

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**PERFIL CLÍNICO E IMUNOLÓGICO DE CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS COM *Leishmania (Leishmania) chagasi* EM SÃO LUÍS – MA**

São Luís- MA
2015

CARLA JANAINA REBOUÇAS MARQUES DO ROSÁRIO

**PERFIL CLÍNICO E IMUNOLÓGICO DE CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS COM *Leishmania (Leishmania) chagasi* EM SÃO LUÍS – MA**

Orientador: Prof. Ferdinan Almeida Melo, Doutor

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação da Universidade Estadual do Maranhão como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

São Luís – MA
2015

Rosário, Carla Janáina Rebouças Marques do.

Perfil clínico e imunológico de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* em São Luís - MA / Carla Janáina Rebouças Marques do Rosário.– São Luís, 2015.

70f.

Dissertação (Mestrado) – Curso de Mestrado em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2015.

Orientador: Prof. Ferdinan Almeida Melo

1. Leishmaniose. 2. Sinais clínicos. 3. Cão 4. Imunologia I. Título

CDU: 636.7:616.993.161(812.1)

CARLA JANAINA REBOUÇAS MARQUES DO ROSÁRIO

**PERFIL CLÍNICO E IMUNOLÓGICO DE CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS COM *Leishmania (Leishmania) chagasi* EM SÃO LUÍS – MA**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo-UEMA
Orientador

Profa. Dra. Maria do Socorro Costa Oliveira Braga-UEMA
1º Membro

Prof. Dr. José Gomes Pereira-UEMA
2º Membro

DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar a Deus, que me concedeu o dom da vida e permaneceu comigo em todos os momentos, principalmente os mais difíceis, me dando força e coragem pra continuar mesmo em meio às dificuldades.

Aos meus pais, Afonso Carlos Rebouças e Luduvina Rebouças que acreditaram em mim, e não me deixaram desanimar em momento algum, com amor, carinho e dedicação, se importaram com minha educação desde os primeiros passos.

Às minhas irmãs Talyze Rebouças e Fernanda Rebouças pela amizade e companheirismo.

Ao meu esposo Euder Rebouças, companheiro de todas as horas, que me ajudou e esteve comigo nos momentos que mais precisei, com sua paciência e compreensão.

Aos meus amigos que sempre estiveram presentes.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo, que acreditou e me fez acreditar que sempre sou capaz.

À Marina Fernandes, aluna de iniciação científica que me acompanhou e ajudou durante o experimento.

Aos meus amigos de classe Luciana Rosa, Renata Mondêgo, Isadora Magalhães, Thayanne Fernandes e Paulo Brygel pelos momentos engraçados e especiais.

À Kellen Lisboa e Sr. Carlos que me ajudaram nas análises laboratoriais.

Ao Cernitas, na pessoa do Prof. Daniel Chaves e Erlin Cotrim que colaboraram nas análises bioquímicas.

À UFMG, pelo processamento das análises imunológicas.

A todos os professores que colaboraram com minha formação profissional.

À secretária do mestrado Francisca Silva, pela disponibilidade e paciência em sempre ajudar.

À professora Alana Lislea, pela dedicação com que conduz a Pós-graduação em Ciência Animal.

À Universidade Estadual do Maranhão, por me conceder a oportunidade de ser um profissional qualificado.

À CAPES por me conceder a bolsa no programa de aperfeiçoamento.

Enfim, a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização desse sonho.

“Uma das causas mais comuns de todas as doenças é o diagnóstico”

Karl Kraus

RESUMO

As leishmanioses compreendem um complexo de doenças causadas por parasitas intracelulares obrigatórios pertencentes ao gênero *Leishmania*, tendo os cães domésticos como os principais responsáveis pela manutenção da cadeia epidemiológica da doença, e sabendo que mais da metade dos cães infectados não manifestam sinais da enfermidade, as leishmanioses vêm sendo consideradas como importante problema de saúde pública. Avaliou-se o perfil clínico e imunológico de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* no município de São Luís- MA. Foram coletadas 20 amostras de sangue de animais positivos e sintomáticos para Leishmaniose Visceral Canina (LVC), 20 de animais positivos e assintomáticos e 10 de animais sabidamente negativos para a enfermidade. As amostras foram analisadas pelo teste imunocromatográfico (DPP/Biomanguinhos) e pelo ELISA (EIE/Biomanguinhos) indireto para detecção de anticorpos anti-*leishmania*. Foi ainda realizada cultura para verificar a presença de formas promastigotas do parasito nas amostras positivas. As amostras foram encaminhadas para avaliação das séries eritrocitárias, leucocitárias e plaquetárias, bem como para determinação das concentrações de ureia, creatinina, AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase) e albumina. As alíquotas de soro dos animais foram encaminhadas para o Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas da UFMG, para análise e quantificação das citocinas IFN- γ e IL-10. Observou-se que os sinais clínicos mais frequentes para LVC foram: linfadenopatia, perda de peso, úlceras e onicogrifose. Pode-se concluir que houve alterações significativas nos valores dos parâmetros hematimétricos dos animais sintomáticos e assintomáticos para LVC, e que os valores de AST, ALT, ureia e creatinina obtidos nas análises bioquímicas dos animais não foram estatisticamente significativos, porém as análises de albumina apresentaram valores estatisticamente significativos entre os grupos ($P < 0,05$). Em relação às análises imunológicas, observou-se que houve um aumento significativo nos níveis de IFN- γ nos animais assintomáticos e um aumento significativo de IL-10 nos sintomáticos, sendo estatisticamente diferentes entre os grupos ($P < 0,05$).

Palavras-chave: leishmaniose, sinais clínicos, cão, imunologia

ABSTRACT

Leishmaniasis comprise a complex of diseases caused by intracellular parasites required belonging to the genus *Leishmania*, and domestic dogs as the main responsible for maintaining the epidemiological chain of the disease, and knowing that more than half of infected dogs do not manifest the disease signs, leishmaniasis They have been considered as a major public health problem. We evaluated the clinical and immunological profile of dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in São Luís- MA. It collected 20 blood samples from positive and symptomatic animals for Canine Visceral Leishmaniasis (LVC), 20 positive animals, and asymptomatic and 10 animals known to be negative for the disease. Samples were analyzed by immunoassay (DPP/Biomanguinhos) and by ELISA (EIE/Biomanguinhos) for indirect detection of anti-*Leishmania* antibodies. Culture was also performed to verify the presence of promastigotes of the parasite in positive samples. The samples were submitted for evaluation of the erythrocyte series, leukocyte and platelet, and for determining the concentrations of urea, creatinine, AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase) and albumin. The rates of serum of animals were taken to the Infectious Disease Immunology Laboratory at UFMG for analysis and quantification of IFN- γ and IL-10 cytokines. It was observed that the most common clinical signs for LVC were lymphadenopathy, weight loss, ulcers and onychogryphosis. It can be concluded that there were significant changes in the values of parameters of symptomatic animals and asymptomatic for LVC and that AST, ALT, urea and creatinine obtained from the biochemical analyzes of the animals were not statistically significant, however albumin analyzes showed statistically significant differences between groups ($P < 0.05$). Regarding immunological analysis, it was observed that there was a significant increase in IFN- γ levels in asymptomatic animals and a significant increase of IL-10 in symptomatic patients, and was statistically different between groups ($P < 0.05$).

Key Words: leishmaniasis, clinical signs, dog, immunology

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sinais clínicos dos cães positivos e com sintomatologia (CS) para Leishmaniose Visceral Canina (LVC) atendidos no Hospital Veterinário da UEMA.....43

Tabela 2. Média dos valores hematológicos dos cães do grupo controle (GC), grupos dos CA e grupo dos CS naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*.....44

Tabela 3. Média dos valores bioquímicos dos cães do grupo controle (GC), grupos dos CA e grupo dos CS naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*.....45

Tabela 4. Quantificação da IL-10 no soro sanguíneo. Média e desvio-padrão do grupo de cães assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, obtidos no ensaio de ELISA de captura.....45

Tabela 5. Quantificação do IFN- γ no soro sanguíneo. Média e desvio-padrão do grupo de cães assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, obtidos no ensaio de ELISA de captura.....46

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Produção de IgG, médias e desvios-padrão, no soro de cães assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, quantificada por ELISA de captura. O teste de análise de variância não indicou diferença estatística entre os dois grupos de cães estudados ($P < 0,05$).....42
- Figura 2.** Produção de IL-10, médias e desvios-padrão, no soro de cães assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, quantificada por ELISA de captura (“cut off”= 0,598). Onde a coluna A é composta pelo grupo de CS e a coluna B pelo grupo de CA. O teste de análise de variância não indicou diferença estatística entre os dois grupos de cães estudados ($P < 0,05$).....46
- Figura 3.** Produção de IFN- γ , médias e desvios-padrão, no soro de cães assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, quantificada por ELISA de captura (“cut off”= 0,553). Onde a coluna A é composta pelo grupo de CA e a coluna B pelo grupo de CS. O teste de análise de variância não indicou diferença estatística entre os dois grupos de cães estudados ($P < 0,05$).....47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl- microlitro

CS- Cães sintomáticos

CA- Cães assintomáticos

APC's- Células apresentadoras de antígenos

BSA - Albumina de Soro Bovino

CEEA- Comitê de Ética e Experimentação Animal

Células NK- Natural Killer

CMSP- Células mononucleares de sangue periférico

DPP- Dual Path Platform

EDTA- Ethylenediamine tetraacetic acid

EIE- Ensaio Imunoenzimático

EIE/LVC EIE- Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos

ELISA- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

GC- Grupo controle

IFN-γ- Interferon gama

Ig(s)- Imunoglobulinas

IL- Interleucina

iNOS- Óxido Nítrico Sintetase

LC- Leishmaniose cutânea

LTA- Leishmaniose Tegumentar Americana

LV- Leishmaniose Visceral

LVC- Leishmaniose Visceral Canina

LVH- Leishmaniose Visceral Humana

MEM- Minimum Essential Medium

min- minuto

mL- microlitro

NNN- Novy, McNeal e Nicolle

NO- Óxido Nítrico

OMS- Organização Mundial da Saúde

PBS- phosphate buffered salin

RNA- Ácido Ribonucléico

RNAm- RNA mensageiro

RNI- Intermediário Reativo de Nitrogênio

ROI- Intermediário Reativo de Oxigênio

rpm- rotações por minuto

TGF- β - Fator de Transformação do Crescimento beta

Th-1- T helper 1

Th-2- T helper 2

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

UEMA- Universidade Estadual do Maranhão

VSA- antígeno solúvel vacinal

WHO- World Health Organization

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 19 |
| 2.1 Histórico | 19 |
| 2.2 Aspectos gerais das leishmanioses | 20 |
| 2.3 Sinais clínicos da Leishmaniose Visceral Canina | 21 |
| 2.4 Imunologia | 23 |
| 3 OBJETIVOS | 35 |
| 3.1 Geral | 35 |
| 3.2 Específicos | 35 |
| 4 JUSTIFICATIVA | 36 |
| 5 METODOLOGIA | 37 |
| 5.1 Animais | 37 |
| 5.2 Colheita e preparação de material para análise | 37 |
| 5.2.1 Colheita de sangue total | 37 |
| 5.2.2 Colheita e processamento de soro sanguíneo | 37 |
| 5.3 Sorologia para a Leishmaniose – ELISA | 38 |
| 5.4 Esfregaços por extensão | 39 |
| 5.5 Isolamento em cultura | 39 |
| 5.6 Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) anti-citocinas | 39 |
| 5.6.1 Quantificação da IL-10 | 39 |
| 5.6.2 Quantificação de IFN- γ | 40 |
| 5.7 Análise estatística | 41 |
| 6 RESULTADOS | 42 |
| 6.1 Pesquisa de IgG pela técnica de ELISA | 42 |
| 6.2 Sinais clínicos de leishmaniose visceral encontrados no grupo de cães com expressão clínica | 43 |
| 6.3 Hemograma e análises bioquímicas | 44 |
| 7 DISCUSSÃO | 48 |
| 7.1 Hemograma e análises bioquímicas | 48 |
| 7.2 Quantificação da IL-10 | 51 |
| 7.3 Quantificação da IFN- γ | 52 |
| 8 CONCLUSÕES | 54 |

| | |
|---------------------------------------|----|
| 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 55 |
| 10 APÊNDICE | 69 |
| 11 ANEXO | |
| Erro! Indicador não definido.0 | |

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças crônicas transmitidas por parasitas intracelulares do gênero *Leishmania*. Os cães domésticos são os principais responsáveis pela manutenção da cadeia epidemiológica da doença, pois vivem diretamente com o homem. Nesse contexto, a leishmaniose vem sendo considerada como importante problema de saúde pública.

As diferentes manifestações clínicas estão relacionadas à espécie de *Leishmania* e a resposta imunológica do hospedeiro, podendo variar desde animais assintomáticos a animais sintomáticos apresentando diversas formas clínicas, como febre, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia e úlceras, este último relacionado à leishmaniose cutânea.

A infecção por *Leishmania* pode desencadear dois tipos de imunidade adaptativa associada à atividade dos linfócitos: a resposta humoral (anticorpos), associada à susceptibilidade à doença, e a resposta celular que preferencialmente promove a resistência à infecção.

Em cães assintomáticos, a infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* normalmente promove a doença sistêmica crônica. No entanto, a evolução pode ser aguda e grave, levando o animal a óbito em poucas semanas, ou a doença pode tornar-se latente e evoluir para a cura clínica espontânea (GENARO, 1993). Nos cães sintomáticos, observa-se uma redução no número de linfócitos TCD4+ concomitante a proliferação do parasita nos macrófagos, sugerindo a ausência da resposta imune efetiva (BOURDOISEAU et al., 1997a).

Os fatores iniciais que contribuem para a inibição ou proliferação dos parasitas nas células do hospedeiro são pouco compreendidos, mas citocinas tais como IFN- γ , interleucina-12 (IL-12), IL-10 e TGF- β são conhecidas por influenciarem na sua replicação nos macrófagos (MURRAY et al., 1995; WILSON et al., 1998; WALKER et al., 1999).

Por outro lado, o papel das citocinas da resposta Th2, como IL-4 e IL-10, nos animais sintomáticos ainda é controverso, havendo cada vez mais evidências que apontam para uma correlação entre estas citocinas e a doença progressiva. As células TCD8+ citotóxicas parecem também estar envolvidas na resistência à leishmaniose visceral (GOTO e LINDOSO, 2004).

Na leishmaniose a indução de óxido nítrico (NO) é um dos principais mecanismos efetores utilizados pelos macrófagos para eliminação de *Leishmania* (LIEW, 1990). Já foi demonstrado que animais infectados apresentam ativação da enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) em órgão infectados (BORIES et al., 1997), entretanto, são insuficientes, os estudos relacionando a presença de óxido nítrico com resistência à infecção nos humanos e nos reservatórios caninos.

Além disso, uma das moléculas fundamentais na indução da produção de óxido nítrico é o IFN- γ , e conforme demonstrado por Santos-Gomes et al. (2008), cães recém-infectados apresentam uma inibição da produção desta citocina, sugerindo um papel imunomodulador do parasita que inibiria a ativação dos macrófagos e conseqüentemente a produção de óxido nítrico. Os estudos que determinam o perfil de citocinas em cães com LVC apresentando as diferentes formas clínicas da doença são escassos e a participação da IL-10 na progressão da doença não está clara.

