1999). Tendo sido envolvida como marcador de prognóstico desfavorável, a MAP4K4 foi observada de forma aumentada em processos patológicos como cânceres, diabetes e problemas cardiovasculares (Flach et al., 2015; Liang et al., 2008; Tang et al., 2006). No entanto, até o presente momento se tem pouco ou nenhum conhecimento sobre como esta via de sinalização se comporta em doenças causadas por protozoários. Embora não tenhamos visto correlação entre as moléculas estudadas e a carga parasitária, as diferenças encontradas entre os diferentes grupos e entre órgãos pode indicar uma reação mais compartimentalizada e que esta molécula esteja relacionada a intensificação do processo inflamatório e dano tecidual. Ainda, mesmo que em nosso trabalho anterior, a alta expressão de MAP4K4 estivesse relacionada a animais com alto número de cópias do parasito, o conjunto dos nossos dados sugere que a expressão desta quinase não tem impacto no controle da carga parasitária, mas possivelmente no dano tecidual.

8. Conclusões

- Foi possível classificar os animais clinicamente e separá-los em grupos como baixo escore clínico, médio escore clínico e alto escore clínico;
- A separação dos animais por grupos de alta e baixa carga parasitária não retornou relevância significativa com nenhum dos marcadores analisados;
- A histopatologia do baço permitiu que os animais fossem separados pela organização do tecido esplênico em organizado e desorganizado
- A separação dos grupos pelo escore clínico dos animais e pela organização associada à carga parasitária do baço se mostrou eficiente e permitiu a análise dos marcadores utilizados;
- A contagem de granulomas por milímetro quadrado e de células por granuloma no fígado estava aumentada em animais com baço desorganizado e alta carga;
- O tempo de armazenagem das amostras de soro talvez tenha sido fator limitante para as análises das transaminases e futuros estudos serão necessários;
- O alto escore clínico foi acompanhado pelo maior aumento de deposição de fibronectina tanto em fígado quanto em baço e pode estar associado à diminuição na migração de células efectoras para este órgão e consequente diminuição da expressão de MAP4K4 em animais de escore clínico elevado;
- As expressões proteicas de MAP4K4 e TNF α parecem ocorrer de forma específica e localizada na LVC, sendo o seu aumento apenas em áreas com reação granulomatosa;
- A expressão gênica de CXCL-8 manteve-se relativamente constante em ambos os órgãos e em todos os momentos da infecção e grupos analisados, sugerindo que a entrada de células encontradas nos primeiros estágios da infecção, como neutrófilos, também se manteve constante;
- A expressão gênica de CCL-2 não se alterou no fígado entre os diferentes grupos analisados, sugerindo que pode haver um mecanismo de regulação hepática para entrada de células inflamatórias circulantes neste órgão.
- O aumento da desorganização do baço foi acompanhado de maior expressão gênica de CCL-2 e de MAP4K4 sugerindo que no baço a resposta pode ser mais tardia do que no fígado e de forma mais acentuada;

- A não observância de diferenças, em fígado e baço, entre os diferentes grupos estudados para a expressão de $IFN\gamma$ e IL-10, sugere que possa haver um balanço entre perfis TH1 e TH2 e que aparentemente essas citocinas não estão relacionadas com a expressão da MAP4K4;
- Parece existir um mecanismo de regulação da MAP4K4 no fígado que se encontrou diminuída em animais com alto escore clínico quando comparado a animais de baixo escore;
- $TNF\alpha$ esteve aumentada no fígado de animais com baço DAC e no baço de animais com moderado escore clínico. Essa diferença nos sugere que esses órgãos têm respostas e evoluções diferenciadas durante a infecção;
- MAP4K4 aparentemente encontra-se elevada já nos primeiros estágios clínicos da doença no fígado enquanto que no baço encontrou-se elevada em animais sem desorganização esplênica, sugerindo que seu aumento se dá de forma precoce tanto clínica quanto histologicamente. É possível que ela esteja envolvida com a evolução dos quadros clínico e histológico observados nesses órgãos. O bloqueio dessa via em estudo futuro poderia modular o perfil inflamatório para uma resposta mais específica e direcionada, sendo um auxiliar ao tratamento parasiticida.
- As expressões proteicas de MAP4K4 e $TNF\alpha$ parecem ocorrer de forma específica e localizada na LVC, sendo o seu aumento apenas em áreas com reação granulomatosa;
- A expressão gênica de CXCL-8 manteve-se relativamente constante em ambos os órgãos e em todos os momentos da infecção e grupos analisados, sugerindo que a entrada de células encontradas nos primeiros estágios da infecção, como neutrófilos, também se manteve constante;
- A expressão gênica de CCL-2 não se alterou no fígado entre os diferentes grupos analisados, sugerindo que pode haver um mecanismo de regulação hepática para entrada de células inflamatórias circulantes neste órgão.
- O aumento da desorganização do baço foi acompanhado de maior expressão gênica de CCL-2 e de MAP4K4 sugerindo que no baço a resposta inflamatória pode ser mais tardia do que no fígado e que se associa a um dano tecidual mais intenso;

- A não observância de diferenças, em fígado e baço, entre os diferentes grupos estudados para a expressão de IFN γ e IL-10, sugere que possa haver um balanço entre perfis TH1 e TH2 e que aparentemente essas citocinas não estão relacionadas com a expressão da MAP4K4;
- Parece existir um mecanismo de regulação da MAP4K4 no fígado que se encontrou diminuída em animais com alto escore clínico quando comparado a animais de baixo escore;
- TNF α esteve aumentada no fígado de animais com baço DAC e no baço de animais com moderado escore clínico. Essa diferença nos sugere que esses órgãos têm respostas e evoluções diferenciadas durante a infecção;
- MAP4K4 encontra-se elevada já nos primeiros estágios clínicos da doença no fígado enquanto que no baço encontra-se elevada em animais sem desorganização esplênica, sugerindo que seu aumento se dá de forma precoce tanto clínica quanto histologicamente.
- MAP4K4 foi identificada como uma nova via de sinalização que atua na resposta inflamatório em baço e fígado durante a leishmaniose visceral canina.

9. REFERÊNCIAS

- Alexander, J., & Brombacher, F. (2012). T helper1/T helper2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: Is this paradigm still relevant? *Frontiers in Immunology*, 3(APR), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00080>
- Alvarez, L., & Whittemore, J. C. (2009). Liver Enzyme Elevations in Dogs: Physiology and Pathophysiology. *Compendium: Continuing Education for Veterinarians*, September.
- Anversa, L., Tiburcio, M. G. S., Richini-Pereira, V. B., & Ramirez, L. E. (2018). Human leishmaniasis in Brazil: A general review. 64(3), 281–289. https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302018000300281&lng=en&tlng=en
- Baggiolini, M. (2015). CXCL8 - the first chemokine. *Frontiers in Immunology*, 6(JUN), 6–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00285>
- Bhattacharyya, S., Ghosh, S., Dasgupta, B., Mazumder, D., Roy, S., & Majumdar, S. (2002). Chemokine-Induced Leishmanicidal Activity in Murine Macrophages via the Generation of Nitric Oxide. *The Journal of Infectious Diseases*, 185(12), 1704–1708. <https://doi.org/10.1086/340820>
- Bi, K., Chen, Y., Zhao, S., Kuang, Y., & John Wu, C. H. (2018). Current Visceral Leishmaniasis Research: A Research Review to Inspire Future Study. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9872095>
- Bie, Y., Ge, W., Yang, Z., Cheng, X., Zhao, Z., Li, S., Wang, W., Wang, Y., Zhao, X., Yin, Z., & Li, Y. (2019). The Crucial Role of CXCL8 and its receptors in colorectal liver metastasis. *Disease Markers*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8023460>
- Bouzakri, K., Ribaux, P., & Halban, P. A. (2009). Silencing Mitogen-activated Protein Kinase 4 (MAP4K4) Protects Beta Cells from Tumor Necrosis Factor- α -induced Decrease of IRS-2 and Inhibition of Glucose-stimulated Insulin Secretion. 284(41), 27892–27898. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.048058>
- Cavalcanti, A. S., Ribeiro-Alves, M., De O. R. Pereira, L., Mestre, G. L., Ferreira, A. B. R., Morgado, F. N., Boité, M. C., Cupolillo, E., Moraes, M. O., & Porrozzini, R. (2015). Parasite load induces progressive spleen architecture breakage and

