



Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas – NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas



Avaliação de parâmetros parasitológicos e imunológicos no baço, fígado e em células derivadas de leucócitos circulantes, em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, assintomáticos ou sintomáticos.

João Filipe Pereira Vieira

Ouro Preto – MG
Outubro de 2018

JOÃO FILIPE PEREIRA VIEIRA

Avaliação de parâmetros parasitológicos e imunológicos no baço, fígado e em células derivadas de leucócitos circulantes, em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, assintomáticos ou sintomáticos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas como exigência parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Ouro Preto na área de concentração de Imunobiologia de Protozoários.

Orientador: Prof. Alexandre Barbosa Reis
Co-Orientadora: Prof^ª. Cláudia Martins Carneiro
Co-Orientador: Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares

Ouro Preto – MG

Outubro de 2018

V673a Vieira, João Filipe Pereira.
Avaliação de parâmetros parasitológicos e imunológicos no baço, fígado e em células derivadas de leucócitos circulantes, em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, assintomáticos ou sintomáticos [manuscrito] / João Filipe Pereira Vieira. - 2018.
149f.: il.: color; grafs; tabs; Quadros; Figuras.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. Óxido nítrico. 2. Macrófagos. 3. Leishmaniose visceral . 4. *Leishmania* . I. Reis, Alexandre Barbosa . II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 616.993.161



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS



ATA DE DEFESA DE TESE

Aos 08 dias do mês de outubro do ano de 2018, às 09:30 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de tese do doutorando João Filipe Pereira Vieira, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Alexandre Barbosa Reis (Presidente - UFOP), pela Profa. Andrea Teixeira de Carvalho (Membro - Externo), pela Profa. Helida Monteiro de Andrade (Membro - Externo), pela Profa. Marta de Lana (Membro - UFOP), pelo Prof. William de Castro Borges (Membro - UFOP). Dando início aos trabalhos, o presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de tese, concedeu ao doutorando João Filipe Pereira Vieira 30 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Avaliação de Parâmetros Parasitológicos e Imunológicos no Baço, Fígado e em Células Derivadas de Leucócitos Circulantes, em Cães Naturalmente Infectados Por Leishmania Infantum, Assintomáticos Ou Sintomáticos", na área de concentração: Imunobiologia de Protozoários. Terminada a exposição, o presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo para perguntas e respostas ao candidato sobre o conteúdo da tese. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, o presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que o doutorando foi aprovado por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da tese deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pelo doutorando. Ouro Preto, 08 de outubro de 2018.

Presidente: Alexandre Barbosa Reis

Membro: Andrea Teixeira de Carvalho

Membro: William de Castro Borges

Membro: Marta de Lana

Membro: Helida M. de Andrade

Doutorando: João Filipe Pereira Vieira

Dr. Levi Eduardo Soares Reis ^I

Dra. Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso ^I

Dr. Rory Cristiane Fortes de Brito ^I

Dr. Fernando Augusto Siqueira Mathias ^I

Msc. Livia Mendes Carvalho ^I

Thais Lopes Valentim Di Paschoale Ostolin ^I

I - Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil.

Suporte Financeiro:

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – APQ-01358-12, APQ– 01008-14

CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa - Chamada Universal – Projeto 476951/2013-5. INCT-DT – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais.

Apoio: Universidade Federal de Ouro Preto/UFOP

DEDICO ESTE TRABALHO AOS MEUS PAIS, JOÃO E TERESA: PELO AMOR INCONDICIONAL, PELO SUPORTE CONSTANTE E PELOS VALORES QUE ME PASSARAM.

Aos meus pais, Teresa e João, por todo o apoio que me deram em cada momento desta aventura. Sem a vossa compreensão, suporte e carinho incondicionais eu não teria tido a coragem de dar este passo meio louco, que mudou a minha vida para sempre. Vocês são a minha bússola moral e sei que seguindo o vosso exemplo eu sempre encontrarei um caminho. Amo-vos muito!

Aos meus irmãos, Paula e Pedro, por terem que ter passar pelo sofrimento atroz de viverem sem a minha presença constante durante estes anos. Imagino que deve ter sido difícil, não ter este chato que vos escreve, a azucrinar o juízo diariamente. Vocês são os melhores irmãos do mundo. Tenho muito orgulho em vocês e amo-vos muito!