Dessa forma, os resultados provenientes da análise da expressão do IFN- γ e TNF- β , possibilitam especular que a expressão aumentada e simultânea desses mediadores podem estar intimamente envolvida com mecanismos imunoprotetores durante a LVC, visto que, observou-se aumento dessas citocinas na pele de animais portadores da forma clínica assintomática (MENEZES-SOUZA, 2009).

Diante da importância do cão como reservatório do parasita em regiões endêmicas para LV humana, em decorrência principalmente do intenso parasitismo cutâneo que ocorre nesses animais que são fontes potenciais para flebotomíneos e considerando ainda o grande número de casos de LVC nessas áreas principalmente de casos assintomáticos (ABRANCHES et al. 1991; REIS et al. 2006^a; MENEZES-SOUZA, 2009; RESENDE, 2011), o entendimento do perfil imune é de fundamental importância para o estabelecimento de marcadores que determinariam a resistência/suscetibilidade à infecção por *Leishmania chagasi*.

Além disso, a identificação desses marcadores consiste em importantes pré-requisitos para uma análise mais acurada da resposta imune para ser empregada em estudos de novas estratégias imunoproliféricas ou quimioterápica anti-LVC. Adicionalmente, baseado na similaridade entre os sinais clínicos observados na LV humana e canina, assim como, na evolução da história natural da doença, o estudo da LVC tem sido indicado como alternativa para o entendimento da patogênese da doença humana (SANCHEZ et al. 2004; REIS et al. 2006^a; RESENDE, 2011).

Desta forma torna-se importante a realização de estudo da expressão de citocinas, na infecção natural por *Leishmania (Leishmania) chagasi* com e sem manifestações clínicas no município de São Luís- MA.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

Os agentes etiológicos das leishmanioses foram observados inicialmente no final do século XIX por Cunningham, na Índia, ao descrever formas amastigotas em casos humanos denominados “Calazar”. Em 1903, Leishman observou corpúsculos ovais com 2-3 µm de diâmetro em preparações de baço de um soldado inglês que havia morrido de febre Dum-Dum, contraída em Calcutá na Índia. Nesse mesmo período, Donovan relatou a observação destes parasitas em aspirados esplênicos de um hindu com 12 anos de idade e que estava acometido por febre irregular, enquanto Ross demonstrou que estes organismos não eram esporozoários, denominando-o *Leishmania donovani* (BADARÓ, 2002).

O papel do cão como reservatório da *Leishmania* foi descrito pela primeira vez por Nicolle e Comte, em 1908, na Tunísia, quando experimentalmente foi comprovada a infecção deste animal. Posteriormente, em inquérito realizado naquele país, foi comprovada a transmissão natural em cães e assim registrado o primeiro foco de LVC no mundo. No Brasil, as primeiras evidências de transmissão da LVC foram em Abaeté-PA, durante os trabalhos desenvolvidos por comissão do Instituto Oswaldo Cruz para a avaliação dessa problemática (LACERDA, 1994). Porém, apenas em 1955, foi estabelecido por Deane & Deane (1954) o papel do cão como reservatório, quando constatada a transmissão em cães residentes em zona urbana do município de Sobral (CE), verificando-se frequência muitas vezes intensa do parasitismo cutâneo.

No Brasil, Lutz e Neiva em 1912 descreveram pela primeira vez o flebotomíneo *L. longipalpis* como transmissor da LV endemicamente encontrado na região nordeste (GUSHI, 2008). A primeira orientação epidemiológica foi determinada a partir dos relatórios de Penna, em 1934, em exames histopatológicos de fígado obtidos por meio de viscerotomia post-mortem em suspeitos de febre amarela. Registraram-se 41 casos de LV em 47.000 amostras histológicas com a seguinte distribuição geográfica dos casos positivos: Ceará 15, Bahia 9, Sergipe 5, Alagoas 4, Pará 3, Piauí 3, Rio Grande do Norte 1 e Pernambuco 1 (BERMAN, 2006; LAINSON, 2005; PARAENSE, 2005).

A doença esteve ausente, no Maranhão, até o final da década de 1970 (BRANDÃO, 1974). Em 1980, começou a incidir em nosso meio (SILVA et al., 1983), a partir de bairros da cidade de São Luís, logo se expandindo para outros municípios da

Ilha de São Luís (NASCIMENTO et al., 1996; MENDES et al., 2002). Silva et al. (1997), estudando a evolução do calazar na Ilha de São Luís, mostrou que a letalidade hospitalar anunciada, de 3,9%, estava subestimada, sendo na realidade de 6,7%, em decorrência dos óbitos que ocorreram nas residências de pacientes não notificados.

Em 2002, a equipe do Centro de Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CREDIP) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), levantando os dados de calazar encontrou uma letalidade de 11,7%. Em 2003, seus integrantes acompanharam as ocorrências de calazar e detectaram uma letalidade de 12,5% (SILVA et al., 2008).

2.2 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses têm como agentes etiológicos microrganismos que são parasitas intracelulares obrigatórios capazes de infectar diferentes espécies de mamíferos e nestes se reproduzem dentro do sistema fagocítico mononuclear. Esses micro-organismos foram sistematicamente alocados no grupo dos chamados protozoários eucariontes e são taxonomicamente classificados na Ordem *Kinetoplastida*, Família *Trypanosomatidae*, Gênero *Leishmania*, divididos nos Subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (BRASIL, 2006; GONTIJO; MELO, 2004; LAINSON et al., 1987).

Leishmania (Leishmania) chagasi Cunha & Chagas, 1937 ocorre nas Américas, sendo responsável pela LV em seres humanos e cães (LAINSON et al., 1987). Este protozoário apresenta três ciclos epidemiológicos distintos no Brasil: o ciclo silvestre, o ciclo doméstico ou peridoméstico, que podem se sobrepor, e o ciclo antroponótico artificial epidêmico (GONTIJO; MELO, 2004).

Os cães domésticos são os principais responsáveis pela manutenção da cadeia epidemiológica da doença, pois vivem diretamente com o homem. Nesse contexto, é que as leishmanioses vêm sendo considerada como importante problema de saúde pública. Constituindo uma das mais importantes doenças tropicais negligenciadas no mundo, erradicada em quase todos os países desenvolvidos. Em consequência dos terríveis sofrimentos e as incapacidades permanentes que ela provoca esta enfermidade desperta pouca atenção do governo, pois persiste exclusivamente nas comunidades mais pobres e marginalizadas que vivem nas regiões tropicais e subtropicais (OMS, 2007).

A OMS estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas.

Atualmente, a doença afeta 98 países estimando-se uma prevalência de 14 milhões de casos e 50 mil óbitos, número este que, no caso de doenças parasitárias, só é superado pelas mortes causadas por malária. (WHO, 2013).

A epidemiologia da leishmaniose depende das características das espécies de parasitas, as características ecológicas dos locais de transmissão, a exposição da população humana ao parasita e comportamento humano. Segundo a WHO (2014) existem três formas principais da doença.

A leishmaniose visceral humana (LV também conhecida como calazar) é fatal se não tratada. Caracterizada por acessos irregulares de febre, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia e anemia. É altamente endêmica no subcontinente indiano e na África Oriental. Estima-se que 200.000 novos casos de LV ocorrem no mundo a cada ano. Mais de 90% dos novos casos ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão.

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum da leishmaniose e provoca úlceras nas partes expostas do corpo, deixando cicatrizes. Cerca de 100% dos casos de LTA ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, Ásia Central e Oriente Médio. Aproximadamente dois terços dos novos casos ocorrem em seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e a República Árabe da Síria. Estima-se que 0,7 a 1,3 milhões de novos casos ocorrem anualmente em todo o mundo.

A leishmaniose mucocutânea leva à destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta. Quase 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem no Estado Plurinacional da Bolívia, Brasil e Peru.

O cão é o principal reservatório doméstico de *Leishmania chagasi/infantum*. A infecção canina geralmente precede o aparecimento de casos humanos, sendo ainda, mais prevalente que a doença humana. Os cães preenchem as condições necessárias para serem reservatórios de *L. chagasi*, por serem altamente susceptíveis à infecção, por apresentarem intenso parasitismo cutâneo e também pelo seu convívio junto ao homem (DANTAS-TORRES, 2006).

2.3 Sinais clínicos da Leishmaniose Visceral Canina

Os cães infectados podem apresentar uma grande variedade de perfis clínicos, desde aparentemente saudáveis a severamente acometidos, sendo este grau de apresentação dos sinais clínicos determinado pela cepa do parasito, genética e estado

imunológico do animal (HANDMAN, 2002). Um fato intrigante é que a doença canina pode permanecer clinicamente inaparente por longos períodos (LONGSTAFFE et al., 1983) e este é um dos principais problemas na erradicação da leishmaniose, por isso é de extrema importância o estudo imunológico dessa enfermidade.

Na LVC tem sido reportado que altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania*, principalmente IgG e IgM, são detectados em animais sintomáticos (BARBIÉRI, 2006, MARQUES, 2008), contudo, não fornecem imunoproteção. Esse perfil de imunoglobulinas elevado, conseqüentemente leva a formação de complexos imunes solúveis no sangue, que são depositados em vários órgãos e tecidos como os rins, vasos sanguíneos, dentre outros, favorecendo o aparecimento de vários sintomas com epistaxe, poliúria e polidipsia, uveíte, conjuntivite e episclerite, úlceras de pele, hiperqueratose e poliartrite, hepatoesplenomegalia, perda acentuada de peso, febre e onicogribose, dentre outros (CIARAMELLA e CORONA, 2003, BRACHELENTE et al., 2005, BARBIERI, 2006, CARDOSO et al., 2007, REIS et al., 2010,). O depósito de complexos imunes sobre o endotélio vascular desencadeia uma reação de hipersensibilidade do tipo III (MARQUES, 2008).

O elemento patogênico secundário está diretamente relacionado com o tipo de resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro mamífero, sendo responsável pelas manifestações clínicas características (CIARAMELLA e CORONA, 2003).

A LVC, de acordo com o aparecimento da sintomatologia, pode ser classificada como animais assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos (IKEDA et al., 2003; BRACHELENTE et al., 2005; REIS et al., 2006; CARDOSO et al., 2007). Contudo, outra classificação vem sendo proposta de acordo com os sinais clínicos, as alterações laboratoriais características e a confirmação do parasita *L. chagasi*, em doença clínica ou subclínica (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Na LVC a anemia é um dos principais achados laboratoriais em cães naturalmente infectados, entretanto sua patogênese é muito complexa e pouco conhecida, podendo ser ocasionada por hemorragia, falha renal, aplasia medular, dentre outras causas (KOUTINAS et al., 1999, CIARAMELLA e CORONA, 2003, REIS et al., 2006, DANESHVAR et al., 2009). Com relação à contagem de células brancas, as principais alterações relatadas são leucocitose e neutropenia (FREITAS et al., 2011), leucopenia com eosinopenia, linfopenia e monocitopenia (REIS et al., 2006; PALUDO et al., 2007).

Na avaliação bioquímica, é comumente observado aumento nos valores de ureia (ABREU-SILVA et al., 2008), proteínas totais e globulinas (REIS et al., 2006, ABREU-SILVA et al., 2008). A uremia está diretamente relacionada à falha da função renal (CIARAMELLA e CORONA, 2003). Já a hiperproteinemia com hiperglobulinemia está associada ao aumento na produção de anticorpos anti-*leishmania* (CIARAMELLA e CORONA, 2003).

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos, embora sejam limitados no diagnóstico da LVC, são de grande utilidade na avaliação do estado clínico do animal e da extensão das lesões em órgãos e tecidos, podendo dar indicações sobre o prognóstico do animal (IKEDA et al., 2003, REIS et al., 2006).

2.4 Imunologia

A invasão do hospedeiro por *Leishmania* envolve componentes da imunidade inata e adaptativa, bem como, de resposta imunitária humoral e celular. Na infecção por *Leishmania chagasi*, mostrou-se que a imunidade inata tem um papel crucial no controle da disseminação do parasita, e, as primeiras células a surgir no local de infecção são os neutrófilos, dando início à fagocitose dos promastigotas, seguidos pelos macrófagos (SANTOS-GOMES et al., 2008; MENEZES-SOUZA, 2009).

As citocinas são produzidas em resposta a diferentes antígenos e podem estimular diversas respostas celulares envolvidas na imunidade e na inflamação. A ação das citocinas frequentemente é pleiotrópica e redundante. As citocinas geralmente influenciam na síntese e a ação de outras citocinas, levando a uma cascata onde a segunda ou a terceira citocina pode mediar os efeitos biológicos da primeira. Duas citocinas, podem ter efeitos antagônicos ou sinérgicos, locais ou sistêmicos. As respostas às citocinas consistem em mudanças na expressão genética nas células alvo, o que resulta em novas funções e algumas vezes, na proliferação de células-alvo.

As citocinas são classificadas em três categorias: mediadores e reguladores da imunidade inata, mediadores e reguladores da imunidade adaptativa, e estimuladores da hematopoiese. Em geral as citocinas da imunidade inata e adaptativa são produzidas por diferentes populações de células e agem em diferentes células alvo. Estas distinções não são absolutas, uma vez que uma mesma citocina pode ser produzida durante reações da imunidade inata ou adaptativa e diferentes citocinas podem ter ações sobrepostas. As citocinas da imunidade inata são mediadores locais ou sistêmicos da inflamação,

produzidas em grande quantidade principalmente pelos macrófagos, neutrófilos e células natural-killer (NK) em resposta a agentes infecciosos apresentam efeitos locais e sistêmicos e usualmente são detectáveis no soro. Diferentemente, as citocinas da imunidade adaptativa regulam o crescimento e a ativação de linfócitos de células efetoras. Estas citocinas são produzidas principalmente pelos linfócitos T, em pequenas quantidades, em resposta ao reconhecimento específico de antígenos estranhos, usualmente são indetectáveis no soro e quase sempre têm apenas efeito local (ABBAS et al., 2007).

O estabelecimento da infecção processa-se em três etapas principais: 1. O reconhecimento e entrada de *Leishmania* no macrófago, resistindo às componentes citotóxicos do soro; 2. Sobrevivência e multiplicação da *Leishmania* dentro dos fagolisossomas dos macrófagos; 3. Modulação da resposta imunitária mediada pelos linfócitos T (HADMAN e BULLEN, 2002; MENEZES-SOUZA, 2009).

A imunidade efetiva para *Leishmania sp.* é mediada por células e resulta na morte do parasita por macrófagos ativados. Em macrófagos, o óxido nítrico produzido a partir do precursor L-arginina, pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), é uma das mais importantes moléculas responsáveis pela morte do parasita, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (BOGDAN, 2001).

Sendo o parasita obrigatoriamente intracelular o seu primeiro alvo são os fagócitos. Porém, o controle da infecção está associado à destruição intracelular dos amastigotas pelos macrófagos, pela ativação das células NK e pelos linfócitos T (SANTOS-GOMES et al., 2008; MENEZES-SOUZA, 2009).

Os macrófagos possuem várias ações antimicrobianas, mas o principal mecanismo leishmanicida é a respiração oxidativa que leva à produção de óxido nítrico (NO), (SANTOS-GOMES et al., 2008; SILVA, 2011). Verificou-se que a produção de NO é dependente da produção do IFN- γ e do TNF- α (LIEW et al., 1990; SILVA, 2011).

Apesar dos macrófagos serem células especializadas na fagocitose e destruição de agentes patogênicos, a *Leishmania* possui um conjunto de estratégias que permitem, não só, alterar a produção de citocinas importantes para uma resposta protetora, mas também contrariar a atividade dos macrófagos e resistir ao sistema imunitário do hospedeiro.