- impairs cytokine mRNA expression in *Leishmania infantum*-naturally infected dogs. PLoS ONE, 10(4), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123009>
- Cerqueira, L., Alves, L., & Pamplona, M. (2014). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.
- Chow, M. T., & Luster, A. D. (2014). Chemokines in Cancer. *Cancer Immunology*, 2(12), 1125–1131. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Chuang, H. C., Wang, X., & Tan, T. H. (2016). MAP4K Family Kinases in Immunity and Inflammation. In *Advances in Immunology* (1st ed., Vol. 129). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2015.09.006>
- Clutton-Brock, J., & Flood, P. (2001). *A Natural History of Domesticated Mammals*. Cambridge University Press, 42(2), 113–120. <https://doi.org/10.1080/15627020.2001.11657122>
- Corrêa, A. P. F. L., Dossi, A. C. S., Vasconcelos, R. de O., Munari, D. P., & Lima, V. M. F. de. (2007). Evaluation of transformation growth factor b 1 , interleukin-10 , and interferon- g in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Veterinary Parasitology*, 143, 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.023>
- Costa, D. N. C. C., Silva, M. A., & Werneck, G. L. (2013). Culling Dogs in Scenarios of Imperfect Control: Realistic Impact on the Prevalence of Canine Visceral Leishmaniasis. 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002355>
- Cuevas, B. D., Abell, A. N., & Johnson, G. L. (2007). Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration. *Oncogene*, 26(22), 3159–3171. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210409>
- da Silva, A. V. A., Figueiredo, F. B., Menezes, R. C., Mendes-junior, A. A., Miranda, H. L. M. De, Cupolillo, E., Porrozzi, R., & Morgado, F. N. (2018). Morphophysiological changes in the splenic extracellular matrix of *Leishmania infantum* - naturally infected dogs is associated with alterations in lymphoid niches and the CD4 + T cell frequency in spleens. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2, 1–16.
- Dantas-torres, F. (2007). The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites , with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. 149, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.007>
- Dantas-torres, F., Miró, G., Bowman, D. D., Gradoni, L., & Otranto, D. (2019). Culling

- Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control : The Wind of Change. 35(2), 97–101.
- Dantas-Torres, F., Miró, G., Bowman, D. D., Gradoni, L., & Otranto, D. (2019). Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change. *Trends in Parasitology*, 35(2), 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.005>
- Dayakar, A., Chandrasekaran, S., Kuchipudi, S. V., & Kalangi, S. K. (2019). Cytokines: Key determinants of resistance or disease progression in visceral leishmaniasis: Opportunities for novel diagnostics and immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 10(APR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00670>
- de Melo, M. A., Silva, R. B. S., Silva, L. F. F. e, Braz, B. M. de A., Santos, J. M. dos, Santos, S. J. S., & Andrade, P. P. de. (2016). Canine Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Canine Medicine - Recent Topics and Advanced Research*. <https://doi.org/10.5772/65956>
- de Souza, T. L., da Silva, A. V. A., Pereira, L. de O. R., Figueiredo, F. B., Mendes Junior, A. A. V., Menezes, R. C., Mendes-da-Cruz, D. A., Boité, M. C., Cupolillo, E., Porrozzzi, R., & Morgado, F. N. (2019). Pro-Cellular Exhaustion Markers are Associated with Splenic Microarchitecture Disorganization and Parasite Load in Dogs with Visceral Leishmaniasis. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49344-1>
- Deak, E., Jayakumar, A., Cho, K. W., Goldsmith-pestana, K., Dondji, B., Lambris, J. D., & McMahon-pratt, D. (2010). Murine visceral leishmaniasis: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. 1355–1368. <https://doi.org/10.1002/eji.200939455>
- Díaz, N. L., Zerpa, O., & Tapia, F. J. (2013). Chemokines and chemokine receptors expression in the lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. 108(June), 446–452. <https://doi.org/10.1590/0074-0276108042013008>
- Diehl-Jones, W. L., & Askin, D. F. (2002). The Neonatal Liver, Part 1: embryology, anatomy and physiology. *Neonatal Network*, 21(2), 5–12. https://doi.org/10.1007/978-3-662-54256-9_19
- Dyce, K. M., Sack, W. O., & Wensing, C. J. G. (2010). *Tratado de Anatomia Veterinária* (E. Eletrônica (ed.); 4ª Edição). Saunders.
- Engwerda, C. R., Ato, M., Cotterell, S. E. J., Mynott, T. L., Tschannerl, A., Gorak-Stolinska, P. M. A., & Kaye, P. M. (2002). A role for tumor necrosis factor- α in

- remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. *American Journal of Pathology*, 161(2), 429–437. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64199-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64199-5)
- Esen, E., Sergin, I., Jesudason, R., Himmels, P., Webster, J. D., Zhang, H., Xu, M., Piskol, R., Mcnamara, E., Gould, S., Capietto, A.-H., Delamarre, L., Walsh, K., & Ye, W. (2020). MAP4K4 negatively regulates CD8 T cell-mediated antitumor and antiviral immunity. In *Sci. Immunol* (Vol. 5). <http://immunology.sciencemag.org/>
- Esen, E., Sergin, I., Jesudason, R., Himmels, P., Webster, J. D., Zhang, H., Xu, M., Piskol, R., McNamara, E., Gould, S., Capietto, A. H., Delamarre, L., Walsh, K., & Ye, W. (2020). MAP4K4 negatively regulates CD8 T cell-mediated antitumor and antiviral immunity. *Science Immunology*, 5(45). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aay2245>
- Fiedler, L. R., Chapman, K., Xie, M., Tralau-stewart, C., Perrior, T., & Schneider, M. D. (2019). MAP4K4 Inhibition Promotes Survival of Human Stem Cell-Derived Cardiomyocytes and Reduces Infarct Size In Vivo Article MAP4K4 Inhibition Promotes Survival of Human Stem Cell-Derived Cardiomyocytes and Reduces Infarct Size In Vivo. 579–591.
- Flach, R. J. R., Distefano, M. T., Danai, L. V, Senol-cosar, O., Yawe, J. C., Kelly, M., Menendez, L. G., Czech, M. P., Rj, R. F., Mt, D., & Lv, D. (2019). Map4k4 impairs energy metabolism in endothelial cells and promotes insulin resistance in obesity. 303–313. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00037.2017>
- Flach, R. J. R., Skoura, A., Matevossian, A., Danai, L. V, Zheng, W., Cortes, C., Bhattacharya, S. K., Aouadi, M., Hagan, N., Yawe, J. C., Vangala, P., Menendez, L. G., Cooper, M. P., Fitzgibbons, T. P., Buckbinder, L., & Czech, M. P. (2015). Endothelial protein kinase MAP4K4 promotes vascular inflammation and atherosclerosis. *Nature Communications*, 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms9995>
- Gangur, V., Birmingham, N. P., & Thanesvorakul, S. (2002). Chemokines in health and disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 86(3–4), 127–136. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00018-1](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00018-1)
- Gao, B. (2016). Basic liver immunology. *Cellular and Molecular Immunology*, 13(3), 265–266. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.09>
- Gao, X., Gao, C., Liu, G., & Hu, J. (2016). MAP4K4 : an emerging therapeutic target in