À minha noiva, Rafaela, por ser a minha âncora, o meu abrigo e o meu ombro para chorar tão longe de casa. Por partilhar comigo todos os momentos bons e por estar sempre lá para me ajudar a levantar nos momentos maus. Por entender e até rir, de vez em quando, do meu humor esquisito. Por ser tudo que eu sempre quis numa companheira de vida e muito, muito, muito mais. Te amo mais que tudo no Universo.

Aos meus avós, Conceição, Alexandre e Teresa, que são o melhor exemplo de como ultrapassar as dificuldades da vida e sair do outro lado com uma energia e um sorriso invejável. Pelo suporte que me deram em todos os momentos da vida e por terem contribuído tanto para fazerem de mim o que sou hoje. Amo-vos muito!

Ao meu falecido avô João, por ter sido tão presente na minha vida. Pelos jogos do Braga, pelas partidas de dominó e por todas as vezes que me ensinou a distinguir o certo, do errado. Muito obrigado!

A todos os meus familiares: padrinhos, tios e primos. por estarem sempre ao meu lado, por todo o apoio e por entenderem a minha ausência durante estes anos. Muito obrigado!

À família da Rafaela. Flávia, Rafael, Júlia, Estevão e todos os outros, por todo o apoio dado ao longo destes anos e por terem se tornado uma segunda família para mim. Sou muito grato por ter vocês na minha vida!

Ao meu orientador Alexandre, por ter respondido meu e-mail quase 5 anos atrás e ter acreditado que eu poderia virar pesquisador. Agradeço imenso pelas suas palavras de incentivo, pelos elogios, pelos “puxões de orelha” sempre que necessário e pelo papel fundamental em todo meu crescimento científico. Muito obrigado por tudo!

Ao meu amigo, co-orientador e técnico da plataforma de citometria de fluxo, Rodrigo Dian. Desde o início você acompanhou esta caminhada e se eu cresci, ultrapassei as dificuldades e

acabei produzindo este trabalho, isso se deve em grande parte aos seus ensinamentos, às nossas conversas sobre ciência, às suas sugestões e palavras de incentivo. Você é um exemplo de sensatez, tranquilidade e profissionalismo. Muito obrigado!

À professora Cláudia, pelas suas críticas sempre construtivas e por sempre ter uma solução em mãos para qualquer problema que surja. A sua ética e abnegação pelo trabalho são um exemplo que procurarei seguir por toda a vida e estou certo de que me ajudarão a ser uma melhor pessoa e profissional.

Aos meus colegas de trabalho, que viraram grandes amigos, Jamille, Rory, Fernando, Levi e Lívia. Por serem essas pessoas incríveis. Por tudo que compartilhamos juntos seja no canil, no laboratório, ou à mesa de um bar. Por todas as vezes que rimos juntos e por todas as vezes que nos xingamos, só porque de vez em quando é preciso descarregar frustrações. Vocês se tornaram em poucos anos, das pessoas mais importantes na minha vida. E por isso, muito obrigado!

À Emília por todas as conversas, por todas as cervejas e por todas as zuêras. Muito obrigado!

A todos os outros membros ou ex-membros do laboratório de imunopatologia, Luísa, Bruno, Paula, Kátia, Carlos, Gleise, Nádia, Sidney, Ana Flávia, Fran e Miriã, por terem me transmitido tanto conhecimento, por todas as conversas e por todas as vezes que rimos juntos.

A todos os alunos de iniciação científica do Laboratório de Imunopatologia por toda a ajuda no canil e na bancada. A vossa dedicação e competência foi fundamental para que este trabalho exista hoje. Muito obrigado em especial aos ex-alunos do laboratório, Narjara, Élcio, Jéssica, Paula, Fernanda, Daíse e Valéria, à atual mestranda Thaís Ostolin (para efeitos deste trabalho você ainda é IC) e às atuais alunas de iniciação científica, Bárbara, Yumi, Patrícia e Talita.

Ao corpo técnico do Laboratório de Imunopatologia, Luciana, Josefa, Rosália, João Vitor e Lúcia por serem parte essencial para o funcionamento diário do laboratório, pela competência que demonstram e pela agradável convivência.

À pau-a-pique, a melhor casa de Ouro Preto, nas pessoas de Moisés, Anna, Guilherme, Murilo, Léo, Lucas e Túlie, por terem aceito na vossa casa um português desconhecido depois de uma conversa de facebook e uma chamada de Skype. As conversas, as piadas e as risadas que aconteceram naquela cozinha ficarão comigo para o resto da vida.

À Marcela, pelo privilégio de poder ter convivido com a sua leveza, inteligência e boa disposição durante alguns meses. Fica um misto de tristeza por você ter partido cedo de mais e

felicidade, por ter podido te conhecer.