Além da imunidade inata, a infecção por *Leishmania* pode desencadear dois tipos de imunidade adaptativa, associadas à atividade dos linfócitos: a resposta humoral

(anticorpos) associada à susceptibilidade à doença, e a resposta celular que preferencialmente promove a resistência à infecção. Na resposta humoral, elevados valores de anticorpos não impedem a progressão da doença e estão associados a uma diminuição da imunidade celular (ROSA, 2012).

A elevada produção de imunoglobulinas favorece o parasita, porque parece facilitar a sua internalização nos macrófagos, e no caso dos cães contribuem para a patologia, como é o caso da insuficiência renal que é promovida pela deposição de anticorpos ao nível dos rins (SANTOS-GOMES et al., 2008).

Quatro subclasses de IgG anti-*Leishmania* (IgG1-IgG4) têm sido descritas em cães (MAZZA et al., 1995). Atualmente, alguns autores procuram associar a presença de determinado subtipo de IgG aos diferentes quadros clínicos de LVC, buscando assim, a determinação de marcadores sorológicos de proteção ou de progressão da doença. A discussão entre autores, sobre a presença de uma determinada subclasse e a consequente predisposição à manifestação ou não de sinais clínicos em cães infectados, é ainda controversa (BARBIÉRI, 2006; MENEZES-SOUZA, 2009).

Trabalhos evidenciam que o perfil de imunoglobulinas se apresenta como um importante marcador para monitoramento do prognóstico do estado clínico e da densidade parasitária (SOLANO-GALLEGO et al. 2001; QUINNELL et al. 2003; REIS et al. 2006b; MENEZES-SOUZA et al, 2009; RESENDE et al. 2011; SILVA, 2011), geralmente associado à gravidade do quadro clínico e ao aumento da replicação de formas amastigotas em órgãos linfoides.

Enquanto, alguns autores associam a presença de sinais clínicos de LVC a altos níveis de IgG1 (DEPLAZES et al., 1995; NIETO et al. 1999; QUINNELL et al., 2003; INIESTA et al., 2005) outros relacionam o subtipo IgG2 a manifestação clínica da doença (LEANDRO et al., 2001; REIS et al., 2006b; COSTA-VAL et al., 2007; MENEZES-SOUZA, 2009; RESENDE, 2011; SILVA, 2011).

Na infecção experimental ou natural, o desencadeamento da resposta humoral, refletida pelo aumento nos níveis de classes e subclasses de Ig(s) é frequentemente associado à progressão clínica da doença, e o estabelecimento da imunidade efetiva anti-LVC parece ser dependente da imunidade celular específica (CABRAL et al. 1992; PINELLI et al. 1994; REIS et al. 2006a; SILVA, 2011). A avaliação dos níveis das subclasses IgG1 e IgG2, tem sido indicado como marcador de evolução clínica mais importante do que a avaliação dos níveis de IgG total (DEPLAZES et al. 1995; RESENDE, 2011; SILVA, 2011).

De maneira geral, a população de linfócitos TCD4⁺ auxiliares divide-se em duas subpopulações: linfócitos TCD4⁺ auxiliares tipo1 (Th1) e linfócitos TCD4⁺ auxiliares tipo 2 (Th2), as quais são definidas com base no seu padrão de citocinas (MOSMANN et al., 1986).

Em humanos e especialmente em camundongos, caracterizou-se que a resistência à infecção está associada a resposta Th1 com a produção de citocinas IL-12, IFN- γ e TNF- α , enquanto a suscetibilidade deve-se a resposta regulatória Th2 com a produção de IL-4, IL-10 e TGF- β (BARRAL et al., 1993; BOGDAN, 2001; KANE et al., 2001; MURRAY et al., 2002; TRINCHIERI et al., 2003; TRINCHIERI et al., 2007).

O INF- γ é produzido pelas células T e células NK, estimuladas pela IL-12 (TRINCHIERI, 1993). Em pacientes com LV a maior fonte de INF- γ são as células TCD4⁺ (BACELLAR et al., 2002). A citocina INF- γ induz a síntese de óxido nítrico sintase (iNOS) (REINER e LOCKSLEY, 1995) que produz óxido nítrico e leva a morte intracelular dos amastigotas por apoptose, em modelos murinos (EVANS et al., 1993) ativando as funções microbicidas (REINER e LOCKSLEY, 1995). Regula positivamente a produção de TNF- α , uma citocina pró inflamatória (STEIN e GORDON, 1991) envolvida na patogênese da LV e de outras doenças parasitárias e bacterianas (GRAU et al., 1989; SARNO et al., 1991).

Esta citocina junto com a IL-2 tem sido mostrada como importante para a resposta imune e para a morte das leishmanias e a sua ausência representa o defeito chave na resposta imune a LV (CARVALHO et al., 1985). A produção de INF- γ no período inicial da infecção humana por *L. (L.) chagasi*, foi associada à capacidade do hospedeiro em prevenir a progressão da doença (CARVALHO et al., 1992), pois esta citocina é crítica para a proteção inata ou adquirida (CARVALHO et al., 1992; MURRAY et al., 1992). Estudos mostraram que a inabilidade para o controle da replicação de *L. (L.) donovani*, no início da infecção em camundongos, foi associada à baixa capacidade das células esplênicas em produzir *in vitro* INF- γ (KAYE; CURRY; BLACKWELL, 1991).

Carvalho et al. (1994) demonstraram *in vitro* que a restauração da resposta linfoproliferativa para o antígeno de *Leishmania* sp. ocorreu pela adição de IL-2 e INF- γ nas culturas de linfócitos. Os possíveis papéis destas citocinas na restauração da resposta pelas células T incluem: o aumento da expressão das moléculas de MHC de

classe II nas APC's (REINER et al., 1988), a regulação negativa da produção de IL-4 e IL-10 (MOSMANN e COFFMAN, 1987) e o aumento da ativação de macrófagos (LIEW ET al., 1989).

O INF- γ desenvolveu um papel central na limitação do crescimento de *Leishmania* sp. em macrófagos murinos e humanos e foi limitante na progressão das leishmanioses (CARVALHO et al., 1992; MURRAY et al., 1992). Assim, a modulação sistêmica ou localizada dos níveis de INF- γ pode ser um determinante crítico da resolução da enfermidade (MURRAY et al., 1992). Apesar de sua importância no controle da enfermidade, somente o INF- γ não foi suficiente para eliminar o parasita, pois houve necessidade também da produção de IL-12, migração de células T e células dendríticas para os sítios de parasitismo crônico (MELBY et al., 2001).

A apoptose de células T foi mostrada na LV experimental, em uma porcentagem de 40% de células TCD4+ de camundongos susceptíveis, concomitante a significativa queda na secreção de IL-2 e INF- γ durante a infecção por *L. (L.) donovani*, estando estes eventos relacionados à imunossupressão (DAS et al., 1999).

O nível de INF- γ quando analisado isoladamente, não foi um bom indicador de resistência à enfermidade ou da eventual cura (KARP et al., 1993; CHAMIZO; MORENO; ALVAR, 2005), porque cães infectados com *L. (L.) chagasi*, apresentando ou não sintomatologia manifesta, acumularam níveis similares de INF- γ no soro e na medula óssea (QUINNELL et al., 2001). A produção de INF- γ foi fortemente associada à produção de anticorpos, o que sugeriu uma grande regulação positiva de resposta imune anti-*Leishmania* no hospedeiro infectado (QUINNELL et al., 2001).

Wilson et al. (1996) observaram que na fase inicial da infecção, há elevada carga parasitária no fígado, diminuindo progressivamente. Porém a multiplicação no baço se mantém baixa, indicando que *L. (L.) chagasi* promoveu uma replicação eficiente no fígado dos camundongos infectados, sugerindo a ausência de INF- γ neste órgão. Enquanto que no baço, a presença de INF- γ inibiu a replicação do parasita.

Santos-Gomes et al. (2002), observaram em células mononucleares do sangue periférico, de cães inoculados com formas amastigotas de *L. (L.) chagasi*, uma baixa proporção de cães infectados, não estimulados ou especificamente estimulados, que mostraram a expressão de IL-12, IL-2 e INF- γ e este resultado quando associado à baixa detecção de IL-10, foi sugerido como ocorrência de um “estabelecimento de silêncio” do parasita.

Assim, a produção de INF- γ esteve elevada por um breve período durante a fase prepatente na infecção experimental e foi ausente durante a fase sintomática. Foi observada também produção de INF- γ em cães não infectados, mas somente na cultura de células estimuladas pela concanavalina A.

No estudo realizado por Melby et al. (2001) em camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) donovani* foi observado o aumento na produção de INF- γ e IL-12, várias semana após a infecção, ao mesmo tempo em que a carga parasitária do baço e do fígado declinaram.

Holzmuller et al. (2005) mostraram que cães imunizados com antígeno purificado de promastigotas de *L. (L.) infantum* exibiram uma eficiente resposta imune celular *in vitro* contra a infecção, caracterizada pelo aumento da atividade leishmanicida do INF- γ , que ativou macrófagos, induzindo a produção de grandes quantias de óxido nítrico, um potente leishmanicida, com atividade tanto *in vitro* como *in vivo*.

Strauss-Ayali et al. (2005) verificaram que as células mononucleares do sangue periférico de cães experimentalmente infectados por *L. (L.) infantum* proliferaram e produziram INF- γ . Em cães naturalmente infectados não houve proliferação de INF- γ , entretanto, em cães controle, não proliferaram nem produziram INF- γ . Quando foi realizado o estímulo destas células com IL-12 exógeno, houve uma tendência no aumento da proliferação e considerável aumento na expressão e produção de INF- γ em todos os cães infectados, pois a IL-12 favorece a resposta imune do tipo Th1, como a ativação de macrófagos e células NK, além de induzir a produção do INF- γ (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1997).

A incapacidade das células TCD4⁺ de secretar níveis significantes de citocinas ativadoras de macrófagos, tais como INF- γ , em resposta aos antígenos de *Leishmania* sp. tem importante papel na imunopatologia da enfermidade (MURRAY; RUBIN; ROTHERMEL, 1983; CARVALHO et al., 1985).

Em cães assintomáticos, a infecção por *L. (L.) chagasi* normalmente evolui para doença sistêmica crônica. Em alguns casos, a evolução pode ser aguda e grave, levando o animal a óbito em poucas semanas, ou a doença pode tornar-se latente e evoluir para a cura clínica espontânea (GENARO, 1993). Nos cães sintomáticos, observa-se uma redução no número de linfócitos TCD4⁺ concomitante a proliferação do parasita nos macrófagos, o que sugere a ausência de resposta imune efetiva no sentido de eliminar o parasita (BOURDOISEAU et al., 1997a).

A predominância da resposta do tipo Th1 (com simultânea expressão de IFN- γ , IL-2 e IL-12) por um curto período de tempo, evidenciou que esse tipo de respostas é necessária para o controle da infecção e retarda a progressão da enfermidade em cães experimentalmente infectados por *L. (L.) infantum*, mas foi incapaz de controlar a infecção por um maior intervalo de tempo (SANTOS-GOMES et al., 2002).

Os fatores iniciais que contribuem para a inibição ou proliferação dos parasitas nas células do hospedeiro são pouco compreendidos, mas citocinas como IFN- γ , interleucina-12 (IL-12), IL-10 e TGF- β influenciam a replicação desses parasitas nos macrófagos (MURRAY et al., 1995; WILSON et al., 1998; WALKER et al., 1999).

Lima et al. (2007) utilizando a técnica de ELISA de captura, dosaram TNF- α no soro de cães sintomáticos com infecção natural por *L. chagasi* e cães não infectados e observaram que os níveis de TNF- α eram semelhantes entre os dois grupos avaliados. Por outro lado, algumas investigações não encontraram diferenças na expressão de IFN- γ e TNF- α ao avaliarem a medula óssea (QUINNELL et al. 2001) ou esplenócitos (LAGE et al. 2007) em cães naturalmente infectados portadores de diferentes formas clínicas da LVC.

Adicionalmente, em um recente trabalho desenvolvido por Sanchez-Robert et al. (2008) foi demonstrado expressão aumentada de IFN- γ em PBMC (Peripheral blood mononuclear *cells*) nas formas clínicas mais graves da LVC, o que também aponta para o papel imunopatológico dessas citocinas nos processos relacionados a inflamação generalizada e visceral.

O envolvimento de IFN- γ e TNF- α na resposta imune protetora anti-LVC, também foi descrito por Alves et al. (2009) ao avaliarem linfonodos de cães naturalmente infectados, onde foi observado correlação negativa da expressão dessas citocinas com evolução clínica e carga parasitária nesse compartimento.

Dessa forma, os resultados provenientes da análise da expressão de IFN- γ e TNF- α , possibilitam especular que a expressão aumentada e simultânea desses mediadores deve estar intimamente envolvida com mecanismos imunoprotetores durante a LVC, visto que, observou-se aumento dessas citocinas na pele de animais portadores da forma clínica assintomática (MENEZES-SOUZA, 2009).

Por outro lado, o papel das citocinas da resposta Th2, como IL-4 e IL-10, nos animais sintomáticos ainda é controverso, havendo cada vez mais evidências que apontam para uma correlação entre estas citocinas e a progressão da doença. As células

TCD8+ citotóxicas parecem também estar envolvidas na resistência à leishmaniose visceral (GOTO e LINDOSO, 2004).

A IL-10 é produzida por macrófagos, células T e B (HOWARD e O'GARRA, 1992; GASIM et al., 1998) e por monócitos humanos ativados por lipopolissacarídeos (LPS) (DE WAAL MALEFYT et al., 1991a). Apresenta efeito pleiotrófico em várias células. É um potente supressor dos mecanismos efetores microbicidas conhecidos da ativação de macrófagos, incluindo a regulação negativa das células apresentadoras de antígenos (APC) (FIORENTINO et al., 1991; DE WAAL MALEFYT et al., 1991a), a produção de citocinas (INF- γ , TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, entre outras) (BOGDAN; VODOVOTZ; NATHAN, 1991; DE WAAL MALEFYT et al., 1991b; RALPH et al., 1992) e os eventos metabólicos associados à ativação de macrófagos, como a produção de intermediários reativos de oxigênio (ROI) e nitrogênio (RNI) (BOGDAN; VODOVOTZ; NATHAN, 1991).

É uma citocina antagônica ao INF- γ (MURRAY; RUBIN; ROTHERMEL, 1983), influenciando na resolução parcial da infecção pelo bloqueio da sua produção (FIORENTINO; BOND; MOSMANN, 1989; MOORE et al., 1990).

A IL-10 na infecção humana ou experimental tem ampla ação nas APC's e nos mecanismos coestimulatórios das células T, na proliferação de células T e na secreção de citocinas que inativam células Th1 (BOGDAN; VODOVOTZ; NATHAN, 1991; KARP et al., 1993; WILSON et al., 1998; BACELLAR et al., 2000). É a principal citocina que pode regular negativamente a resposta imune em humanos com LV e modelos murinos (BARRAL et al., 1993; BACELLAR et al., 2000).

Embora desprovida de propriedades pró inflamatórias (KUHN et al., 1993), a IL-10 claramente tem o potencial de incapacitar a defesa do hospedeiro contra a *Leishmania* sp. e levar à infecção visceral e em paralelo, enfraquecer a responsividade aos quimioterápicos, em camundongos (MURRAY et al., 2002).