- cancer. *Cell & Bioscience*, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13578-016-0121-7>
- Gerszten, R. E., Garcia-Zepeda, E. A., Lim, Y.-C., Yoshida, M., Ding, H. A., Gimbrone Jr, M. A., Luster, A. D., Luscinskas, F. W., & Rosenzweig, A. (2006). MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Letters to Nature*, 902(1), 288–293. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06324.x>
- Gibson, M. E. (1983). The identification of kala azar and the discovery of *Leishmania donovani*. *Medical History*, 27(2), 203–213. <https://doi.org/10.1017/S0025727300042691>
- Gramiccia, M., & Gradoni, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, 35(11–12), 1169–1180. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.07.001>
- Gregory, D. J., & Olivier, M. (2005). Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. *Parasitology*, 130(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1017/S0031182005008139>
- Guirado, E., & Schlesinger, L. S. (2013). Modeling the Mycobacterium tuberculosis granuloma – the critical battlefield in host immunity and disease. 4(April), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00098>
- Gupta, G., Oghumu, S., & Satoskar, A. R. (2013). Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. *Advances in Applied Microbiology*, 82, 155–184. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407679-2.00005-3>
- Ha, H., Debnath, B., & Neamati, N. (2017). Role of the CXCL8-CXCR1/2 axis in cancer and inflammatory diseases. *Theranostics*, 7(6), 1543–1588. <https://doi.org/10.7150/thno.15625>
- Hag, I. A. E., Hashim, F. A., Toum, I. A. E., Homeida, M., Kalifa, M. E., & Hassan, A. M. E. (1994). Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kala-azar). *Journal of Clinical Pathology*, 47, 547–551.
- Harhay, M. O., Olliaro, P. L., Costa, D. L., Henrique, C., & Costa, N. (2011). Urban parasitology : visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends in Parasitology*, 27(9), 403–409. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.04.001>
- Hellems, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2008). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8(2).

- <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r19>
- Hermida, M. E., Vilas, C., Melo, B. De, & Lima, S. (2018). Histological Disorganization of Spleen Compartments and Severe Visceral Leishmaniasis. 8(November), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00394>
- Horst, A. K., Neumann, K., Diehl, L., & Tiegs, G. (2016). Modulation of liver tolerance by conventional and nonconventional antigen-presenting cells and regulatory immune cells. *Cellular and Molecular Immunology*, 13(3), 277–292. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.112>
- IBGE. (2013). População de animais de estimação no Brasil - 2013 -.
- Ikeda-garcia, F. A., Lopes, R. S., Marques, J., Morinishi, C. K., Zanette, F., Perri, H. V., & Marcondes, M. (2010). Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate and allopurinol. 218–223.
- Jones, L. T. C. H. E., Reinhardt, C. P. T. J. H., Rinaldi, M. G., & Francisco, S. (2015). Dermatophytosis in Naturally Infected Subjects Model.
- Kar, S., Ukil, A., Sharma, G., & Das, P. K. (2010). MAPK-directed phosphatases preferentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in experimental visceral leishmaniasis : involvement of distinct protein kinase C isoforms. 88(July), 9–20. <https://doi.org/10.1189/jlb.0909644>
- Kaye, P. M., Beattie, L., & Kaye, P. M. (2016). Lessons from other diseases : granulomatous inflammation in leishmaniasis. 249–260. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0548-7>
- Khadem, F., Gao, X., Mou, Z., Jia, P., Movassagh, H., Onyilagha, C., Gounni, A. S., Wright, M. C., & Uzonna, J. E. (2016). Hepatic stellate cells regulate liver immunity to visceral leishmaniasis through P110δ-dependent induction and expansion of regulatory T cells in mice. *Hepatology*, 63(2), 620–632. <https://doi.org/10.1002/hep.28130>
- Kima, P. E., & Soong, L. (2013). Interferon gamma in leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 4(JUN), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00156>
- Knobel, D. L., Cleaveland, S., Coleman, P. G., Fèvre, E. M., Meltzer, M. I., Miranda, M. E. G., Shaw, A., Zinsstag, J., & Meslin, F. (2005). *Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia*. 008862(03).
- Koutinas, A. F., & Koutinas, C. K. (2014). Pathologic Mechanisms Underlying the

- Clinical Findings in Canine Leishmaniasis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Veterinary Pathology*, 51(2), 527–538. <https://doi.org/10.1177/0300985814521248>
- Kumar, R., & Nylén, S. (2012). Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 3(AUG), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00251>
- 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*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 115(1–2), 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.10.001>
- Lang, K. S., & Lang, P. A. (2015). Balancing viral replication in spleen and liver determines the outcome of systemic virus infection. *Zeitschrift Fur Gastroenterologie*, 53(12), 1432–1435. <https://doi.org/10.1055/s-0041-109631>
- Lawrence, Y. A. (2017). Laboratory Evaluation of the Liver Hepatic enzymes Bile acids Bilirubin Liver disease Ammonia. *Veterinary Clinics of NA: Small Animal Practice*, 47(3), 539–553. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2016.11.005>
- Liang, J. J., Wang, H., Rashid, A., Tan, T., Hwang, R. F., Hamilton, S. R., Abbruzzese, J. L., Evans, D. B., & Wang, H. (2008). Expression of MAP4K4 Is Associated with Worse Prognosis in Patients with Stage II Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. 14(21), 7043–7050. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0381>
- Lima, I. S., Solcá, M. S., Tafuri, W. L., Santos, W. L. C., & Freitas, L. A. R. De. (2019). Assessment of histological liver alterations in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Parasites & Vectors*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3723-1>
- Liu, A., Cai, J., Zhao, X., Jiang, T., He, T., & Fu, H. (2011). ShRNA-Targeted MAP4K4 Inhibits Hepatocellular Carcinoma Growth. 4(15), 710–721. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0331>
- Loría-Cervera, E. N., & Andrade-Narváez, F. J. (2014). Animal models for the study of Leishmaniasis immunology. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 56(490), 1–11. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000100001>
- Mackay, C. R. (2001). Chemokines: Immunology's high impact factors. *Nature Immunology*, 2(2), 95–101. <https://doi.org/10.1038/84298>
- Madeira, M. D. F., Uchôa, C. M. A., Leal, C. A., Silva, R. M. M., Duarte, R., Magalhães,

- C. M., & Barrientos, M. (2003). *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados *Leishmania (Viannia) braziliensis* in naturally infected dogs. 36(5), 551–555.
- Maran, N., Gomes, P. S., Freire-De-Lima, L., Freitas, E. O., Freire-De-Lima, C. G., & Morrot, A. (2016). Host resistance to visceral leishmaniasis: Prevalence and prevention. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 14(4), 435–442. <https://doi.org/10.1586/14787210.2016.1160779>
- Marcondes, M., & Day, M. J. (2019). Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. *Research in Veterinary Science*, 123(January), 261–272. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.022>
- Martínez-Moreno, A., Moreno, T., Martínez-Moreno, F. J., Acosta, I., & Hernández, S. (1995). Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 48(3–4), 209–220. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(95\)05434-8](https://doi.org/10.1016/0165-2427(95)05434-8)
- Mehrad, B., Keane, M. P., & Strieter, R. M. (2007). Chemokines as mediators of angiogenesis. *Thrombosis and Haemostasis*, 97(5), 755–762. <https://doi.org/10.1160/TH07-01-0040>
- Melo, C. V. B. de, Hermida, M. D. E. R., Mesquita, B. R., Fontes, J. L. M., Koning, J. J., Solcà, M. da S., Benevides, B. B., Mota, G. B. S., Freitas, L. A. R., Mebius, R. E., & dos-Santos, W. L. C. (2020). Phenotypical Characterization of Spleen Remodeling in Murine Experimental Visceral Leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 11(April), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00653>
- Melo, F. A., Moura, E. P., Ribeiro, R. R., Alves, F., Caliari, V., & Tafuri, W. L. (2009). Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. 538–548. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2009.00681.x>
- Melo, F., Amaral, M., Oliveira, P., Lima, W., Andrade, M., Michalick, M., Raso, P., Tafuri, W., & Tafuri, W. (2008). Diffuse Intralobular Liver Fibrosis in Dogs Naturally Infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. 79(2), 198–204.
- Menezes-Souza, D., Guerra-Sá, R., Carneiro, C. M., Vitoriano-Souza, J., Giunchetti, R. C., Teixeira-Carvalho, A., Silveira-Lemos, D., Oliveira, G. C., Corrê-Oliveira, R., & Reis, A. B. (2012). Higher Expression of CCL2, CCL4, CCL5, CCL21, and CXCL8 Chemokines in the Skin Associated with Parasite Density in Canine