Ao Falcão, à Bernardete, ao Patrick, à Márcia, ao Triguinho, à Fernanda, à Rita, à Mariana, ao Filipe e a todos os outros amigos que permanecem, provando que a distância não corrói a amizade. Espero estar com todos em breve!

À Universidade Federal de Ouro Preto, pela excelente infraestrutura e pelos profissionais competentes que encontrei durante todo o doutorado.

Ao setor de transporte da UFOP e todos seus funcionários pela disponibilidade na condução das viagens para Governador Valadares.

Ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas e ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas pela formação de qualidade de seus alunos.

A todos os professores da pós-graduação, pela excelente didática e por todo o conhecimento que partilhado.

Ao Centro de Ciência Animal da UFOP e todos os seus funcionários pelo auxílio durante a experimentação animal.

À prefeitura de Governador Valadares (GV) e especialmente ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) em nome de seus funcionários pela disponibilidade e confiança em nosso trabalho. Em especial à Aimara, à Luana e à Gleise pela disponibilidade e carinho demonstrados para que a nossa pesquisa pudesse ser bem sucedida. Ao Ozimar e Geraldo pela dedicação e boa disposição nos dias de trabalho pelas ruas de Governador Valadares.

À CAPES pela concessão da bolsa.

Aos donos dos cães, que num momento de grande dificuldade, aceitaram ceder seus animais para contribuir com o conhecimento científico.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para este trabalho, mas que não foram mencionados por mera distração, o meu pedido de desculpas e o meu muito obrigado!

“E enfim duma escolha faz-se um desafio
enfrenta-se a vida de fio a pavio
navega-se sem mar, sem vela ou navio
bebe-se a coragem até dum copo vazio
e vem-nos à memória uma frase batida:
hoje é o primeiro dia do resto da tua vida!”

Sérgio Godinho

A Leishmaniose Visceral zoonótica é um problema de saúde pública global com uma expansão crescente em várias regiões do mundo. O cão, como principal reservatório doméstico do parasito, apresenta-se como um dos fatores que favorecem a expansão da doença em humanos. Dois dos principais órgãos afetados pela leishmaniose visceral canina (LVC) são o baço e o fígado, que apresentam alterações estruturais, decorrentes da infecção. A célula mais parasitada no contexto da infecção por *L. infantum* é o macrófago, sendo também a célula mais importante na eliminação de formas amastigotas, através da produção de óxido nítrico (NO), ou espécies reativas de oxigênio (ROS). Dessa forma, nosso estudo buscou avaliar a influência de determinadas citocinas na produção de mediadores microbicidas por macrófagos do baço, fígado e derivados de monócitos circulantes, assim como, a correlação destes fatores imunológicos, com a forma clínica, a carga parasitária e a esplenomegalia no contexto da leishmaniose visceral canina (LVC). Nossa estratégia experimental contou com 27 cães, divididos entre cães não infectados (CNI - n=7), cães infectados assintomáticos (CA - n=10) e cães infectados sintomáticos (CS - n=9). Nos cães infectados, foi avaliada a carga parasitária por qPCR e LDU (*Leishman donovan units*), sendo observada uma carga parasitária maior no baço e fígado do grupo CS. Foi ainda avaliada a presença e grau de esplenomegalia, por ultrassonografia, sendo verificado que cães do grupo CS, apresentam um maior grau de esplenomegalia, comparativamente a cães do grupo CNI e CA. Para avaliação da resposta imune no baço e fígado, foi realizada por citometria de fluxo uma avaliação *ex vivo* destes compartimentos. Os resultados demonstraram que em ambos os órgãos existe uma maior população de linfócitos T CD3⁺ em cães do grupo CA, comparativamente ao grupo CNI. No fígado foi constatado um menor percentual de linfócitos T CD4⁺ e um maior percentual de linfócitos T CD8⁺, no grupo CS, relativamente aos grupos CNI e CA. Ao avaliar a produção intracelular de IFN- γ e IL-4 nas subpopulações de linfócitos T, foi observado que linfócitos T CD4⁺ do baço e fígado de cães do grupo CA demonstraram uma maior capacidade de produção de IFN- γ , em comparação aos do grupo CNI e CS. Seguidamente, foram avaliadas por qPCR as expressões de RNAm de várias citocinas associadas com a resistência e susceptibilidade e da enzima iNOS em baço e fígado, tendo sido constatada uma maior expressão de IL-12 em ambos os órgãos de cães do grupo CA, em relação ao grupo CNI. No compartimento esplênico, foi ainda observado um aumento na expressão de iNOS no grupo CA, por comparação aos grupos CNI e CS e um aumento na expressão de IL-10 nos cães do grupo CS, em relação aos grupos CA e CNI. Ainda nos compartimentos esplênico e hepático, foi avaliada a produção de NO e ROS por macrófagos, tendo sido constatada um aumento na frequência de macrófagos produtores de NO em cães do grupo CA, por comparação aos do grupo CNI. Em relação à produção de ROS, foi observada uma maior produção em macrófagos do grupo CA, em relação ao grupo CNI, em ambos os órgãos. Foram ainda realizadas avaliações imunológicas *in vitro*, em sistemas de co-cultivo incluindo macrófagos derivados de monócitos circulantes após infecção com promastigotas vivos de *L. infantum* GFP, em cultivo com subpopulações de linfócitos T autólogos (M ϕ + CD4⁺; M ϕ + CD8⁺; M ϕ + CD4⁺ e CD8⁺). Partindo desses co-cultivos foi concluído que macrófagos do grupo CA apresentaram uma maior redução da taxa e intensidade de infecção quando em co-cultivo com linfócitos T CD4⁺ e/ou CD8⁺, além disso foi observada um maior predomínio de linfócitos T CD4⁺ produzindo IFN- γ em detrimento de células produtoras de IL-4 nos cães do grupo CA. Além disso, foi constatado qCA apresentaram um maior percentual de macrófagos produtores de NO quando em co-cultivo com linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, quando comparados ao grupo CS. Foi ainda, examinada a possível existência de correlações entre os parâmetros avaliados nas diferentes metodologias. Foi assim observada uma íntima correlação entre fatores, tais como, a expressão de IL-12, o percentual de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ e o percentual de macrófagos produtores de NO que estão associados à resistência. Por outro lado, fatores tais como a expressão esplênica de IL-10, a esplenomegalia e o parasitismo, são fatores intimamente associados à susceptibilidade perante a infecção por *L. infantum*. Estes resultados contribuem para o entendimento da imunopatologia da LVC e permitiram identificar marcadores de resistência e susceptibilidade, num contexto clínico e no desenvolvimento de novas formas de diagnóstico e vacinas.