A IL-10 está relacionada à patogênese da infecção em humanos (KARP et al., 1993). Estudos mostraram que na LVH há níveis significativamente altos de IL-10 e também de INF- γ , comprovando a existência dos dois tipos de resposta imune Th1 e Th2 (KARP et al., 1993; KENNEY et al., 1998). Outro estudo sugeriu que a IL-10 atuou como um fator regulatório que permitiu o balanceamento entre os dois tipos de respostas (KEMP et al., 1999). A neutralização de IL-10, reestabeleceu a proliferação de linfócitos e a produção de INF- γ pelas células mononucleares do sangue periférico, de pacientes com LV ativa (CARVALHO et al., 1994; GHALIB et al., 1995).

Ghalib et al. (1993) relataram que pacientes com LV aguda têm habilidade para responder especificamente ao antígeno de *Leishmania* sp. com produção de IL-10, sugerindo que esta seja importante para a persistência do parasita nas células do hospedeiro, possivelmente porque macrófagos e células T estejam produzindo IL-10 em resposta a *Leishmania* sp. e esta seja importante para a regulação negativa da resposta das células T.

Gasim et al. (1998) estudaram o plasma e os queratinócitos de pacientes tratados para LV que desenvolveram leishmaniose dermal pós-calazar e Holaday (2000) estudou as células do sangue periférico, também de pacientes em tratamento para LV e sugeriu que níveis altos da secreção de IL-10 endógeno está relacionada com a esplenomegalia, hepatomegalia e a progressão da LV após a infecção da derme. A observação da variabilidade dos níveis desta citocina talvez explique a variabilidade da resposta imune celular obtida pelos pacientes com LV.

Em um estudo semi-quantitativo do aspirado de medula óssea, em cães naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi*, sugeriram que ao contrário do que ocorre para a LVH, a citocina IL-10, talvez não represente o papel chave na imunossupressão em cães, pois foram encontrados níveis baixos de IL-10 (QUINNELL et al. 2001).

Em estudo com células mononucleares do sangue periférico de cães experimentalmente infectados com amastigotas de *L. (L.) infantum*, foi observado a baixa proporção de animais que expressaram IL-10, sugerindo que esta citocina talvez não tenha efeito inibitório direto sobre INF- γ e IL-2 e que esta observação talvez não tenha relação com a imunossupressão da resposta mediada por células nestes animais ou com a doença severa, associada à expressão da IL-10, pois alguns animais não conseguiram controlar a infecção (SANTOS-GOMES et al., 2002).

É importante destacar que há diferença entre a progressão da enfermidade na infecção experimental e na natural, já que a saliva do vetor tem função imunomodulatória. Paranhos et al. (1993) em um estudo com cães, observaram que estes quando inoculados com lisado de glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis* simultânea a inoculação de promastigotas de *L. (L.) chagasi*, ambos pela via intradérmica, foi induzida uma eosinofilia significativa, sem evidências de infecção, diferente daqueles cães inoculados com promastigotas de *L. (L.) chagasi*, pela via intravenosa, ou com o lisado de glândula salivar.

Kane e Mosser (2001), visando determinar o papel da IL-10 na progressão da leishmaniose, examinaram o desenvolvimento da lesão após infecção por *L. major* em

camundongos BALB/c geneticamente deficientes para a produção de IL-10. Camundongos BALB/c normais são geneticamente susceptíveis à infecção por *L. major*. Neste estudo, os autores observaram que, enquanto os camundongos normais desenvolveram lesões progressivas que não se curaram no período de acompanhamento, apresentando elevada carga parasitária, os animais IL-10 controlaram a progressão da lesão e a multiplicação do parasita. Ainda neste estudo, em um ensaio realizado *in vitro*, a IL-10 produzida por macrófagos infectados inibiu a ativação dos macrófagos e diminuiu a produção de IL-12 e IFN- γ por estas células, prevenindo a morte dos parasitas.

Belkaid et al. (2001) também demonstraram que a IL-10 é necessária para a sobrevivência e persistência da *L. major*. Camundongos knock-out em IL-10 e camundongos tipo selvagem, tratados com anticorpo anti IL-10R, apresentaram risco de reativação da doença.

Murray et al. (2002) com o objetivo de avaliar a importância da IL-10 na LV, trataram camundongos BALB/c infectados com *L. donovani*, com anticorpo monoclonal anti IL-10R. Os autores verificaram que o bloqueio desse receptor induzia a morte do parasita, e que em animais pré-tratados com anti-IL-10R e tratados com antimônio, potencializaram o efeito do tratamento. A demonstração da eficiência do bloqueio de IL-10R, antes do tratamento com antimônio indica uma importante direção para testes de imunoterapia.

Gama et al. (2004) ao pesquisarem o perfil de citocinas em crianças do estado do Maranhão, Brasil, apresentando a forma assintomática da LV verificaram a produção tanto de citocinas tipo Th1 (IFN- γ , IL-2 e IL-12) quanto de citocinas regulatórias como IL-10 e TNF- α . A detecção de ambas citocinas explicaria a evolução da doença com discretas alterações observada nesta fase, devido provavelmente a um equilíbrio exercido pelo efeito imunorregulatório da IL-10. Os estudos que determinam o perfil de citocinas em cães com LVC apresentando as diferentes formas clínicas da doença são escassos e a participação da IL-10 na progressão da doença não está clara.

Em um estudo realizado por Pinelli et al. (1999), a expressão do RNA mensageiro de IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10 foi qualitativamente determinada em células mononucleares do sangue periférico de cães infectados com *L. infantum*. Verificou-se, em um animal assintomático, a detecção da expressão de todas as citocinas avaliadas, enquanto que, em quatro animais que apresentaram sintomatologia da LVC, apenas a

expressão de IL-4 ou IL-10 foi detectada indicando uma possível participação destas citocinas no desenvolvimento de manifestações clínicas da doença.

No entanto, em trabalho realizado por Quinnell et al. (2001) e Côrrea (2006), não foi constatado o papel imunossupressor da IL-10 na LVC. Cães naturalmente infectados por *L. chagasi* foram comparados com controles não infectados. Verificou-se maior expressão de IFN- γ nos cães infectados, sendo que, não foi observado aumento da expressão de IL-4, IL-18 e IL-10 nestes animais, em relação aos animais não infectados.

Em estudo realizado por Santos-Gomes et al. (2002), com cães infectados experimentalmente com *L. infantum* resultados semelhantes aos de Quinnell et al. (2001) foram verificados, não sendo possível estabelecer uma correlação entre a severidade da doença e a expressão de IL-10. Corrêa et al. (2006) avaliaram de forma quantitativa a produção de IFN- γ , TGF- β e IL-10 em extratos de baço e fígado de cães com e sem sinais clínicos através da técnica de ELISA de captura.

Santos-Gomes et al. (2002), no seu trabalho observou que altos níveis de IL-10 foram encontrados em ambos os grupos de cães. TGF- β foi verificado em níveis mais elevados no grupo de cães assintomáticos. IFN- γ foi encontrado em níveis semelhantes nos dois grupos em estudo, porém em concentrações significativamente inferiores as de IL-10 e TGF- β .

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

Por outro lado, Pinelli et al. (1999) avaliaram a expressão de RNAm em CMSP de cães infectados com *L. infantum* e verificaram no grupo os animais que apresentaram sinais clínicos, que apenas a expressão de IL-4 e IL-10 foi detectada, indicando a possível participação dessas citocinas no desenvolvimento das manifestações clínicas da doença.

Um estudo realizado em camundongos BALB/c infectados com a forma promastigota da *L. (L.) chagasi*, mostrou na cultura de esplenócitos níveis elevados de IL-10 e de INF- γ , sugerindo que outra citocina além de IL-10 seja responsável pela inibição de INF- γ . (WILSON et al., 1998; CÔRREA, 2006). A IL-10, como o TGF- β , foi produzido na infecção por *Leishmania* sp. (HOLADAY, 1999; MOSSER e KARP, 1999) e foi responsável pela indução da arginase I, resultando na proliferação do parasita na célula, levando a progressão da doença (INIESTA et al., 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- ✓ Avaliar o perfil de citocinas de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, com e sem manifestações clínicas da leishmaniose visceral no município de São Luís.

3.2 Específicos

- ✓ Quantificar níveis de IFN- γ e IL-10, no sangue de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*;
- ✓ Comparar níveis de IFN- γ e IL-10, entre os cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* apresentando manifestações clínicas da leishmaniose visceral e os cães que não apresentaram manifestações clínicas da doença;

4 JUSTIFICATIVA

No Brasil, a distribuição da leishmaniose visceral abrange principalmente a região Nordeste com 90% dos casos notificados e o Município de São Luís- MA está entre os mais incidentes, o calazar canino é uma doença sistêmica com um amplo aspecto de características clínicas, com uma população de 40% a 60% dos cães infectados que permanece assintomática. Em função disso, no diagnóstico, considera-se a origem epidemiológica do cão e o conjunto de sintomas apresentados.

A distribuição geográfica da LV revela que a epidemiologia da doença apresenta aspectos paisagísticos, climáticos e sociais bastante diversificados, nos mostrando a grande adaptação do vetor transmissor a diferentes ambientes. *Leishmania (Leishmania) chagasi* Cunha & Chagas, 1937 ocorre nas Américas, sendo responsável pela LV em seres humanos e cães (LAINSON et al., 1987).

Diante da grande importância do cão como reservatório em regiões endêmicas para Leishmaniose humana, considerando ainda o grande número de casos de LVC nessas áreas principalmente de casos assintomáticos, o entendimento do perfil imune é de fundamental importância para o estabelecimento de marcadores que determinariam a resistência/suscetibilidade à infecção por *Leishmania chagasi*.

Pouco se sabe sobre o perfil de citocinas que é expresso nas diferentes formas clínicas dessa enfermidade. A determinação deste perfil, assim como da participação da IL-10 na progressão da doença seria de grande utilidade na confecção de vacinas. Esta abordagem poderia também, ser utilizada para melhorar o desempenho dos atuais medicamentos que são utilizados no tratamento da LVC e que se mostram ineficazes em promover a cura da infecção. Desta forma torna-se importante a realização de estudo detalhado da expressão de citocinas, na infecção natural por *Leishmania (Leishmania) chagasi* com e sem manifestações clínicas no município de São Luís- MA.

5 METODOLOGIA

5.1 Animais

Cinquenta cães independentes do sexo, raça, idade e modo de vida, foram selecionados aleatoriamente, dos atendimentos do Hospital Veterinário Universitário da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA.

Os cães foram submetidos a exame clínico detalhado e os dados foram anotados em fichas individuais (APÊNDICE). Aqueles cães com infecção por *L. chagasi* comprovada pelo teste rápido (DPP/Biomanguinhos) e confirmada pelo teste sorológico (EIE-LVC/Biomanguinhos) foram divididos em grupos com formas polares da doença: um grupo com vinte animais assintomáticos e outro com vinte animais com sinais bem definidos para LVC e um terceiro composto por 10 animais livres de infecção por *L. chagasi*. Os sinais pesquisados para a classificação clínica dos cães foram: linfadenopatia local ou generalizada, alopecia local ou generalizada, hiperkeratose, onicogribose, dermatite, perda de peso, úlceras na pele e lesões oculares.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual do Maranhão (CEE/UEMA), processo Nº 020/2014 (ANEXO).

5.2 Colheita e preparação de material para análise

5.2.1 Colheita de sangue total

Foram coletados 5 mL de sangue de cada animal, sendo 2 mL utilizando-se de tubos tipo “vacutainer” contendo anticoagulante EDTA, por meio de punção da veia jugular externa para realização do hemograma completo no Laboratório de Patologia Clínica do Curso de Medicina Veterinária da UEMA.

5.2.2 Colheita e processamento de soro sanguíneo

Em seguida os 3 mL da amostra eram armazenados em frascos sem o anticoagulante EDTA utilizando-se tubos tipo “vacutainer”, para realização dos testes bioquímicos e sorológicos, mantidos a temperatura ambiente e posteriormente levados ao Laboratório de Patologia Clínica do Curso de Medicina Veterinária da UEMA, para

serem centrifugados a 1500rpm por 10 min. Após a separação do soro, o mesmo foi dividido em alíquotas de 1 mL em ependorf de 2 mL de capacidade, que foram congeladas a -20°C até a realização dos testes bioquímicos e da dosagem do perfil de IL-10 e IFN- γ realizadas no Cernitas (Laboratório de Diagnóstico Veterinário) e no Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), respectivamente.

5.3 Sorologia para a Leishmaniose – ELISA

O teste de ELISA (EIE-LVC/Biomanguinhos) indireto foi realizado com o objetivo de confirmar os animais positivos e negativos no DPP (Biomanguinhos), juntamente com a sintomatologia clínica dos cães, por serem oriundos de uma área endêmica e com um alto índice de transmissão. Identificando os que apresentavam título de anticorpos para *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Os cães que apresentaram títulos baixos associados à clínica e aos demais índices, foram classificados em animais livres da infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* e utilizados no grupo controle. O ponto de corte considerado para o ensaio foi de 0,375 determinado pela média da densidade óptica dos orifícios do controle negativo multiplicado por dois.

As microplacas de polietileno de 96 poços (EIE-LVC/Biomanguinhos) são previamente sensibilizadas com *Leishmania major*. Foram diluídos em tubos, 5 μ L dos controles e das amostras de soro homogeneizadas, em 500 μ L do diluente (1:100) disponibilizado no kit. Logo em seguida, na placa sensibilizada foram distribuídos 100 μ L dos controles e das amostras já diluídas. A placa foi levada à estufa à 37°C por 30 minutos.

Logo após, o conteúdo da placa foi lavado 6x em seguida, com 200 μ L/orifício, aguardando 30 segundos entre cada lavagem. Foram homogeneizados e distribuídos 100 μ L da diluição do conjugado em cada poço da placa e incubada novamente a 37°C por 30 min. Lavados novamente em solução PBS para então serem distribuídos 100 μ L do substrato em todos os orifícios. Deixado a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, durante 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 50 μ L de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios para bloquear a reação.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro para microplacas de 96 poços utilizando-se filtro para comprimento de onda de 450nm.

5.4 Esfregaços por extensão

O esfregaço por extensão foi realizado da seguinte forma: uma gota de material puncionado de medula óssea foi depositada em lâminas de vidro limpas e desengorduradas e o esfregaço obtido por extensão com outra lâmina. Em seguida, os esfregaços foram corados pelo método panótico rápido.

Brevemente, as lâminas foram submergidas durante 20s, sob discreta agitação, na solução fixadora (Triarilmetano 0,1%). Foram então escorridas e submergidas por 20s sob agitação na solução de corante básico (xantenos 0,1%) e escorridas. Por fim, foram submergidas também por 20s sob agitação na solução de corante ácido (tiazinas 0,1%) e em seguida lavadas em água corrente e secadas à temperatura ambiente, estando prontas para o exame direto ao microscópio ótico sob objetiva de imersão.

5.5 Isolamento em cultura

Parte das amostras, obtidas na punção de medula óssea de todos os animais, foi semeada em duplicata em meio de cultura bifásico NNN (Novy, McNeal e Nicolle) enriquecido com meio MEM (Minimum Essential Medium, Gibco, EUA) e mantidos a $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ em estufa biológica. A cada dez dias, todas as culturas foram examinadas para avaliação da presença de formas promastigotas do parasita e aquelas negativas foram repicadas por até três vezes e examinadas em intervalos de 10 dias.