- Visceral Leishmaniasis. 6(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001566>
- Michalick, M. S. M., Genaro, O. (in memoriam), & Barbosa, A. (2005). Parasitologia Humana - Leishmaniose Visceral Americana (A. L. de Melo, P. M. Linardi, & R. W. A. Vitor (eds.); 11°).
- Michelin, A. de F., Perri, S. H. V., & Lima, V. M. F. (2011). Evaluation of TNF- α , IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. 105(5), 373–383. <https://doi.org/10.1179/1364859411Y.0000000027>
- Moreira, N. B., Almeida, A. D. B. P. F. de, Pinto, A. Z. de L., Mutzemberg, E. R., Godoy, I. De, Silveira, M. M. da, Dutra, V., & Sousa, V. R. F. (2018). Canine Visceral Leishmaniasis: Dermatological Aspects and Associated Dermatoses. *Acta Scientiae Veterinariae*, 44(1), 4. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.80954>
- Morrison, D. K. (2012). MAP Kinase Pathways. 1–5.
- Mukherjee, P., Ghosh, A. K., & Ghose, A. C. (2003). Infection pattern and immune response in the spleen and liver of BALB / c mice intracardially infected with *Leishmania donovani* amastigotes. 86, 131–138. [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(03\)00021-X](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(03)00021-X)
- Mukhopadhyay, D., Dalton, J. E., Kaye, P. M., & Chatterjee, M. (2014). Post kala-azar dermal leishmaniasis: An unresolved mystery. *Trends in Parasitology*, 30(2), 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.12.004>
- Murray, H. W. (2001). Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis.
- Nicolle, C., & Comte, C. (1908). Origine canine du Kala-azar. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 1, 299–301.
- Nunes, D., Castro, C., Marques, P., Bermudi, M., & Aparecida, L. (2018). Leishmaniose visceral em humanos e relação com medidas de controle vetorial e canino. 1–11.
- Nylén, S., & Sacks, D. (2007). Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. 28(9), 18–21. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.07.004>
- Oghumu, S. O., Lezama-Dávila, C. M., Isaac-Márquez, A. P., & Satoskar, A. R. (2010). Role of chemokines in regulation of immunity against Leishmaniasis. *Exp Parasitology*, 126(3), 389–396. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- OMS, O. (2019). Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas.

- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Mihalca, A. D., Traub, R. J., Lappin, M., & Baneth, G. (2017). Zoonotic Parasites of Sheltered and Stray Dogs in the Era of the Global Economic and Political Crisis. *Trends in Parasitology*, 33(10), 813–825. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.05.013>
- Pabst, R., & Westermann, J. (1991). The unique role of the spleen and its compartments in lymphocyte migration. *Research in Immunology*, 142(4), 339–342. [https://doi.org/10.1016/0923-2494\(91\)90087-Y](https://doi.org/10.1016/0923-2494(91)90087-Y)
- Pampiglione, S., Manson-Bahr, P. E. C. F., Giungi, F., Giunti, G., Parenti, A., & Trotti, G. C. (1974). Studies on mediterranean leishmaniasis 2. asymptomatic cases of visceral leishmaniasis. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 68, 447–453.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Oxford University Press*, 29(9), 2002–2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2966.2012.21196.x>
- Pieri, N. C. G., Souza, A. F., Casals, J. B., Roballo, K. C. S., Ambrósio, C. E., & Martins, D. S. (2015). Comparative Development of Embryonic Age by Organogenesis in Domestic Dogs and Cats. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(4), 625–631. <https://doi.org/10.1111/rda.12539>
- 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*. *Infection and Immunity*, 62(1), 229–235. <https://doi.org/10.1128/iai.62.1.229-235.1994>
- Pinheiro, R. O., & Rossi-Bergmann, B. (2007). Interferon-gamma is required for the late but not early control of *Leishmania amazonensis* infection in C57Bl/6 mice. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(1), 79–82. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007000100013>
- Poinar, G. (2004). *Palaeomyia burmitis* (Diptera: *Phlebotomidae*), a new genus and species of cretaceous sand flies with evidence of blood-sucking habits. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 106(3), 598–605. <http://biostor.org/reference/55155>
- Poinar, G. J., & Poinar, R. (2004). *Paleoleishmania proterus* n. gen., n. sp., (*Trypanosomatidae*: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese Amber. *Protist*, 155(September), 305–310.

- Poinar, G., & Poinar, R. (2004). Evidence of vector-borne disease of early cretaceous reptiles. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 4(4), 281–284.
<https://doi.org/10.1089/vbz.2004.4.281>
- Price, E. O. (1984). Behavioral aspects of animal domestication. *The Quarterly Review of Biology*, 59(1), 1–32.
- Prina, E., Roux, E., & Mattei, D. (2007). *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time *PCR*. 9, 1307–1315.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.06.005>
- Privé, C., & Descoteaux, A. (2000). *Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages. *European Journal of Immunology*, 30(8), 2235–2244.
[https://doi.org/10.1002/1521-4141\(2000\)30:8<2235::AID-IMMU2235>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1521-4141(2000)30:8<2235::AID-IMMU2235>3.0.CO;2-9)
- Quinnell, R J, & Courtenay, O. (2009). Transmission , reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. 1915–1934.
<https://doi.org/10.1017/S0031182009991156>
- Quinnell, Rupert J., Courtenay, O., Shaw, M., Day, M. J., Garcez, L. M., Dye, C., & Kaye, P. M. (2001). Tissue Cytokine Responses in Canine Visceral Leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(9), 1421–1424.
<https://doi.org/10.1086/319869>
- Rao, K. M. K. (2015). MAP kinase activation in macrophages The role of cell type in experimental. *Journal of Leukocyte Biology*, 69(January 2001), 3–10.
- Reiner, S. L., & Locksley, R. M. (1995). The Regulation of Immunity to *Leishmania major*. *Annual Review of Immunology*, 13(1), 151–177.
<https://doi.org/10.1146/annurev.iy.13.040195.001055>
- 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. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128(1–3), 87–95.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.307>
- Ribeiro, R. R., Michalick, M. S. M., Da Silva, M. E., Dos Santos, C. C. P., Frézard, F. J. G., & Da Silva, S. M. (2018). Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *BioMed Research International*, 2018(CI).

<https://doi.org/10.1155/2018/3296893>

- Ribeiro, R. R., Suzan, M., Michalick, M., Eduardo, M., Cheim, C., Jean, F., Frézard, G., & Magno, S. (2018). Canine leishmaniasis: An overview of the current status and strategies for control. *BioMed Research International*, 2018(CI), 1–12.
- Roballo, K. C. S., Souza, A. F., Lara, V. M., Pinheiro, A. O., Gomes, I. da S., Karam, R. G., Martins, D. dos S., Machado, L. C., & Ambrósio, C. E. (2019). Canine fetus immune system at late development. *Animal Reproduction*, 16(2), 328–331. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0004>
- Robinson, M. W., Harmon, C., & O'Farrelly, C. (2016). Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cellular and Molecular Immunology*, 13(3), 267–276. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.3>
- Rodríguez-Cortés, A., Carrillo, E., Martorell, S., & Todolí, F. (2016). Compartmentalized Immune Response in Leishmaniasis: Changing Patterns throughout the Disease. *VI*, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155224>
- Rogers, K. A., DeKrey, G. K., Mbow, M. L., Gillespie, R. D., Brodskyn, C. I., & Titus, R. G. (2002). Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiology Letters*, 209(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)00470-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)00470-6)
- Rossi, M., & Fasel, N. (2018). How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! *International Immunology*, 30(3), 103–111. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxx075>
- 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*. *70*(6), 618–624.
- Sant'Ana, J. A. P., Lima, W. G., Oliveira, M. R., Simões, L. A., Michalick, M. S. M., Melo, M. N., Tafuri, W. L., & Tafuri, W. L. (2007). Hepatic granulomas in canine visceral leishmaniasis and clinical status. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 59(5), 1137–1144.
- Sarasa, M., & Pesini, P. (2009). Natural Non-Transgenic Animal Models for Research in Alzheimer ' s Disease. 171–178.
- Schirmer, A., Seow, C. S., & Penney, T. B. (2013). Humans Process Dog and Human Facial Affect in Similar Ways. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074591>