Visceral Leishmaniasis is a global health issue expanding through various regions of the world. As the main domestic reservoir of *Leishmania infantum*, infected dogs present as a decisive factor in disease transmission to humans. Liver and spleen, two of the most affected organs by canine visceral leishmaniasis (CVL), often present with architectural alterations, caused by infection. The most parasitized cell by *L. infantum* is the macrophage, which is also key in the elimination of amastigote forms, achieved by nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) production. Thus, this study evaluated how the expression of certain cytokines influence NO and ROS production by splenic, hepatic and monocyte derived macrophages and the correlation between these immunological factors, with clinical status, parasite load and splenomegaly in CVL. Our experimental strategy included 27 dogs, divided between non-infected (NID n=7), infected asymptomatic (AD n=10) and infected symptomatic (SD n=9). In infected dogs, parasite load was evaluated using qPCR and LDU (Leishman donovan units) and a higher parasite load was observed in the splenic and hepatic compartments of SD. Splenomegaly was also assessed using ultrasonographic methods, with SD presenting with more severe splenomegaly compared with NID and AD. Splenic and hepatic immune response was also evaluated using *ex vivo* techniques. Results have shown a higher percentage of CD3⁺ lymphocytes in AD, compared with NID in both organs. In the hepatic compartment a lower frequency of T CD4⁺ lymphocytes and a higher percentage of T CD8⁺ lymphocytes was observed in SD, compared with NID and AD. Subsequently, IFN- γ and IL-4 intracellular production by these subsets of T lymphocytes was evaluated and a higher frequency of T CD4⁺ lymphocytes producing IFN- γ was observed in AD, compared with NID and SD in both splenic and hepatic compartments. Furthermore, mRNA expression of cytokines associated with resistance or susceptibility to LVC and iNOS was assayed, by qPCR and it was concluded that IL-12 expression in both organs was higher in AD, compared with NID. Specifically to the splenic compartment, a higher level of iNOS was observed in AD dogs, compared with NID and SD. Additionally, SD dogs presented with higher expression. of IL-10, relative to NID and AD. Finalizing the *ex vivo* assessments, NO and ROS production by splenic and hepatic macrophages was evaluated. In both organs, a higher frequency of NO producing macrophages was observed in AD, compared with NID and SD. Moreover, AD macrophages from both organs presented with higher ROS production ability, compared with NID. To complement this work, *in vitro* immunological evaluations were also performed, using co-culture systems of *L. infantum* infected monocyte derived macrophages in culture with autologous T lymphocyte subsets (M ϕ + CD4⁺; M ϕ + CD8⁺; M ϕ + CD4⁺ and CD8⁺). From these co-cultures it was concluded that macrophages from AD group, presented with steeper drops in infection rate and intensity when cultured with CD4⁺ and/or CD8⁺ T lymphocytes. A higher percentage of CD4⁺ T lymphocytes producing IFN- γ in AD dogs was also observed. Moreover, in M ϕ + CD4⁺ and M ϕ + CD4⁺ and CD8⁺, a higher frequency of NO producing macrophages was observed in AD, compared with SD. Finally, through correlation analysis, possible interconnections between the evaluated variables were assessed. Parameters, such as, IL-12 expression, frequency of CD4⁺ T lymphocytes producing IFN- γ and frequency of NO producing macrophages were intimately connected and associated with resistance. On the other hand, splenic expression of IL-10, splenomegaly and high parasitism were highly associated and related to susceptibility against *L. infantum* infection.