5.6 Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) anti-citocinas

5.6.1 Quantificação da IL-10

A determinação dos níveis de IL-10 foi realizada através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA), utilizando-se soro sanguíneo canino estimulado com antígeno solúvel vacinal (VSA) e antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA). Foram utilizados anticorpos e proteínas recombinantes R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA. A cada poço de uma placa de 96 poços (COSTAR®, USA) foram adicionados 25µL de anticorpo monoclonal anti-citocina a ser dosada, diluído em PBS estéril. As placas foram cobertas e incubadas durante o período noturno à temperatura ambiente. Anticorpos não adsorvidos pelas placas foram descartados, por inversão e 4 sucessivas

lavagens com 100µL da solução de PBS-Tween 20. A seguir, as placas foram bloqueadas com 75µL/poço de uma solução contendo PBS-BSA 1% e 0,05% de azida sódica (NaN₃), durante uma hora, a temperatura ambiente, e lavadas conforme descrito anteriormente. As amostras do sobrenadante de culturas foram aplicadas em um volume de 25µL em cada poço da placa. Paralelamente, a citocina investigada foi diluída em várias concentrações para estabelecimento de uma curva padrão, sendo que a diluição foi feita em PBS contendo 0,1% de albumina de soro bovino (BSA). As placas foram vagarosamente homogeneizadas por um minuto e, em seguida, foram cobertas e incubadas por uma hora e meia, a temperatura ambiente. Após o período de incubação, as placas foram novamente lavadas com 100µL de PBS-Tween 20. Em seguida, foi adicionado 25µL do anticorpo biotilado diluído apropriadamente em PBS contendo 0,1% de albumina de soro bovino (BSA) e 0,05% de azida (NaN₃), em cada poço da placa. As placas foram mais uma vez mantidas ao abrigo da luz e incubadas, a temperatura ambiente, por uma hora e meia, e, em seguida foram lavadas em PBS-Tween 20. Então, após remoção do sobrenadante, foi adicionado em cada poço 25µL de estreptoavidina (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA., DY998) diluída em PBS contendo 0,1% de albumina de soro bovino (BSA) e 0,05% de azida (NaN₃). As placas foram mantidas ao abrigo da luz e incubadas, a temperatura ambiente, por vinte minutos. Após a incubação, foram novamente lavadas e, em cada poço, foi adicionado 25µL da solução de substrato (mistura 1:1 de H₂O₂ e tetrametilbenzidina). Mais uma vez as placas foram incubadas, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente, por trinta minutos. Em seguida, foi adicionado 25µL por poço da solução de parada (H₂SO₄ 1M). A densidade óptica foi, então, determinada usando leitor automático de microplacas (Biotek, EL800) no comprimento de onda de 450 nm.

5.6.2 Quantificação de IFN- γ

Para determinar os níveis de IFN- γ , foram utilizados os kits DuoSets (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA., DY781) para realização do ensaio ELISA de captura em amostras de soro caninas estimuladas com antígeno vacinal e antígeno de *L. chagasi*. O ensaio foi desenvolvido de acordo com instruções do fabricante dos anticorpos R&D Systems. Foram utilizadas placas de 96 poços (COSTAR, USA), onde foi feita a sensibilização, por toda a noite, com 25µL do anticorpo de captura (Part 842609) diluído em PBS estéril, na concentração de 0,8µg/mL. As placas foram lavadas

4 vezes com 100µL solução de lavagem PBS-Tween 20 e incubadas, em temperatura ambiente, com solução de bloqueio (1% de BSA em PBS) por 1 hora. Foi realizada uma nova etapa de lavagem com 100µL de PBS-Tween 20 e, em seguida foi adicionado 25µL da amostra, sem diluição, em cada poço. Paralelamente, para estabelecimento da curva padrão, foi adicionado 25µL da proteína recombinante (Part 842611) diluída em PBS com 1% de BSA, em diluição seriada, começando com a concentração inicial de 4000 pg/mL. Após 2 horas de incubação, em temperatura ambiente, foi repetido o processo de lavagem com 100µL de solução PBS-Tween 20 e aplicado 25 µL de Streptoavidina-HRP (Part 890803). Após 20 minutos de incubação ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, foi repetido o processo de lavagem com 100µL da solução PBS-Tween 20. Então foi adicionado 25µL da solução substrato, que corresponde a uma mistura 1:1 do reagente de cor A, H₂O₂, e reagente de cor B, tetrametilbenzidina, (R&D Systems, DY999). Após 20 minutos de incubação, em temperatura ambiente, foi adicionado 13µL da solução de parada (R&D Systems, DY994). A determinação da densidade óptica foi feita imediatamente, usando leitor automático de microplacas (Biotek, EL800) no comprimento de onda de 450 nm.

5.7 Análise estatística

A realização dos testes estatísticos foi feito com o apoio instrumental do software GraphPad Prism 3.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA). A normalidade dos dados foi demonstrada pelo teste T de Student. Os testes de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey foram empregados para avaliação entre os grupos relacionados aos resultados do hemograma, dosagens bioquímicas e do perfil de citocinas. Os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de $P < 0,05$.

6 RESULTADOS

Cães independente de raça, sexo e idade, provenientes do atendimento do Hospital Veterinário Universitário da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), passaram por exame clínico detalhado e os sinais clínicos anotados em fichas individuais, os animais foram testados com o kit diagnóstico rápido para leishmaniose (DPP/Biomanguinhos) e pelo teste sorológico (EIE-LVC/Biomanguinhos).

Os animais que apresentaram os testes sorológicos positivos foram submetidos ao teste parasitológico. O encontro de formas amastigotas, no exame direto de esfregaço de medula óssea (MO) ou o encontro de formas promastigotas no exame de cultura de MO, permitiram a confirmação parasitológica da infecção por *L. chagasi*.

De posse dos resultados os animais foram divididos em grupos, sendo 20 cães sintomáticos positivos (CS) para LVC, 20 cães assintomáticos e positivos (CA) para LVC e 10 cães no grupo controle (GC) sabidamente negativos para a enfermidade em questão.

6.1 Pesquisa de IgG pela técnica de ELISA

A pesquisa de IgG pela técnica de ELISA revelou que, todos os animais naturalmente infectados por *L. chagasi*, tanto do grupo dos CS quanto do grupo dos CA, apresentaram valores de absorbância positivos (superiores ao “cut off”= 0,375) e significativamente superiores aos encontrados no grupo controle não infectados $P < 0,05$ (Figura 1).

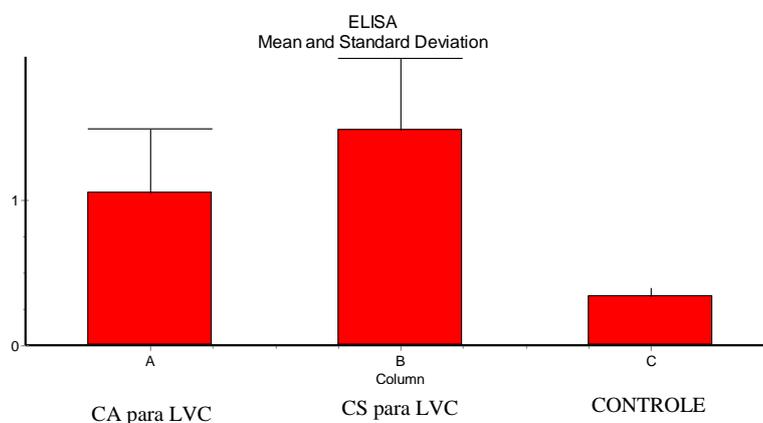


Figura 1. Produção de IgG, médias e desvios-padrão, no soro de cães assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, quantificada por ELISA de captura. O teste de análise de variância não indicou diferença estatística entre os dois grupos de cães estudados ($P < 0,05$).

6.2 Sinais clínicos de leishmaniose visceral encontrados no grupo de cães com expressão clínica

O achado clínico mais frequente foi a linfadenopatia generalizada com 100% dos animais acometidos. Os sinais cutâneos verificados, em maior frequência, foram descamação em 90% dos cães e alopecia local ou generalizada (70%), seguidos por lesões oculares (75%), uveíte (70%), prurido (65%) e pústulas na pele (60%). Metade dos animais sintomáticos apresentou perda de peso, seguido por fraqueza. E a onicogribose acometeu os animais mais debilitados (Tabela 1).

Tabela 1. Sinais clínicos dos cães positivos e com sintomatologia (CS) para Leishmaniose Visceral Canina (LVC) atendidos no Hospital Veterinário da UEMA.

| Sinais Clínicos | N | % |
|-----------------------------|----|-----|
| Linfadenopatia | 20 | 100 |
| Perda de Peso | 11 | 55 |
| Fraqueza | 8 | 40 |
| Alterações gastrintestinais | 3 | 15 |
| Uveíte | 14 | 70 |
| Alopecia | 14 | 70 |
| Descamação | 18 | 90 |
| Hiperqueratose | 9 | 45 |
| Eritema | 11 | 55 |
| Prurido | 13 | 65 |
| Úlceras | 10 | 50 |
| Nódulos | 8 | 40 |
| Pústulas | 12 | 60 |
| Onicogribose | 9 | 45 |
| Lesões oculares | 15 | 75 |

6.3 Hemograma e análises bioquímicas

O estudo hematológico, dos cães dos diferentes grupos experimentais, revelou que, todos os animais livres de infecção por *L. chagasi*, apresentaram hemograma sem alterações. Quase 40% dos cães assintomáticos (CA) apresentaram uma discreta anemia normocítica normocrômica e os demais parâmetros avaliados no hemograma dos animais deste grupo não apresentaram alterações.

No grupo de cães sintomáticos (CS), todos os animais apresentaram anemia normocítica e normocrômica. Quando as médias dos números de hemácias, das concentrações de hemoglobina e dos valores de hematócritos dos três grupos experimentais foram comparadas, constatou-se que as médias destes parâmetros nos cães assintomáticos e sintomáticos foram significativamente inferiores ($P < 0,05$) em relação aos cães do grupo controle (Tabela 2).

Ao ser avaliado o leucograma, verificou-se que dois dos animais sintomáticos apresentaram um quadro de linfocitose e leucocitose, este apresentando diferença significativa entre as médias. Já na contagem de plaquetas, os animais sintomáticos apresentaram trombocitopenia, porém os valores foram estatisticamente diferentes entre os grupos ($P < 0,05$).

Tabela 2. Média dos valores hematológicos dos cães do grupo controle (GC), grupos dos CA e grupo dos CS naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

| Parâmetros | Grupo Controle $\bar{x} + \sigma$ | CA para LVC $\bar{x} + \sigma$ | CS para LVC $\bar{x} + \sigma$ | Referências ¹ |
|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| Eritrócitos(x 10/ μ L) | 7,10 \pm 0,37 ^{a,b,c} | 5,40 \pm 1,45 ^{a,b,c} | 3,97 \pm 1,16 ^{a,b,c} | 5,5-8,5 |
| Hemoglobina(g/dL) | 13,87 \pm 2,57 ^{a,b,c} | 11,05 \pm 2,78 ^{a,b,c} | 8,08 \pm 2,37 ^{a,b,c} | 12,0-18,0 |
| Hematócrito (%) | 46,9 \pm 2,68 ^{a,b,c} | 36,35 \pm 8,23 ^{a,b,c} | 25,35 \pm 7,63 ^{a,b,c} | 37,0-55,0 |
| Leucócitos(x10 ³ μ L) | 10,59 \pm 2,98 ^{a,b,c} | 9,22 \pm 3,47 ^{a,b} | 8,24 \pm 4,78 ^{a,c} | 6,0-17,0 |
| Eosinófilos (%) | 4,7 \pm 3,02 ^{a,b,c} | 10 \pm 7,76 ^{a,b} | 5,25 \pm 3,72 ^{b,c} | 2,0-10,0 |
| Linfócitos(%) | 17,6 \pm 6,95 | 21 \pm 9,99 | 21,7 \pm 13,5 | 12,0-30,0 |
| Plaquetas(mm ³) | 360,4 \pm 159,6 ^{a,b,c} | 228,7 \pm 130,6 ^{a,b} | 152,9 \pm 112,2 ^{a,c} | 200-500 |

¹Valores segundo Garcia-Navarro (2005). As letras a, b e c mostram diferenças significativas ($P < 0,05$) em comparação com os grupos GC, CA e CS, respectivamente.

Quanto às análises bioquímicas para a avaliação das funções hepática e renal não houve diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$). E em relação à albumina

observamos que houve diferença significativa entre o grupo dos animais assintomáticos, sintomáticos e controle ($P < 0,05$).

Com exceção dos valores de ureia dos animais sintomáticos que se apresentaram acima do valor de referência.

Tabela 3. Média dos valores bioquímicos dos cães do grupo controle (GC), grupos dos CA e grupo dos CS naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

| Parâmetros | Grupo Controle $\bar{x} + \sigma$ | CA para LVC $\bar{x} + \sigma$ | CS para LVC $\bar{x} + \sigma$ | Referências* |
|-------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------|
| Creatinina (mg/dL) | 1,24±0,39 | 1,35±0,67 | 1,1±0,73 | 0,5-1,8 |
| Ureia (mg/dL) | 37,4±5,21 | 40,77±20,14 | 49,35±20,33 | 15,0-40,0 |
| Proteínas totais (g/dL) | 7,31±0,70 | 9,11±1,26 | 8,94±1,77 | 6,0-8,0 |
| Albumina (g/dL) | 2,95±0,71 ^{a,c} | 2,53±0,99 ^{b,c} | 1,97±1,04 ^{a,b,c} | 2,6-3,3 |

*Valores segundo Kaneko (1989). As letras a, b e c mostram diferenças significativas ($P < 0,05$) em comparação com os grupos GC, CA e CS, respectivamente.

6.4 Quantificação da IL-10

Foi detectada a presença da citocina IL-10 no soro obtido dos dois grupos estudados (Tab.4 e Fig.2) e, obtivemos diferenças estatísticas significantes ($P < 0,05$).

Tabela 4. Quantificação da IL-10 no soro sanguíneo. Média e desvio-padrão do grupo de cães assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, obtidos no ensaio de ELISA de captura.

| Animais | IL10 $\bar{x} + \sigma$ |
|-------------|----------------------------|
| CA para LVC | 0,616±0,10 ^{a,b} |
| CS para LVC | 0,872± 0,04 ^{a,b} |

As letras a e b mostram diferenças significativas ($p < 0,05$) em comparação com os grupos CA e CS, respectivamente.

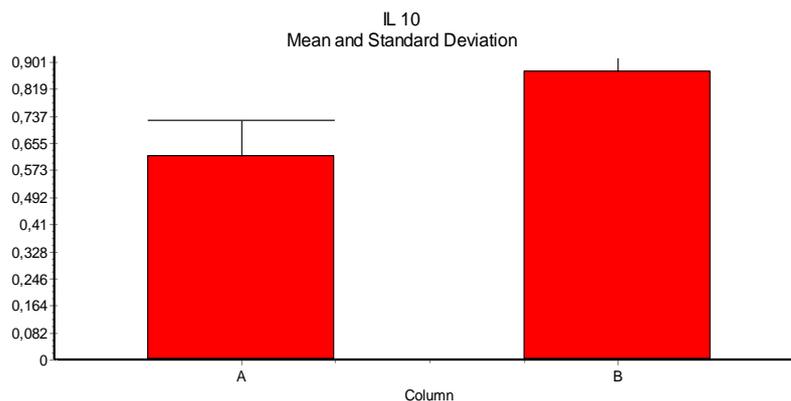


Figura 2. Produção de IL-10, médias e desvios-padrão, no soro de cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, quantificada por ELISA de captura (“cut off”= 0,598). Onde a coluna A é composta pelo grupo de CA e a coluna B pelo grupo de CS. O teste de análise de variância indicou diferença estatística entre os dois grupos de cães estudados ($P < 0,05$).

6.5 Quantificação do IFN- γ

Foi detectada a presença da citocina IFN- γ no soro obtido dos dois grupos estudados (Tab.5 e Fig.3) e, obtivemos diferenças estatísticas significantes ($P < 0,05$).