- Sheikine, Y., & Hansson, G. K. (2004). Chemokines and atherosclerosis. *Annals of Medicine*, 36(2), 98–118. <https://doi.org/10.1080/07853890310019961>
- Shimabukuro, P. H. F., & Galati, E. A. B. (2011). Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. *Biota Neotropica*, 11(suppl 1), 685–704. <https://doi.org/10.1590/s1676-06032011000500033>
- Silva-almeida, M., Carvalho, L. O. P., Abreu-silva, A. L., Souza, C. S. F., Hardoim, D. J., & Calabrese, K. S. (2012). Extracellular matrix alterations in experimental *Leishmania amazonensis* infection in susceptible and resistant mice. 1–9.
- Silva-Barrios, S., Smans, M., Duerr, C. U., Qureshi, S. T., Fritz, J. H., Descoteaux, A., & Stäger, S. (2016). Innate Immune B Cell Activation by *Leishmania donovani* Exacerbates Disease and Mediates Hypergammaglobulinemia. *Cell Reports*, 15(11), 2427–2437. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.028>
- Silva, F. S. (2007). Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina Pathology and pathogenesis of canine visceral leishmaniasis. *Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas*, 1(1), 20–31.
- Silveira, F. T., & Corbett, C. E. P. (2010). *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas , 1937 : nativa ou introduzida ? Uma breve revisão. 1(2), 143–147. <https://doi.org/10.5123/S2176-62232010000200018>
- Simon, T., & Bromberg, J. S. (2017). Regulation of the Immune System by Laminins. *Trends in Immunology*, 38(11), 858–871. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.06.002>
- Singh, A. K., Singh, S. K., Naryan, S., & Pandey, K. (2018). Cytokines and chemokines differentially regulate innate immune cell trafficking during post kala-azar dermal leishmaniasis. April. <https://doi.org/10.1002/jcb.27048>
- Smith, L. M., Hartmann, S., Munteanu, A. M., Villa, P. D., Quinnell, R. J., & Collins, L. M. (2019). The Effectiveness of Dog Population Management : A Systematic Review. 1–30.
- Soares, N. M., Souza, J. N. De, Leal, T. F., Reis, E. A. G., Miranda, M. S., Santos, W. L. C., & Teixeira, M. C. A. (2017). Sera from Visceral Leishmaniasis Patients Display Oxidative Activity and Affect the TNF α Production by Macrophages In Vitro. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5861453>
- Solano-gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., & Baneth, G. (2011). LeishVet guidelines for the practical

- management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, 4(1), 86. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>
- Solano-Gallego, L., Riera, C., Roura, X., Iniesta, L., Gallego, M., Valladares, J. E., Fisa, R., Castillejo, S., Alberola, J., Ferrer, L., Arboix, M., & Portús, M. (2001). 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. *Veterinary Parasitology*, 96(4), 265–276. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00446-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00446-5)
- Stäger, S., & Bankoti, R. (2012). Differential regulation of the immune response in the spleen and liver of mice infected with *Leishmania donovani*. *Journal of Tropical Medicine*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/639304>
- Stanley, A. C., & Engwerda, C. R. (2007). Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *October 2006*, 138–147. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100011>
- Stevens, W. J., Bortier, H., & Van Meir, F. (2000). Anatomy, Embryology, Histology and Physiology of the Spleen. 1–6. https://doi.org/10.1007/978-3-642-57045-2_1
- Steverding, D. (2017). The history of leishmaniasis. 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>
- Takashima, G. K., & Day, M. J. (2014). Setting the one health Agenda and the human-companion animal bond. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(11), 11110–11120. <https://doi.org/10.3390/ijerph111111110>
- Tang, X., Guilherme, A., Chakladar, A., Powelka, A. M., Konda, S., Virbasius, J. V, Nicoloso, S. M. C., Straubhaar, J., & Czech, M. P. (2006). An RNA interference-based screen identifies MAP4K4[−]NIK as a negative regulator of PPAR α , adipogenesis , and insulin-responsive hexose transport. 23.
- Tarantino, G., Scalera, A., & Finelli, C. (2013). Liver-spleen axis: Intersection between immunity, infections and metabolism. *World Journal of Gastroenterology*, 19(23), 3534–3542. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i23.3534>
- Teixeira, M. J., Teixeira, C. R., Andrade, B. B., Barral-Netto, M., & Barral, A. (2006). Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, 22(1), 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.11.010>
- Toepp, A. J., & Petersen, C. A. (2020). The balancing act: Immunology of leishmaniosis. *Research in Veterinary Science*, 130(April 2018), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.02.004>

- van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., & Laskay, T. (2004). Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for Leishmania Entry into Macrophages . *The Journal of Immunology*, 173(11), 6521–6525. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.11.6521>
- Wang, G. D., Zhai, W., Yang, H. C., Fan, R. X., Cao, X., Zhong, L., Wang, L., Liu, F., Wu, H., Cheng, L. G., Poyarkov, A. D., Poyarkov, N. A., Tang, S. S., Zhao, W. M., Gao, Y., Lv, X. M., Irwin, D. M., Savolainen, P., Wu, C. I., & Zhang, Y. P. (2013). The genomics of selection in dogs and the parallel evolution between dogs and humans. *Nature Communications*, 4(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms2814>
- Werneck, G. L. (2014). Visceral leishmaniasis in Brazil: Rationale and concerns related to reservoir control. *Revista de Saude Publica*, 48(5), 851–856. <https://doi.org/10.1590/S0034-8910.2014048005615>
- Whitmarsh, A. J. (2007). Regulation of gene transcription by mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1285–1298. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.11.011>
- Yáñez, D., Izquierdo, M., Ruiz-perez, F., Nataro, J. P., Girón, J. A., Vidal, R. M., & Farfan, M. J. (2016). The Role of Fibronectin in the Adherence and Inflammatory Response Induced by Enteroaggregative *Escherichia coli* on Epithelial Cells. 6(December), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00166>
- Yang, Y. M., & Seki, E. (2015). TNF α in liver fibrosis. *Curr. Pathobiol. Rep.*, 3(4), 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Yao, Z., Zhou, G., Wang, X. S., Brown, A., Diener, K., Gan, H., & Tan, T. (1999). A Novel Human STE20-related Protein Kinase , HGK , That Specifically Activates the c-Jun N-terminal Kinase Signaling Pathway *. 274(4), 2118–2125.
- Yoshimura, T. (2015). Discovery of IL-8/CXCL8 (the story from Frederick). *Frontiers in Immunology*, 6(JUN), 6–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00278>
- Yung, S. C., & Farber, J. M. (2013). Chemokines. In *Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edi)*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385095-9.00089-0>

Ziraldó, C., Vodovotz, Y., Namas, R. A., Almahmoud, K., Tapias, V., Mi, Q., Barclay, D., Jefferson, B. S., Chen, G., Billiar, T. R., & Zamora, R. (2013). Central role for MCP-1/CCL2 in injury-induced inflammation revealed by in vitro, in silico, and clinical studies. *PLoS ONE*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079804>