- μM - micromolar
- μL – microlitro
- A/G – Albumina / Globulina
- AF647 – Alexa Fluor 647
- ALT – Alanina aminotransferase
- ASL - Antígeno solúvel de *L. infantum*
- AST – Aspartato aminotransferase
- APC – Alofococianina
- APC – Células apresentadoras de antígeno
- BSA – Albumina de soro bovino
- $^{\circ}\text{C}$ – Celsius
- CA – Cães assintomáticos
- CCA - Centro de Ciência Animal
- CCL2 - Proteína quimiotática de monócitos 1
- CCZ – Centro de Controle de Zoonoses
- cDNA – DNA complementar
- CETDVL - Canil de Experimentação em Testes de Drogas e Vacinas para Leishmaniose
- CETEA - Comitê de ética para o uso de animais de laboratório
- CD11b⁺ - Marcador de superfície celular da subpopulação de monócitos/macrófagos
- CD14⁺ - Marcador de superfície celular da subpopulação de monócitos
- CD3⁺ - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T totais
- CD4⁺ - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares
- CD8⁺ - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxicos/supressores
- CNI – Cães não infectados
- CO₂ – Dióxido de carbono
- COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- CS – Cães sintomáticos
- CROR – CellRox orange reagent
- Ct - *Cycle threshold* (limiar da fase exponencial)
- CTAB - Brometo de Cetiltrimetilamônio
- CTLA-4 - *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*
- DH82 – *Dog histiocytosis 82*

dL – decilitro

DAF2-DA - 4'5'-Diaminofluoresceína diacetato

DCFH-DA - 2'7'-diclorofluoresceína diacetato

DEPC - Dietilpirocarbonato

DNA - Ácido desoxirribonucléico

EPI – Equipamento de proteção individual

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

FL1 – Canal de fluorescência 1

FL2 – Canal de fluorescência 2

FL4 – Canal de fluorescência 4

FSC - *Forward Scatter* (Tamanho)

g – Grama

G - Constante gravitacional

Gama GT – Glutamil transferase

GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GFP – *Green fluorescent protein*

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

IMF – Intensidade média de fluorescência

IFN- γ - Interferon gama

IL-2 – Interleucina 2

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

IL-4 – Interleucina 4

iNOS - Óxido nítrico sintase induzida

IP-10 - Interferon-inducible protein 10

IRF-5 - Fator regulatório de interferon 5

L - Litro

LAG-3 - *Lymphocyte-activation gene 3*

LBMPL - Vacina composta por antígenos de *L. braziliensis* associada ao adjuvante monofosforil lipídeo A