Tabela 5. Quantificação do IFN- γ no soro sanguíneo. Média e desvio-padrão do grupo de cães assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, obtidos no ensaio de ELISA de captura.

| Animais | IFN- γ $\bar{x} \pm \sigma$ |
|-------------|---------------------------------------|
| CA para LVC | 0,809 \pm 0,04 ^{a,b} |
| CS para LVC | 0,519 \pm 0,06 ^{a,b} |

As letras a e b mostram diferenças significativas ($P < 0,05$) em comparação com os grupos CA e CS, respectivamente.

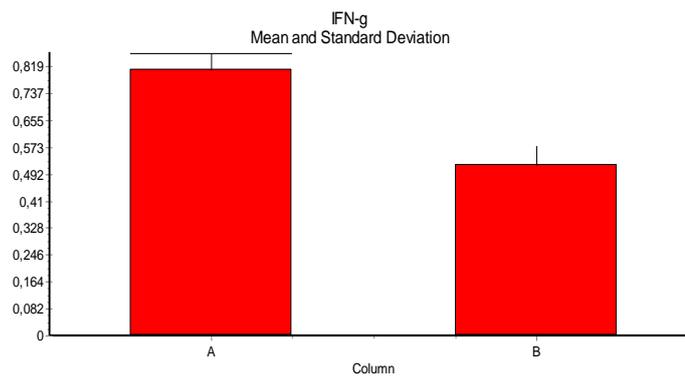


Figura 3. Produção de IFN- γ , médias e desvios-padrão, no soro de cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, quantificada por ELISA de captura (“cut off”= 0,553). Onde a coluna A é composta pelo grupo de CA e a coluna B pelo grupo de CS. O teste de análise de variância indicou diferença estatística entre os dois grupos de cães estudados ($P < 0,05$).

7 DISCUSSÃO

7.1 Sinais Clínicos, hemograma e análises bioquímicas

A leishmaniose visceral é uma doença infecciosa crônica que pode ser caracterizada pelo desenvolvimento de uma infecção sintomática ou assintomática, acompanhada pelo aparecimento de vários sinais habituais para essa enfermidade.

Em nosso estudo o alto percentual dos animais que apresentaram sinais clínicos para LVC, apresentaram linfadenopatia e sinais dermatológicos, de acordo com os achados de Costa-Val et al., (2007); Ribeiro, (2007); Reis et al., (2006^a); Baneth, (2006); Alvar et al., (2004); Amusategui et al., (2003).

Amusategui et al., (2003) encontraram em um estudo realizado com 61 cães naturalmente infectados por *L. infantum*, que o sinal clínico mais frequente foi linfadenopatia generalizada, acometendo 80% dos cães. Em nosso estudo, todos os animais do grupo CS (100%) apresentaram este sinal clínico, sendo o mais prevalente no grupo. De forma semelhante, Ribeiro (2007) encontrou linfadenopatia generalizada em 100% dos 24 cães naturalmente infectados por *L. chagasi* CS, avaliados antes de tratamento específico. Outros autores (COSTA-VAL et al., 2007; ALVAR, 2004; ALVES et al., 2009) também concordam que este sinal clínico seja o mais frequentemente encontrado em cães que manifestam clinicamente a doença.

As anormalidades cutâneas são muito comuns, porém, de extensão e caracterização variáveis nos cães com LVC. Os sinais cutâneos verificados, em maior frequência foram: dermatite esfoliativa com formação de caspas, hipotricose e alopecia não-pruriginosa, dermatites ulcerativas, formação de pústulas e nódulos, hiperkeratose e despigmentação do focinho e região periocular.

Na pele dos cães com LVC, observa-se processo inflamatório com graus variados de intensidade podendo apresentar-se distribuído ao redor dos anexos ou difusamente na derme. Acantose, hiperkeratose com presença ou não de pérolas córneas, parakeratose e degenerações celulares são alterações histopatológicas comumente observadas na leishmaniose visceral canina (SANTOS et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2004; GIUNCHETTI et al., 2006; ALVES et al., 2009).

Todos esses sinais dermatológicos foram encontrados, deixando claro uma ausência de APC's, levando assim a um infiltrado significativo de parasitas e macrófagos. Apenas 9 cães soropositivos se apresentaram com onicogribose,

considerado um sinal patognomônico para leishmaniose visceral por Sciamella et al. (1997), Strauss-Ayali e Baneth (2001) Alves et al. (2009). Marzochi et al. (1985) explicaram que essa alteração é atribuída à baixa atividade dos cães e consequente a falta de desgaste das unhas.

Em nosso estudo 75% dos animais apresentaram lesões oculares como queratoconjuntivite, blefarite, inflamação do trato uveal e edema de córnea, formação de sinéquia, lesões em corpo ciliar e íris podendo estar associado ao depósito de imunocomplexos nestas áreas, fato que pode ocorrer devido a presença de anticorpos específicos anti-*leishmania* em vários tecidos intraoculares, podendo significar lesões de origem imunopatológica (GARCIA-ALONSO et al., 1996; CIARAMELLA et al., 1997; FERRER, 1999; ALVES et al., 2009).

Em nosso experimento quase metade dos cães sintomáticos apresentaram enfraquecimento e perda de peso progressiva decorrentes de transtornos hemorrágicos ou infecções secundárias (HUSS & ETTINGER, 1992). Este quadro se deve, provavelmente, a um desequilíbrio proteico, em virtude da proteinúria associada à deficiência imunológica crônica do animal doente (ALVAR et al., 2004; AMUSATEGUI et al., 2003; ALVES et al., 2009).

Além de alguns desses animais também apresentarem alterações gastrintestinais, sendo observada diarreia crônica e melena, devido às ulcerações na mucosa gástrica intestinal, colite ulcerativa e erosiva também pode estar presente (FERRER, 1999).

Nesse estudo foram encontradas alterações hematológicas compatíveis com animais anêmicos, um dos achados mais comuns de cães acometidos com LVC, 100% dos CS apresentaram anemia normocítica e normocrômica, sendo que, as médias dos números de hemácias, concentração de hemoglobina e valores de hematócrito, deste grupo, foram significativamente inferiores às encontradas nos demais grupos. Estes achados estão de acordo com os dados descritos por Xavier (2002) Alves et al. (2009), que relata uma maior proporção de alterações no hemograma de animais com sinais clínicos da doença, em relação àqueles cães sem expressão clínica da mesma.

A causa da anemia pode estar relacionada com hemorragia, hemólise, inflamação, epistaxe, ulceração na pele, insuficiência renal, doença crônica, e aplasia de medula ou hipoplasia. No entanto, não foi encontrada nenhuma correlação entre anemia e o aparecimento dos sinais clínicos.

No que diz respeito às alterações no leucograma, os parâmetros parecem não ser bons marcadores clínico-patológicos para o acompanhamento da infecção canina, já que

parece não existir associação entre categoria clínica dos cães com LVC e as contagens de leucócitos, indicando que a doença tem pouca influência sobre estes parâmetros (COSTA-VAL et al., 2007; RIBEIRO, 2007; AMUSATEGUI, 2003; ALVES et al., 2009).

Nos animais estudados nesse experimento, apenas dois apresentaram um quadro de leucocitose, seguidos por um quadro de linfocitose. Na LV a linfopenia ocorre devido ao confinamento temporário dos linfócitos no baço e/ou linfonodos enquanto assim, respondem ao agente infeccioso ou pela destruição destas células pela própria *Leishmania* (BUSH, 2004). No entanto, assim como verificado para a contagem global de leucócitos, a maioria dos autores concorda que não exista associação entre os valores diferenciais de leucócitos e a evolução da infecção (COSTA-VAL et al., 2007; RIBEIRO, 2007; AMUSATEGUI, 2003).

Alguns animais também apresentaram eosinofilia, onde a presença de sinais dermatológicos e a ocorrência de outros parasitas podem contribuir para o aumento na produção de eosinófilos. Enquanto que a eosinopenia pode ser em ocorrência da condição de estresse mediado por cortisol, possivelmente estes dois mecanismos ocorrem simultaneamente e em grau variável (JAIN, 1993; ALVES et al., 2009).

A contagem de plaquetas também foi um achado laboratorial bastante encontrado nesse experimento corroborando com os resultados de Ciaramela et al., (1997) e Slappendel (1988). No entanto, outros autores como Costa-Val et al., (2007) e Ribeiro et al., (2007) não encontraram diferenças nas contagens de plaquetas entre os cães assintomáticos e sintomáticos.

A intensa resposta humoral que ocorre logo após a infecção na LVC leva a disproteinemia sérica. O desequilíbrio proteico é evidenciado pelo aumento das proteínas séricas totais, em decorrência da intensa hipergamaglobulinemia. Este quadro é associado à hipoalbuminemia devido a perdas de albumina ocasionadas por nefropatias, lesões hepáticas e subnutrição crônica em decorrência da LVC. Tais alterações levam a inversão da relação albumina/globulina (AMUSATEGUI et al., 2003; NOLI, 1999; SLAPPENDEL, 1988).

Alguns autores relatam a frequente observação de glomerulonefrite associada à LVC como consequência da deposição de imunocomplexos (ALVAR, 2004; FERRER, 1992; ALVES et al., 2009) o que tem grande implicação na sobrevivência dos cães infectados, já que as consequências da afecção renal grave são as principais causas de morte em cães com LVC (NOLI, 1999).

Nesse estudo observamos que 95% dos cães com sintomatologia para leishmaniose apresentaram hipoalbuminemia e alguns cães assintomáticos também apresentaram alterações discretas nesse parâmetro. Estes resultados são indícios de alterações renais apresentadas pelos animais, de acordo com os achados de Amusatogui et al., (2003), Nieto et al., (1992). Podendo ser também indício de alterações hepáticas, porém como os animais de nosso estudo eram animais jovens, não foram observadas diferenças significativas em relação às dosagens hepáticas, corroborando com Costa-Val et al., (2007), Ribeiro et al., (2007).

Nas dosagens das enzimas hepáticas realizadas não apresentaram diferença significativa entre os grupos, corroborando com os achados de (KEENAN et al., 1984 a, b; GENARO, 1993; AMUSATEGUI et al., 2003), isso provavelmente se deve à idade dos animais em nosso grupo de estudo, por serem animais jovens e muitas das vezes, estarem na fase inicial da doença. Porém o aumento dos níveis de ureia em animais sintomáticos, caracterizam que esses animais apresentavam uma alteração renal aguda, corroborando com os achados de Ciaramella e Corona, (2003). Vários estudos têm relatado uma alta produção de anticorpos durante a LVC ativa com elevadas concentrações de imunocomplexos circulantes de IgM e IgA e depósito dos mesmos nos glomérulos, estabelecendo o que se denomina de glomerulonefrite mesangio proliferativa que irá levar a um quadro de disfunção renal (TAFURI et al., 1989; MARGARITO et al., 1998).

Observamos que em relação aos níveis de proteínas totais não houve diferença estatística entre os grupos, porém os níveis estão acima dos valores de referência tanto no grupo dos animais sintomáticos, como principalmente no grupo dos cães assintomáticos, isso se deve provavelmente ao aumento no número de anticorpos, logo após o início da infecção.

7.2 Quantificação da IL-10

A IL-10 inibe a função das células apresentadoras de antígeno, pela diminuição da expressão de moléculas do complexo MHC de classe II e moléculas coestimulatórias, impossibilitando as funções de apresentação de antígenos por células dendríticas e macrófagos.

Além disso, ocorre também inibição da produção de IL-12, o que pode resultar em inibição de uma resposta antígeno-específica do tipo Th1. A IL-10 também pode

inibir a maturação e migração de células dendríticas, além de contribuir para a apoptose de células T e aumento da sobrevivência de células B, que podem ser fonte da geração de mais IL-10.

O aumento da produção de anticorpos característico da LV pode contribuir para a patogênese da doença, causando danos teciduais pela deposição de imunocomplexos, que por sua vez podem estimular monócitos e macrófagos a produzirem mais IL-10 (NYLÉN & SACKS, 2007).

A IL-10 suprimiu a resposta imune protetora em nosso estudo levando à progressão da doença com o aumento da expressão do parasita na célula, corroborando com os achados de Iniesta et al. (2002); Bogdan et al. (1991), Karp et al. (1993), Wilson et al. (1998), Bacellar et al. (2000).

No entanto, em trabalhos realizado por Quinnell et al. (2001), Santos-Gomes et al. (2002), Côrrea (2006), Mana et al. (2006, 2009) e Menezes-Souza (2009) não foi constatado o papel imunossupressor da IL-10 na LVC. Verificou-se maior expressão de IFN- γ nos cães infectados, sendo que, não foi observado aumento da expressão de IL-10 nestes animais, em relação aos animais não infectados.

A alta produção de IL-10 observada, talvez indique que os macrófagos e as células T, dos cães infectados, estejam produzindo IL-10 em resposta ao antígeno de *Leishmania* e tal produção talvez seja importante para que o parasita persista nas células do hospedeiro.

7.3 Quantificação da IFN- γ

O IFN- γ é produzido por células T, dendríticas, macrófagos e células “natural killer” (NK) e tem a função de induzir a síntese de óxido nítrico, ativando funções microbidas possuindo um espectro de ação muito amplo, sendo considerada uma das principais citocinas estimuladoras da imunidade contra infecções, atuando em ambas as respostas imunes, inata e adaptativa. É considerado o principal ativador de macrófagos, estimula a resposta imune por favorecer o crescimento de células Th1 em detrimento das Th2, e estimula a apresentação de antígenos pelo aumento da expressão de moléculas do MHC das classes I e II.

Dessa forma, os resultados provenientes da análise da expressão de IFN- γ , possibilitam especular que a expressão aumentada e simultânea desses mediadores deve estar intimamente envolvida com mecanismos imunoprotetores durante a LVC, visto

que, observou-se aumento dessas citocinas no soro de animais portadores da forma clínica assintomática.

Foi detectada a presença da citocina IFN- γ no soro obtido dos dois grupos estudados e, obtivemos diferenças estatísticas significantes ($P < 0,05$). A incapacidade das células TCD4+ de secretar quantias significantes de citocinas ativadoras de macrófagos, tais como INF- γ , em resposta aos antígenos de *Leishmania* sp., tem importante papel na imunopatologia da enfermidade (MURRAY, 1983; CARVALHO et al., 1985).

Os fatores iniciais que contribuem para a inibição ou proliferação dos parasitas nas células do hospedeiro são pouco compreendidos, mas citocinas tais como IFN- γ são conhecidas por influenciarem na sua replicação nos macrófagos (MURRAY et al., 1995; WILSON et al., 1998; WALKER et al., 1999).

Em nosso estudo a quantificação de IFN- γ no soro de cães assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, podemos observar um aumento significativo dessa expressão de citocina em animais assintomáticos, estimulando a apresentação de antígenos pelo aumento da expressão de moléculas do MHC das classes I e II e desencadeando resposta protetora à infecção, por meio da resposta Th1, corroborando com os achados de Santos-Gomes et al. (2002), Chamizo et al. (2005).

Contrariando os achados de um trabalho desenvolvido por Sanchez-Robert et al. (2008) que foi demonstrado um aumento da expressão de IFN- γ em CMSP nas formas clínicas mais graves da LVC, o que também aponta para o papel imunopatológico dessas citocinas nos processos relacionados a inflamação generalizada e visceral.