10. Figuras suplementares

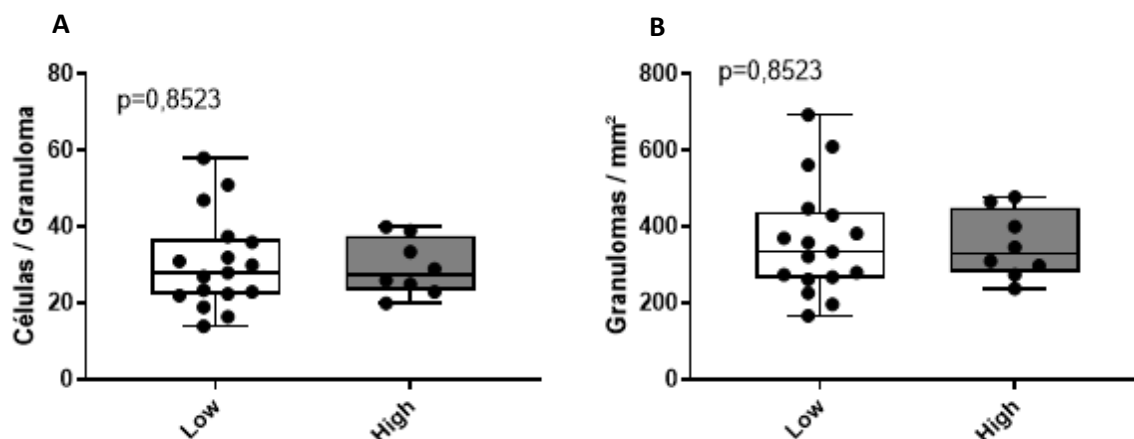


Figura Suplementar 01: Representação gráfica da quantidade de células por granuloma e de granulomas por milímetros quadrados no fígado de animais naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. A. Quantidade de células por granuloma separados pela carga parasitária do fígado. B. Quantidade de granulomas por milímetros quadrados separados pela carga parasitária do fígado. Teste Mann-Whitney para 2 grupos.

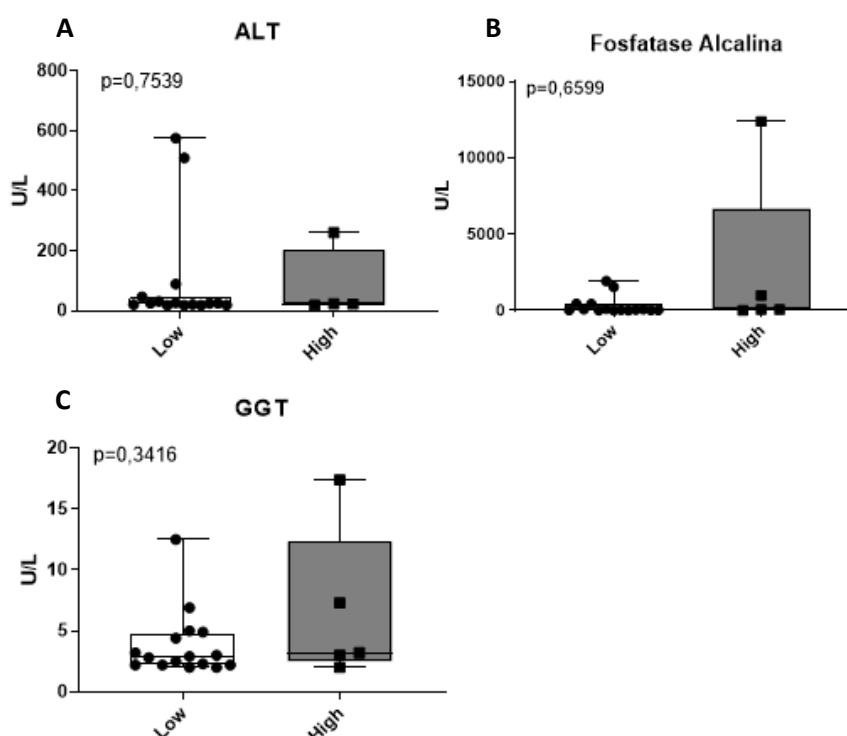


Figura Suplementar 02: Níveis séricos das transaminases separados pela carga parasitária do fígado: U/L: Unidades por litro; Valores de referência: ALT: 18 – 86; FA: 12 – 121; GGT: 2,0 - 10. A. Alanina Aminotransferase (ALT); B. Fosfatase Alcalina (FA); C. Gama Glutamil Aminotransferase (GGT). Teste Mann-Whitney para 2 grupos.

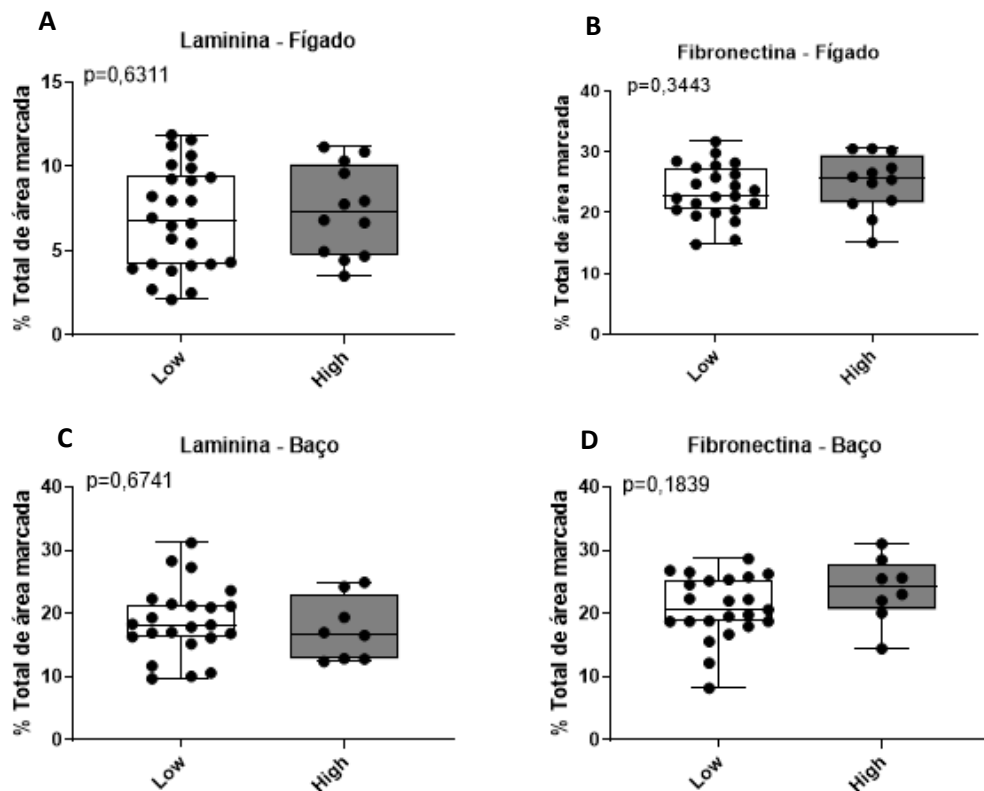


Figura Suplementar 03: Representação gráfica do percentual de área marcada para laminina e fibronectina separados pela carga parasitária de seu respectivo órgão. A. Percentual de área de deposição de laminina em fígado, B. Percentual de área de deposição de fibronectina em fígado. C. Percentual de área de deposição de laminina em baço. D. Percentual de área de deposição de laminina em baço. Média da área marcada de 5 campos diferentes de cada animal. Teste Mann-Whitney para 2 grupos.

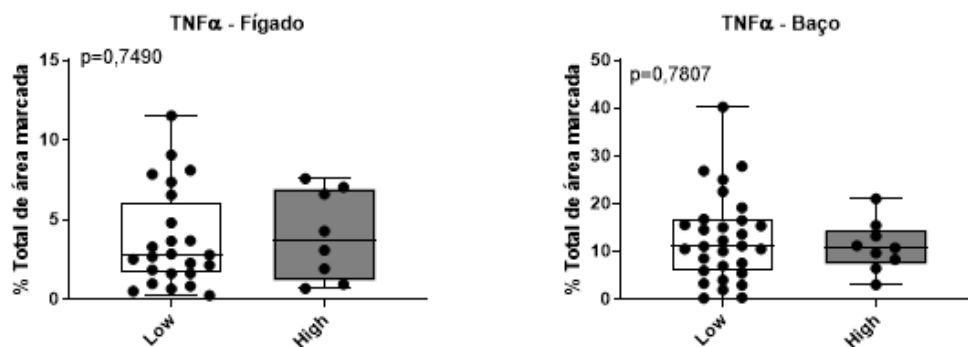


Figura Suplementar 04: Representação gráfica do percentual de área marcada para TNFα em fígado e baço. A. Percentual de área marcada para TNFα em fígado. B. Percentual de área marcada para TNFα em baço. Média do percentual de área marcada de 5 campos diferentes de cada animal. Teste Mann-Whitney para 2 grupos.

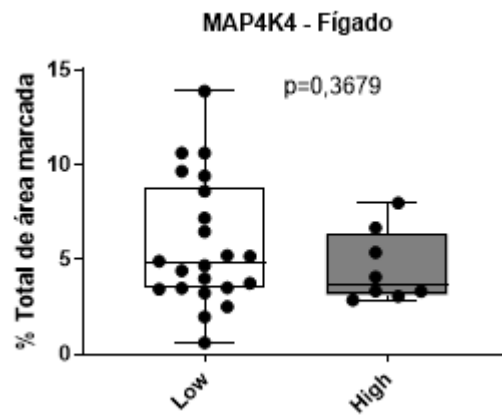


Figura Suplementar 05: Representação gráfica do percentual de área marcada para MAP4K4 em fígado de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Percentual de área marcada para MAP4K4 separados pela carga parasitária em fígado. Teste Mann-Whitney para 2 grupos.

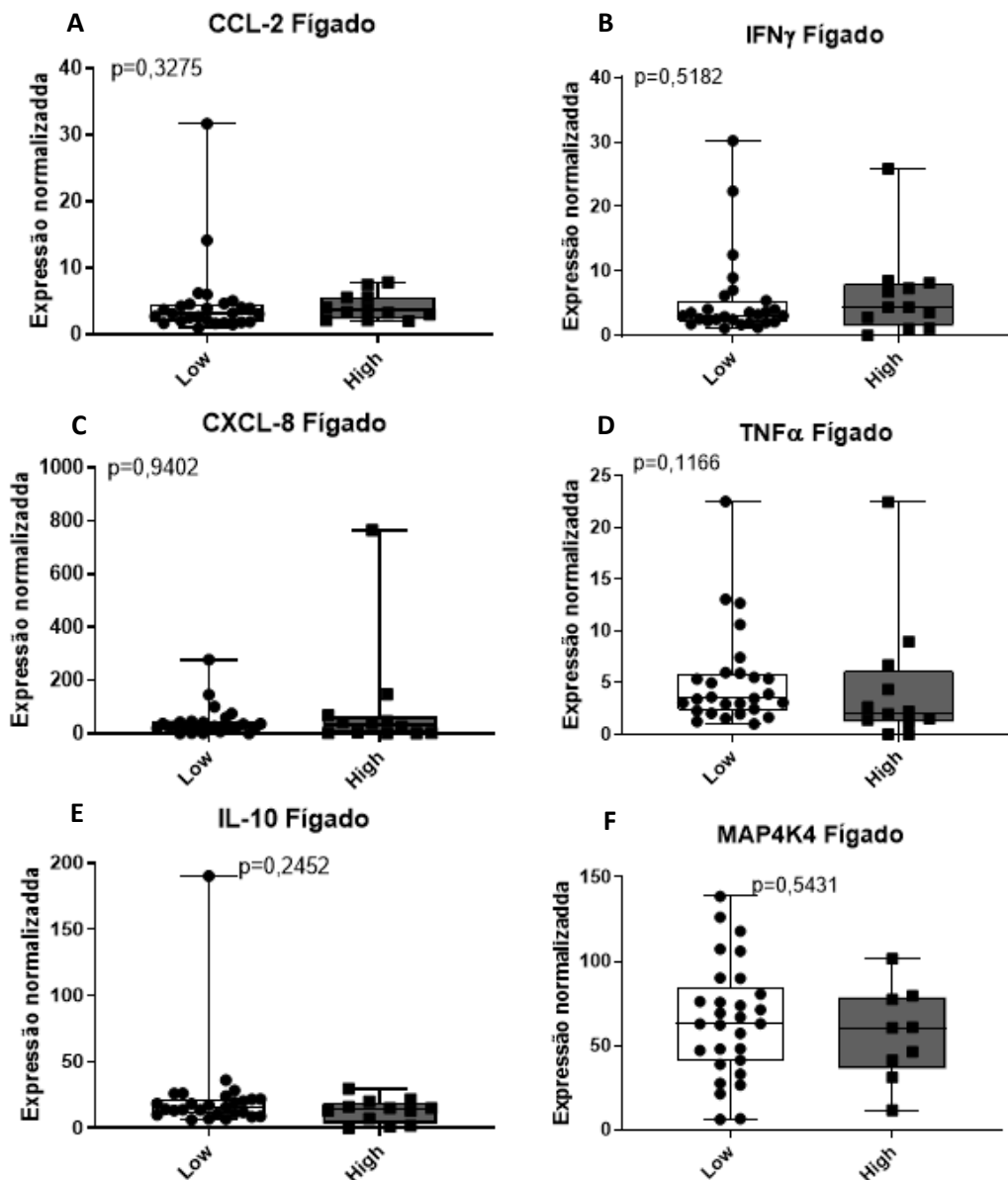


Figura suplementar 06: Expressão gênica normalizada de CCL-2, IFN γ , CXCL-8, TNF α , IL-10 e MAP4K4 no fígado de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. Análise *ex-vivo* por qPCR dos níveis de mRNA do fígado e baço de cães classificados de acordo com carga parasitária do fígado. A. expressão normalizada de CCL-2 em fígado separados pela carga parasitária do fígado. B. expressão normalizada de IFN γ em fígado separados pela carga parasitária do fígado. C. expressão normalizada de CXCL-8 em fígado separados pela carga parasitária do fígado. D. expressão normalizada de TNF α em fígado separados pela carga parasitária do fígado. E. expressão normalizada de IL-10 em fígado separados pela carga parasitária do fígado. F. expressão normalizada de MAP4K4 em fígado separados pela carga parasitária do fígado. Valores de expressão normalizados para os genes constitutivos HPRT e GAPDH. Teste Mann-Whitney para dois grupos.