8 CONCLUSÕES

Diante do exposto, podemos concluir que:

- Cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* apresentaram alterações laboratoriais como anemia, hiperproteinemia e trombocitopenia. Esses achados são importantes marcadores, associados aos sinais clínicos característicos da doença, para auxiliar no diagnóstico da leishmaniose visceral canina.
- Cães sintomáticos naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* apresentaram um aumento nos valores de ureia e uma hipoalbuminemia em ambos os grupos positivos para a enfermidade.
- A expressão IL-10 dos cães com leishmaniose visceral canina, está associada à progressão da doença e à proliferação do parasita, já que níveis mais elevados foram expressos nos cães sintomáticos.
- O IFN- γ está associado à resistência à infecção já que níveis mais elevados desta citocina foi evidenciado na maioria dos cães assintomáticos em relação aos sintomáticos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K., et al. Cytokines. In: (Ed.). Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: W B Saunders. Cytokines, p.566, 2007.

ABRANCHES, P., SILVA-PEREIRA, M. C., CONCEIÇÃO-SILVA, F. M., SANTOS-GOMES, G. M., JANZ, J. G. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **J. Parasitol.** 77, 557–561, 1991.

ABREU-SILVA, A. L.; LIMA, T. B.; MACEDO, A. A.; MORAES-JÚNIOR, F. J.; DIAS, E. L.; BATISTA, Z. S. Soroprevalência, aspectos clínicos e bioquímicos da infecção por *Leishmania* em cães naturalmente infectados e fauna de flebotomíneos em uma área endêmica na ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 197-203, 2008.

ALVAR, J.C.A.; AVATE, C., MOLINA, R., MORENO, J., NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 57, p. 1-87, 2004.

ALVES, C.F., DE AMORIM, I.F., MOURA E.P., RIBEIRO R.R., MICHALICK M.S., KALAPOTHAKIS, E., et al. Expression of IFN gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 128(4), 349-58, 2009.

AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRIGUEZ, F.; TESOURO, M.A. Distribution and BADARÓ, R.; DUARTE, M. I. S. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: VERONESI, R., FOCACCIA, R. (eds) **Tratado de Infectologia**, 2 ed., chap. 97, São Paulo: Editora Atheneu, 2002.

AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRÓGUEZ F.; TESOURO M. A. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 18, n. 2, p. 147-156, 2003.

BACELLAR, O. et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal Leishmaniasis patients. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 70, p.6734-6740, 2002.

BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniosis. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 329-337, 2006.

BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3a ed. Canada: Saunders Elsever. cap. 73, p. 685-698, 2006.

BARRAL A, BARRAL-NETTO M, YONG EC, BROWNELL CE, TWARDZIK DR, REED SG. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc Natl Acad Sci USA** 90: 3442-3446, 1993.

BELKAID, Y., HOFFMANN, K.F., MENDEZ, S., KAMHAWI, S., UDEY, M.C., WYNN, T.A., ET AL. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania*

major in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **J Exp Méd**, v.194, n.10, p.1497-506, 2001.

BERMAN, J. Visceral leishmaniasis in the New World & Africa. **Indian J Med Res** 123: 289-294, 2006.

BOGDAN, C., VODOVOTZ, Y., NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. **J. Exp. Med.**, New York, v.174, p.1549-1555, 1991.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat Immunol**, v.2, n.10, p. 907-16, 2001.

BORIES, C., E. SCHERMAN; P.N. BORIES. Serum and tissue nitrate levels in murine visceral leishmaniasis correlate with parasite load but not with host protection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 91: 433-436, 1997.

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; HOAREAU, E.; BOEHRINGER, C.; STOLLE, T.; CHABANNE, L.L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v.59, p.21-30, 1997.

BRACHELENTE, C.; MULLER, N.; DOHERR, M.; SATTTLER, U.; WELLE, M. BRUNDA, M. J. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T-helper-2- biased immune response. **Veterinary Pathology**, v. 42, p. 166-175, 2005.

BRANDÃO, A.A.R. Leishmaniose visceral no Maranhão. Relato de Caso. **Revista da Sociedade de Parasitologia e Doenças Tropicais do Maranhão** 20:156-157, 1974.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Leishmaniose visceral grave: normas e condutas** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BUSH, B. M. **Interpretação de Resultados Laboratoriais para Clínicos de Pequenos Animais**. São Paulo. Roca, 2004, 376p

CABRAL, M., O' GRADI J.E., ALEXANDER, J. In: Demonstration of Leishmania Specific Cell Mediated and Humoral Immunity in Assymptomatic Dogs. **Parasite Immunol**, 14: p. 531-539p, 1992.

CARDOSO, L.; SCHALLIG, H. D. F. H.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; CABRAL, A.; ALUNDA, J. M.; RODRIGUEZ, M. Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 117, p. 35-41, 2007.

CARVALHO, E.M. et al. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani* chagasi. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.165, p.535-540, 1992.

CARVALHO, E.M.; BACELLAR, O; BROWNELL, C.; REGIS, T.; COFFMAN, R.L.; REED, S.G. Restoration of INF-g production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, Baltimore, v.152, p.5949-5956, 1994.

CARVALHO, E.M.; BADARÓ, R.; REED, S.G.; JONES, T.C.; JOHNSON, W.D. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.76, p.2066-2069, 1985.

CHAMIZO, C., MORENO, J., ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v.103, p.67-75, 2005.

CIAMARELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R.D.; et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Rec.**, v.22, p.539-543, 1997.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Vet Learn**, v. 25, p. 358-368, 2003.

CÔRREA, A.P.F.L. Avaliação do Fator de Transformação do Crescimento - β 1, Interleucina-10 e Interferon- γ em cães machos, assintomáticos e sintomáticos, naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. 2006. 97f. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia)- Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2006.

COSTA-VAL, A.P.; CAVALCANTI, R.R.; DE FIGUEIREDO GONTIJO N.; MICHALICK, M.S.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; et al. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **Vet J**, v.174, n.3, p.636-43, 2007.

DANESHVAR, H.; MOLAEI, M. M.; AFSHAR, R. M.; KAMIABI, H.; BURCHMORE, R.; HAGAN, P.; PHILLIPS, R. S. Gentamicin-attenuated *Leishmania infantum*: A clinicopathological study in dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 129, p. 28-35, 2009.

DANTAS-TORRES, F. Epidemiologia da leishmaniose visceral no município de Paulista, estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil.2006.356p. **Dissertação** (Mestrado)- Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, 2006.

DAS, G.; VOHRA, H.; RAO, K.; SAHA, B.; MISHRA, G.C. *Leishmania donovani* infection of a susceptible host results in CD4+ T-cell apoptosis and decreased Th1 cytokine production. **Scand. J. Immunol.**, Oxford, v.49, p.307-310, 1999.

DE WAAL MALEFYT, R.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; FIGDOR, C.G.; DE VRIES, J.E. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J. Exp. Med.**, New York, v.174, p.1209-1220, 1991b.

DE WAAL MALEFYT, R.; HAANEN, J.; SPITS, H.; RONCAROLO, M.G.; TE VELDE, A.; FIGDOR, C.; JOHNSON, K.; KASTELEIN, R.; YSSEL, H.; DE VRIES, J.E. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. **J. Exp. Med.**, New York, v.174, p.915-924, 1991.

DEANE, L. M., DEANE, M. P. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral. **O Hospital** 45: 419-421, 1954.

DEPLAZES P., SMITH N. C., ARNOLD P., LUTZ, H., ECKERT, J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite Immunol**, v.17, n.9, Sep, p.451-8. 1995.

EVANS, T.G.; THAI, L.; GRANGER, D.L.; HIBBS, J.B. Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. **J. Immunol.**, Baltimore, v.151, p.907-915, 1993.

FERRER, L.M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. From canine leishmaniasis update (Ed. R. Killick-Kendrick). **Proceedings of a canine leishmaniasis forum**, Barcelona, 28-31 January, pp 6-10, 1999.

FIorentino, D.F., BOND, M.W., MOSMANN, T.R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J. Exp. Med.**, New York, v.170, p.2081-2095, 1989.

FIorentino D. F., ZLOTNIK A., VIEIRA P., MOSMANN T. R., HOWARD M., MOORE K. W., O'GARRA A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **J. Immunol.** 146, 3444–3451, 1991.

FREITAS, J.C.C. Subsídios para o estudo da Leishmaniose Visceral Canina na cidade de Fortaleza, Ceará. 2011. 153f. **Tese** (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará, 2011.

GARCIA-ALONSO, M.; BLANCO, A.; RINA, D. et al. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v.18, p.617-623, 1996.

GAMA, M.E.A.; COSTA, I.M.L.; PEREIRA, J.C.R.; GOMES, C.M.C. Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. **Braz J Med and Biol Res**, v.37, p.129-136, 2004.

GASIM, S.; EL-HASSAN, A.M.; KHALIL, E.A.; ISMAIL, A.; KADARU, A.M.; KHARAZMI, A.; THEANDER, T.G. High levels of plasma IL-10 and expression of IL-10 by keratinocytes during visceral leishmaniasis predict subsequent development of post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v.112, p.547, 1998.

GENARO, O. Leishmaniose visceral canina experimental. Belo Horizonte. 1993. 202p. **Tese** – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

GHALIB, H.W.; PIUVEZAM, M.R.; SKEIKY, Y.A.; SIDDIG, M.; HASHIM, F.A.; EL-HASSAM, A.M.; RUSSO, D.M.; REED, S.G. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.92, p.324-329, 1993.

GHALIB, H.W.; WHITTLE, J.A.; KUBIN, M.; HASHIM, F.A.; EL-HASSAN, A.M.; GRABSTEIN, K.H.; TRINCHIERI, G.; REED, S.G. IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. **J. Immunol.**, Baltimore, v.154, p.4623-4629, 1995.

GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CARNEIRO, C. M.; CORRÊAOLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; MARQUES, M. J.; TAFURI, W. L.; REIS, A. B. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, p. 100-107, 2006.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**,7(3), p 338-348, 2004.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 37, 615 – 623, 2004.

GRAU, G.E.; PIQUET, P.F.; VASSALLI, P.; LAMBERT, P.H. Tumor necrosis factor and other cytokines in cerebral malaria: experimental and clinical data. **Immunol. Rev.**, Copenhagen, v.112, p.49-70, 1989.

GUSHI, L. T. Estrutura Populacional de *Lutzomyia longipalpis* através da amplificação e sequenciamento do segmento ribossomal 12S de DNA mitocondrial. **Dissertação** (Mestrado), UNESP - Botucatu, SP, 2008.

HANDMAN, E.; D.V.R. Bullen. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends Parasitol.** 18, N.8. 417, 2002.

HOLADAY, B.J. Immunotherapy for visceral leishmaniasis: ability of factors produced during anti-leishmania responses of skin test positive adults to inhibit peripheral blood mononuclear cell activities associated with visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, p.55-66, 1999.

HOLADAY, B.J. Role of CD8+ T cells in endogenous interleukin-10 secretion associated with visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.95, p.217-220, 2000.

HOLZMULLER P, CAVALEYRA M, MOREAUX J, KOVACIC R, VINCENDEAU P, PAPIEROK G, LEMESRE JL. Lymphocytes of dogs immunized with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN-gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. **Vet Immunol Immunopathol** 106: 247-257, 2005.

HOWARD, M., O'GARRA, A. Biological properties of interleukin 10. **Immunol Today**, Amsterdam, v.13, p.198-200, 1992.

HUSS, B.T., ETTINGER, S.J. Visceral Leishmaniasis, Rocky Mountain spotted fever, and von Willebrand's disease in a Giant Schnauzer. **Journal of the American Animal Hospital Association** v. 28. n. 3, p. 221-225, May/June 1992.

IKEDA, F.A; CIARLINI, P. C; FEITOSA, M. M; GONÇALVES, M. E; LUVIZOTTO, M. C. R; LIMA, V. M. F. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba-SP: um estudo retrospectivo de 191 casos. **Clínica Veterinária** n. 47, p. 42-48, 2003.

INIESTA, V. et al. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. **Parasite Immunol.**, Oxford, v.24, p.113-118, 2002.

INIESTA, L., M. GÁLLEGO, PORTÚS, M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. **Vet Immunol Immunopathol**, v.103, n.1-2, Jan 10, p.77-81. 2005.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in Leishmaniasis. **The Journal of Immunology** 2001; 166: 1141-1147.

KARP, C.L.; EL-SAFI, S.H.; WYNN, T.A.; SATTI, M.M.; KORDOFANI, A.M.; HASHIM, F.A.; HAG-ALI, M.; NEVA, F.A.; NUTMAN, T.B.; SACKS, D.L. *In vivo* cytokine profiles in patients with kala-zar: marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.91, p.1644- 1648, 1993.

KEMP, K.; KEMP, M.; KHARAZMI, A.; ISMAIL, A.; KURTZHALS, J.A.L.; HVIID, L; THEANDER, T.G. Leishmania-specific T cells expressing interferon-gamma (IFN-gamma) and IL-10 upon activation are expanded in individuals cured of visceral leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v.116, p.500-504, 1999.

KAYE PM, CURRY AJ, BLACKWELL JM. Differential production of Th1- and Th2-derived cytokines does not determine the genetically controlled or vaccine-induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. **J Immunol**. 1991 Apr 15; 146 (8):2763–2770.

KOUTINAS, A. F.; POLIZOPOULOU, Z. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989 – 1996). **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 35, p. 376-383, 1999.

KUHN, R. et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, Cambridge, v.75, p.263-274, 1993.

LACERDA, M. M. The Brazilian leishmaniasis control program. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 89:489-495, 1994.

LAGE R.S., OLIVEIRA G.C., BUSEK S.U., GUERRA L.L., GIUNCHETTI R.C., CORRÊA-OLIVEIRA R., et al. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 115, 135–145, 2007.

LAINSON R.; SHAW JJ. Evolution, classification and geographical distribution In *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. 1 W Peters, R Killick-Kendrick (eds), **Academic Press**, London, p. 1-120, 1987.

LAINSON, R, SHAW, J. J., SILVEIRA, F. T., BRAGA, R. R. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Transactions of the R Soc Trop Med Hyg.** 81: 517, 1987.

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 100:811-827, 2005.

LEANDRO, C.; SANTOS-GOMES, G.M.; CAMPINO, L.; ROMÃO, P.; CORTES, S.; ROLÃO, N.; GOMES-PEREIRA, S.; RIÇA CAPELA, M.J.; et al. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v.79, n.3-4, p.273- 284, 2001.

LIEW FY, MILLOTT S, LI Y, LELCHUK R, CHAN WL, ZILTENER H. Macrophage activation by interferon-g from host-protective T cells is inhibited by interleukin (IL) 3 and IL-4 produced by disease-promoting T cells in leishmaniasis. **Eur J Immunol** 19: 1227-1232, 1989.

LIEW, F. Macrophage killing of *Leishmania* parasites in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **J. Immunol.**, [S. l.], v. 144, p. 4794-4797, 1990.

LIMA, V.M.F.; PEIRO, J.R.; VASCONCELOS, R.O. IL-6 e TNF- α production during active canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v.115, p.189-193, 2007.

LONGSTAFEE, J. A. et al. Leishmaniasis in Imported Dogs in the United Kingdom: a Potential Human Health Hazard. **Journal of Small Animal Practice.** v. 24. p. 23-30, 1983.

LUTZ, A. & NEIVA, A. – Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Mem. Inst. O. Cruz**, 4:84-95, 1912.

LUVIZOTTO, M.C.R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. In: 10 FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal. **Anais do Fórum de Leishmaniose Visceral canina** 2006. p.15-22.