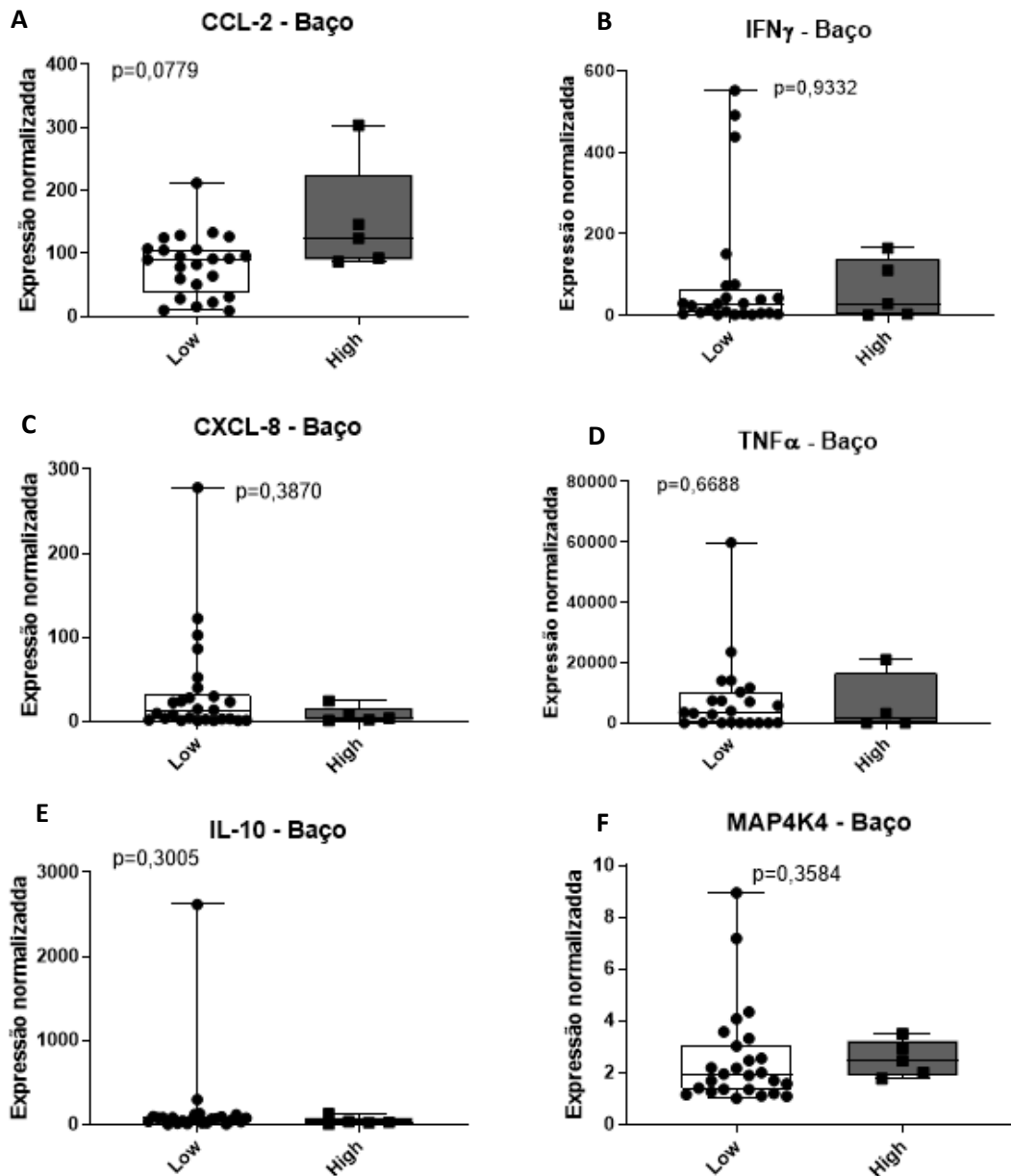


Figura suplementar 07: Expressão gênica normalizada de CCL-2, IFN γ , CXCL-8, TNF α , IL-10 e MAP4K4 no baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. Análise *ex-vivo* por qPCR dos níveis de mRNA do fígado e baço de cães classificados de acordo com carga parasitária do fígado. A. expressão normalizada de CCL-2 em baço separados pela carga parasitária do baço. B. expressão normalizada de IFN γ em baço separados pela carga parasitária do baço. C. expressão normalizada de CXCL-8 em baço separados pela carga parasitária do baço. D. expressão normalizada de TNF α em baço separados pela carga parasitária do baço. E. expressão normalizada de IL-10 em baço separados pela carga parasitária do baço. F. expressão normalizada de MAP4K4 em baço separados pela carga parasitária do baço. Valores de expressão normalizados para os genes constitutivos HPRT e GAPDH. Teste Mann-Whitney para dois grupos.

11. Anexos

11.1. Relação Animais → Org. baço / Escore clínico / Carga Fígado-Baço

#	Org. do Baço	Escore Clínico	Relação carga Fígado/Baço
Amostra 01	DAC	Alto	FL/BH
Amostra 02	DBC	Baixo	FH/BL
Amostra 03	DBC	Médio	FH/BL
Amostra 04	DBC	Médio	FL/BL
Amostra 05	DBC	Baixo	FL/BL
Amostra 06	DBC	Baixo	FL/BL
Amostra 07	DAC	Médio	FL/BH
Amostra 08	DAC	Alto	FL/BH
Amostra 09	DBC	Baixo	FL/BL
Amostra 10	DBC	Médio	FL/BL
Amostra 11	OBC	Médio	FL/BL
Amostra 12	DAC	Médio	FL/BH
Amostra 13	DBC	Alto	FH/BL
Amostra 14	DBC	Médio	FL/BL
Amostra 15	DBC	Alto	FL/BL
Amostra 16	OBC	Alto	FL/BL
Amostra 17	DBC	Baixo	FL/BL
Amostra 18	OBC	Médio	FL/BL
Amostra 19	DAC	Baixo	FH/BH
Amostra 20	DBC	Médio	FL/BL
Amostra 21	DAC	Alto	FL/BH
Amostra 22	DBC	Baixo	FL/BL
Amostra 23	OBC	Baixo	FL/BL
Amostra 24	OBC	Baixo	FL/BL
Amostra 25	OBC	Baixo	FH/BL
Amostra 26	OBC	Alto	FH/BL
Amostra 27	OBC	Baixo	FH/BL
Amostra 28	DAC	Médio	FH/BH
Amostra 29	OBC	Alto	FH/BL
Amostra 30	DBC	Baixo	FL/BL
Amostra 31	DBC	Alto	FH/BL
Amostra 32	DBC	Médio	FL/BL
Amostra 33	DAC	Alto	FL/BH
Amostra 34	DBC	Médio	FL/BL
Amostra 35	DBC	Médio	FL/BL
Amostra 36	OBC	Baixo	FL/BL
Amostra 37	DAC	Alto	FL/BH
Amostra 38	DBC	Alto	FH/BL
Amostra 39	DBC	Médio	FH/BL
Amostra 40	DBC	Alto	FL/BL
Amostra 41	DBC	Alto	FL/BL

OBC Organizado e Baixa Carga
 DBC Desorganizado e Baixa Carga
 DAC Desorganizado e Alta Carga
 FL Fígado Low
 FH Fígado High
 BL Baço Low
 BH Baço High

11.2. Licença CEUA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/IOC



LICENÇA

L-026/2018

Certificamos que o protocolo (CEUA/IOC-019/2018), intitulado "Verificação da influência da exaustão celular e do remodelamento da matriz extracelular esplênica na falha do controle da carga parasitária em cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*", sob a responsabilidade de **Fernanda Nazaré Morgado** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade de até 30/07/2022 e inclui o uso total de:

Cão doméstico (*Cannis familiaris*), - 15 de animais.

Observação: Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

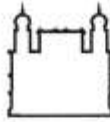
Rio de Janeiro, 14 de agosto de 2018.

Cecília J. G. de Almeida

Cecília Jacques Gonçalves de Almeida
Coordenadora da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz
Fundação Oswaldo Cruz

Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz/IOC-Instituto Oswaldo Cruz
Pavilhão Arthur Neiva - módulos de expansão - sala 06
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil
CEP: 21040-360 Tel: (21) 2562-1066

11.3. Declaração CEUA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

Rio de Janeiro, October 24, 2014.

Dear Mrs.

Nazare Fernanda Morgado

The Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of Oswaldo Cruz Foundation declares that research which uses tissues fragments after euthanasia, without animal manipulation does not need to be submitted for this Committee, according to Brazilian's Law 11794/08.



Octávio Augusto França Presgrave

Coordinator

Octávio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04625550

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 – Prédio da Expansão – sala 200 – Manguinhos – Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

11.4. Certidão – Cadastro nº AFB4BD9



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão Cadastro nº AFB4BD9

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **AFB4BD9**
Usuário: **Fiocruz**
CPF/CNPJ: **33.781.055/0001-35**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso:
 Pesquisa Científica Bioprospeção Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Leishmania infantum

Canis lupus

Título da Atividade: **Estudo imunopatológico do baço de cães naturalmente infectados com Leishmania infantum. Haverá correlação entre a exaustão celular, o remodelamento da matriz extracelular esplênica e a falha no controle da carga parasitária?**

Equipe

Fernanda Nazaré Morgado	Fiocruz
Aurea Virginia Andrade da Silva	Fiocruz
Amanda dos Santos Cavalcanti	Fiocruz
Luisa Helena Monteiro de Miranda	Fiocruz
Renato Porrozzzi de Almeida	Fiocruz
Nathalia Antonucci Fonseca	Fiocruz
Rodrigo Caldas Menezes	Fiocruz
Elisa Cupolillo	Fiocruz
Fabiano Borges Figueiredo	Fiocruz
Leonardo Lima Leal	Fiocruz
PAULA ALVES RIBEIRO	Fiocruz
Elaine Cristina Silveira dos Santos Gomes	Fiocruz
Tamara de Lima Reis	Fiocruz
Luiza Oliveira Pereira	Fiocruz
LUCAS DE FARIAS SANTAANNA	Fiocruz