MANNA, L.; REALE, S.; VIOLA, E.; VITALE, F.; MANZILLO, V.F.; MICHELE, P.L.; CARACAPPA, S.; GRAVINO, A.E. *Leishmania* DNA load and cytokines expression. levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Vet Parasitol**, v.142, p.271-280, 2006.

MANNA, L. et al. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Research in Veterinary Science**, n.1, p. 76-78. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19178919>>. Acesso em: 28 mar 2015. doi:10.1016/j.rvsc.2008.12.009, 2009.

MARGARITO, J. M.; LUCENA, R.; LOPEZ, R.; MOLLEDA, J.M.; MARTIN, E.; GINEL, P.J. Levels of IgM and IgA circulating immune complexes in dogs with leishmaniasis. **Zent. Vet.**, v. 45 , p. 263–267, 1998.

MARQUES, M.I.L.M. Leishmaniose canina. 2008. 131p. **Dissertação** (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2008.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.S. et al. Canine Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.80, p.349-357, 1985.

MAZZA DS, GRIECO MH, REDDY MM, MERINEY D. Serum IgE in patients with human immunodeficiency virus infection. **Ann Allergy Asthma Immunol** 74: 411-414, 1995.

MELBY, P. C. et al. *Leishmania donovani*: Evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. **Experimental Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 17-25, 2001. PMID:11708830. <http://dx.doi.org/10.1006/expr.2001.4640>

MENEZES-SOUZA, D. Envolvimento de citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição na imunopatologia da pele de cães naturalmente infectados por *Leishmania* (Leishmania) chagasi, portadores de diferentes formas clínicas e densidades parasitárias cutâneas. 2009. 189f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências)- Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2009.

MENDES, W. S. et al. Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luis, Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 3, p. 227-231, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037-86822002000300005&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 29 Jun. 2015. doi: 10.1590/S0037-86822002000300005.

MOORE, K.W.; VIEIRA, P.; FIORENTINO, D.F.; TROUNSTINE, M.L.; KHAN, T.A.; MOSMANN, T.R. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. **Science**, Washington, v.248, p.1230-1234, 1990.

MOSMANN, T. R., H. CHERWINSKI, BOND, M.W., GIEDLIN, M. A., COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol**, v.136, n.7, Apr 1, p.2348-57. 1986.

MOSMANN, T.R., COFFMAN, R.L. Two types of mouse helper T cell: implications for immune regulation. **Immunol. Today**, Amsterdam, v.8, p.223, 1987.

MOSSER, D.L., KARP, C.L. Receptor mediated subversion of macrophage cytokine production by intracellular pathogens. **Curr. Opin. Immunol.**, Philadelphia, v.11, p.406- 411, 1999.

MURRAY, H.W., RUBIN, B.Y., ROTHERMEL, C.D. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.72, p.1506-1510, 1983.

MURRAY, H.W. et al. Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. Differential T cell and lymphokine roles in initial versus established immunity. **J. Immunol., Baltimore**, v.148, p.1858-1863, 1992.

MURRAY, H.W.; HARIPRASHAD, J.; AGUERO, B.; ARAKAWA, T.; YEGANEHI, H. Antimicrobial response of a T cell deficient host to cytokine therapy: effect of interferon-g in experimental visceral leishmaniasis in nude mice. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.171, p.1309-1316, 1995.

MURRAY, H.W. et al. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL- 10 receptor blockade as immunotherapy. **Infect Immun** 70(11): 6284-6293, 2002.

NASCIMENTO, M. D. S. B.; COSTA, J. M. L.; FIORI, B. I. P. & VIANA, G. M. C. Aspectos epidemiológicos determinantes na manutenção da leishmaniose visceral no Estado do Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 29:233-240, 1996.

NICOLLE, C.; COMTE, M. Recherches sur kala-azar enterprises a l'Institut Pasteur de Tunis, IV. Origine canine du kala-azar. **Arch Inst Pasteur Tunis**, 3: 59-62, 1908.

NIETO, C.G.; NAVARRETE, I.; HABELA, M.A.; SERRANO, F.; REDONDO, E. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. **Vet Parasitol**, v.45, n.1-2, p.33-47, 1992.

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

NOLI, C. Canine leishmaniasis. **Waltham Focus**, n.2, p.16-24, 1999.

NYLEN S & SACKS D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends Immunol** 28: 378-384, 2007.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf. Acesso em: 16 de julho de 2014.

PALUDO, G. R, AQUINO, L. C. LOPES, B. C. C., et al. Laboratory Findings in Canine Visceral Leishmaniasis In Brasília, Brazil. *Vet. Clin. Pathol.*, v. 36, p. 382-398, 2007.

PARAENSE, W. L. Evandro Chagas e as grandes endemias. In: **Anais do XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia**, editorial, Porto Alegre, Nov, 2005.

PARANHOS, M.; DOS SANTOS, W.C.; SHERLOCK, L.; OLIVEIRA, G.G.; DE CARVALHO, L.C. Development of eosinophilia in dogs intradermally inoculated with sand fly saliva and *Leishmania (Leishmania) chagasi* stationary-phase promastigotes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.88, p.249-251, 1993.

PINELLI, E., KILLICK-KENDRICK, R., WAGENAAR, J., BERNADINA, W., DEL REAL, G., RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun.** 62, 229–235, 1994.

PINELLI, E., S. Y. VAN DER KAAIJ, R. SLAPPENDEL, C. FRAGIO, E.J. RUITENBERG, W. BERNADINA., et al. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Vet Immunol Immunopathol**, v.69, n.2-4, Aug 2, p.121-6. 1999.

QUINNELL R.J., COURTENAY O. SHAW M.A., DAY M.J., GARCEZ L.M., DYE C., KAYE P.M. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.** 183, 1421– 1424, 2001.

QUINNELL RJ, COURTENAY O, GARCEZ LM, KAYE PM, SHAW MA, DYE C, et al. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol** 2003; 91(3-4): 161-168. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00311-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00311-2). PMID:12586479.

RALPH, P.; NAKOINZ, I.; SAMPSON-JOHANNES, A.; FONG, S.; LOWE, D.; MIN, H.Y.; LIN, L. IL-10, T lymphocyte inhibitor of human blood cell production of IL-1 and tumor necrosis factor. **J. Immunol.**, Baltimore, v.148, p.808-814, 1992.

REINER, N.E. et al. Kinetics of gamma interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in *Leishmania*-infected macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Washington, v.85, p.4330-4334, 1988.

REINER, S. L. E R. M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Annu Rev Immunol**, v.13, p.151-77. 1995.

REIS, A. B., MARTINS-FILHO, O. A., TEIXEIRA-CARVALHO, A., CARVALHO, M. G., MAYRINK, W., FRANCA- SILVA, J. C., GIUNCHETTI R.C et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Res. Vet. Sci.** 81, 68–75, 2006a.

REIS, A. B., MARTINS-FILHO, O. A., TEIXEIRA-CARVALHO, A., GIUNCHETTI, R. C., CARNEIRO, C. M., MAYRINK, W., et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 128, 87-95, 2009.

REIS, A. B., TEIXEIRA-CARVALHO, A., GIUNCHETTI, R.C., GUERRA, L. L., CARVALHO, M. G., MAYRINK, W., et al., 2006c. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clin. Exp. Immunol.** 146, 303–311.

REIS, A. B., TEIXEIRA-CARVALHO, A., VALE, A. M., MARQUES, M. J., GIUNCHETTI, R. C., MAYRINK, , et al. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 112, 102–116, 2006b.

REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C.; CARRILLO, E.; MARTINS-FILHO, O. A.; MORENO, J. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 26, p. 341-349, 2010.

RESENDE, A.L. Perfil de Citocinas, Linfócitos T e Níveis de Óxido Nítrico em Cães Imunizados com as Vacinas LBSap e LBSapSal e Submetidos ao Desafio Experimental com *Leishmania (Leishmania) chagasi* e Saliva de *Lutzomyia longipalpis*. 2011.112f. **Dissertação** (Mestrado em biotecnologia)- Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

RIBEIRO, V. M. Leishmaniose visceral canina: aspectos de tratamento e controle. **Clínica Veterinária**, v. 71, p. 66-76, 2007.

ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. Imunidade aos protozoários e vermes. In:_. 4.ed. **Imunologia**. São Paulo: Manole, 1997. p.18.1-18.19.

ROSA, M. E. A. Aspectos epidemiológicos, clínicos, imunológicos e terapêuticos da leishmaniose disseminada produzida por *Leishmania braziliensis*, 2012. 75f. **Tese** (Doutorado em Ciências da Saúde)- Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

SANCHEZ, M. A., DIAZ, N. L., ZERPA, O., NEGRON, E., CONVIT, J., TAPIA, F.J. Organspecific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 70, 618–624, 2004.

SANCHEZ-ROBERT, E., ALTET, L., ALBEROLA, J., RODRIGUEZ-CORTÉS, A., OJEDA, A., LÓPEZ-FUERTES, L., et al. Longitudinal analysis of cytokine gene expression and parasite load in PBMC in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 15, 168–175, 2008.

SANTOS-GOMES, G.M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMÃO, P.; SILVEIRA, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v.88, p.21-30, 2002.

SANTOS-GOMES, G.M., O.R. RODRIGUES, AND C. MARQUES. Resposta imunitária. In: Leishmaniose canina. Santos-Gomes, G.M., and I.P. Fonseca (eds.). Merial e Chaves Ferreira publicações. Lisboa. Capítulo V, 69-82, 2008.

SARNO, E.N.; GRAU, G. E.; VIEIRA, L.M.; NERY, J. A. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v.84, p.103-108, 1991.

SCIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R. et al. retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Rec.**, v.141, p.539-543, 1997.

SLAPPENDEL, R.J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and cat. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 1998. Cap.73, p.450-458.

SILVA, A.R; TAUIL, P.L; CAVALCANTE, M.N.S; MEDEIROS, M.N; PIRES, B.N; GONÇALVES, E.G.R. Situação epidemiológica da leishmaniose visceral, na Ilha de São Luís, Estado do Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 41(4):358-364, jul-ago, 2008.

SILVA, J. S. et al. IL-10 and INF-g regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med.**, New York, v.175, p.169-174, 1992.

SILVA, A. R.; VIANA, G.M.C.; PIRES, C.V.B.; NASCIMENTO, M.DS.D.; COSTA, J.M.L. Leishmaniose visceral (calazar) na ilha de São Luís, Maranhão, Brasil: evolução e perspectivas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 30(5):359-368, set-out, 1997.

SILVA, L.A. Aspectos da leishmaniose visceral canina: epidemiologia, sorologia e novas perspectivas de tratamento. 2011.116f. **Tese** (Doutorado em patologia)-Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

STEIN, M., GORDON, S. Regulation of tumor necrosis factor (TNF) release by murine peritoneal macrophages: role of cell stimulation and specific phagocytic plasma membrane receptors. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, v.21, p.431-437, 1991.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G. Canine visceral Leishmaniasis. In: CHARMICHAEL, L. Recent advances in canine infectious diseases. Ithaca: Int. **Vet. Inf. Serv.** p.1-14, 2001.

STRAUSS-AYALI D; BANETH G., SHOR S., OKANO F., JAFFE C.L. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. **Int. J. Parasitol.** 35, 63–73, 2005.

SOLANO-GALLEGO, L.; RIERA, C.; ROURA, X.; INIESTA, L.; GALLEGU, M.; VALLADARES, J. E.; FISA, R.; CASTILLEJO, S.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; ARBOIX, M.; PORTUS, M. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses and healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. **Veterinary Parasitology**, v. 96, 265-276, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNANDEZ-BELLON, H.; MORELL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum* -infected dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, p. 7-12, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 1-18, 2009.

STRAUSS-AYALI, D. et al. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. **Int. J. Parasitol.**, Oxford, v.35, p.63-73, 2005.

TAFURI, W.L.; MICHALICK, M.S.; DIAS, M.; GENARO, O.; LEITE, V.R.; BARBOSA, A.J.A.; BAMBIRRA, E.A.; COSTA, C.A.; MELO, M.N.; MAYRINK, W. (1989). Optical and electron microscopic study of the kidney of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 31, p.139-145.

TRICHIERI, G.; RENGARAJU, M.; D'ANDRÉA, A.; VALIANTE, N.M.; KUBIN, M.; ASTE, M.; CHEHIMI, J. Producer cells of interleukin-12. **Immunol. Today**, Amsterdam, v.14, p.237-238, 1993.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol**, v.3, n.2, p.133-46, 2003.

TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. **Nature Reviews of Immunology**, v. 7, p. 179-190, 2007.

WALKER, P.S. et al. Immunoestimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12 and IFN- γ dependent mechanisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.96, p.6970-6975, 1999.

WILSON, M.E. et al. Local suppression of IFN-g in hepatic granulomas correlates with tissue-specific replication of *Leishmania chagasi*. **J. Immunol.**, Baltimore, v.156, p.2231- 2239, 1996.

WILSON, M.E.; YOUNG, B.M.; DAVIDSON, B.L.; MENTE, K.A.; MCGOWAN, S.E. The importance of transforming growth factor b in murine visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, Baltimore, v.161, p.6148 –6155, 1998.

WHO 2010. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases:First WHO report on neglected tropical diseases. In WHO. Geneva, p. 184.

World Health Organization - WHO (2007). Leishmaniasis. Site: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/index.html>. Acesso em 06/04/2014.

World Health Organization - WHO (2011). Leishmaniasis. Site: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/index.html>. Acesso em 06/04/2014.

World Health Organization - WHO (2014). Leishmaniasis. Site: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/index.html>. Acesso em 06/04/2014

XAVIER, S, C. Aspectos clínicos, histopatológicos e parasitológicos da pele de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. 2002. 46p. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

10 APÊNDICE

Nome do Animal: _____ Nº do animal: _____

Data: ___/___/___

Proprietário: _____

Tel: _____

End.: _____

| | P | A |
|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1. Linfadenopatia: | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 1.1 Generalizada | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 1.2 Localizada | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 1.2.1 Linf. Submandibular | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 1.2.2 Linf. Pré-escapular | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 1.2.3 Linf. Poplíteo | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. Sinais Viscerais | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2.1 Perda de peso | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2.2 Fraqueza | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2.3 Alterações Gastrointestinais | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2.4 Uveítes | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. Sinais Cutâneo | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3.1 Alopecia | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3.2 Descamação | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3.3 Hiperkeratose | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3.4 Eritema | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3.5 Prurido | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3.6 Úlceras | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3.7 Nódulos | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3.8 Pústulas | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3.9 Onicogribose | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3.10 Lesões oculares | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 4. SEM SINAIS CLÍNICOS | | <input type="checkbox"/> |

11 ANEXO

Parecer da Comissão de Ética e Experimentação Animal



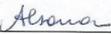
UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO

Centro de Ciências Agrárias
Curso de Medicina Veterinária
Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEA)
Credenciamento Provisório - CONCEA/MCT
Processo 01200.002200/2015-06 (449) - Emissão 19/06/2015

DECLARAÇÃO

Declaramos para devidos fins que o projeto intitulado “**Perfil clínico e imunológico de cães naturalmente infectados com leishmania (Leishmania) Chagasi em São Luís - MA**” foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal -CEEA do Curso de Medicina Veterinária da Uema, conforme protocolo nº 020/2014 aprovado em 24/11/2015, para a execução da pesquisa pela equipe coordenada pela Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo (UEMA) e o membro Carla Janaina Rebouças Marques por atender as normas de Bem Estar Animal da Resolução do CFMV nº 1000/2012 e a Lei 11.794/2008.

São Luís, 27 de novembro de 2015



Profª. Dra. Alana Lislea de Sousa
Presidente do CEEA/CMV/UEMA