LDU – *Leishman donovan units*

- LC - Leishmaniose cutânea
- LCM – Leishmaniose cutâneo-mucosa
- LIT - Liver Infusion Tryptose (meio de cultura)
- LV – Leishmaniose visceral
- LVC – Leishmaniose visceral canina
- LVH – Leishmaniose visceral humana
- LPS – Lipopolissacarídeo
- M – Molar
- M ϕ – Macrófago
- M-CSF - Fator estimulador de colônias de macrófagos
- MAP – Macrófagos com alto parasitismo
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MBP – Macrófagos com baixo parasitismo
- mg – miligrama
- mL – mililitro
- mM - milimolar
- MnCl₂ – Cloreto de magnésio
- MNP – Macrófagos não parasitados
- MOPS - *3-(N-morpholino) propanesulfonic acid*
- MS - Ministério da Saúde
- NaCl – Cloreto de sódio
- NADPH oxidase - *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*
- NKT - *Natural killer T cells*
- nm - nanômetro
- NNN/LIT - *Novy-MacNeal-Nicolle-liver infusion tryptose* (Meio de Cultivo Celular)
- NO – Óxido Nítrico
- NTP - Nucleosídeo-trifosfato
- NUPEB – Núcleo de pesquisas em ciências biológicas
- O₂⁻ - Íon Superóxido
- OH – Radicais hidroxila
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- ONOP – Orange nitric oxide probe
- OP46 – cepa de *Leishmania infantum* OP46

PBMC – Células mononucleares do sangue periférico
pb – pares de bases
PBS - *Phosphate buffer saline* (solução salina tamponada)
PD-1 - *Programmed cell death protein 1*
PE - Ficoeritrina
PCR – Reação em cadeia da polimerase
qPCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real (quantitativa)
RANTES - Regulated on activation, normal T Cell expressed and secreted
RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*
RNAm – *Messenger ribonucleic acid*
RPMI- *Roswell Park Memory Institute* (Meio de cultivo celular)
ROS – *Reactive oxygen species*
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SFB – Soro fetal bovino
SLA – Antígeno solúvel de *Leishmania infantum*
SLN – Solução de lise nuclear
smal - *Acyl-homoserine-lactone synthase*
SSA - Subunidade pequena do gene no locus do DNA ribossomal
SSC – *Side Scatter* (Complexidade/Granulosidade)
STAT-4 - *Signal transducer and activator of transcription 4*
TA - Temperatura ambiente
T-Bet - *T-box transcription factor*
TGF- β – Fator de transformação do crescimento beta
TGO - Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP - Transaminase glutâmico-pirúvica
Th1 - Células T CD4⁺ secretoras do padrão 1 de citocinas
Th2 - Células T CD4⁺ secretoras do padrão 2 de citocinas
TI – Taxa de infecção
TNF-a - Fator de necrose tumoral alfa
Tris HCL - Tris(hidroximetil)aminometano ácido clorídrico
UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto
U – Unidades internacionais

Figura 1: Representação do modo de ação dos reagentes 4',5'-Diaminofluoresceína diacetato (DAF-2 DA) e 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA)	31
Figura 2: Avaliação da morfologia e fluorescência de promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> OP46 e OP46GFP por citometria de fluxo	38
Figura 3: Percentual de pureza de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ a partir do sangue periférico de cães naturalmente infectados e hípidos, mantidos em cultura por cinco dias e submetidos à purificação com <i>microbeads</i> e colunas magnéticas	42
Figura 4: Sequência da análise realizada para determinar o percentual de linfócitos T totais (CD3 ⁺), CD3 ⁺ CD4 ⁺ e T CD3 ⁺ CD8 ⁺ no baço de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i>	48
Figura 5: Sequência da análise realizada para determinar o percentual de linfócitos T totais (CD3 ⁺), CD3 ⁺ CD4 ⁺ e T CD3 ⁺ CD8 ⁺ no fígado de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i>	48
Figura 6: Sequência de procedimentos utilizados para análise do percentual de linfócitos T CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ e CD4 ⁺ IL-4 ⁺ no compartimento esplênico	49
Figura 7: Sequência de procedimentos utilizados para análise do percentual de linfócitos T CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ e CD8 ⁺ IL-4 ⁺ no compartimento esplênico	50
Figura 8: Avaliação da expressão intracelular de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) por macrófagos esplênicos (CD11b ⁺).....	51
Figura 9: Avaliação da expressão intracelular de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) por macrófagos hepáticos (CD11b ⁺).....	51
Figura 10: Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de linfócitos T CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ e CD4 ⁺ IL-4 ⁺ no contexto de co-cultivo com macrófagos derivados de monócitos caninos circulantes infectados com <i>Leishmania infantum</i>	52
Figura 11: Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de linfócitos T CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ e CD8 ⁺ IL-4 ⁺ no contexto de co-cultivo com macrófagos derivados de monócitos caninos circulantes infectados com <i>Leishmania infantum</i>	53
Figura 12: Avaliação da expressão intracelular de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, por macrófagos derivados de monócitos sanguíneos em co-cultivo com linfócitos T CD4 ⁺ e/ou linfócitos T CD8 ⁺ e infectados com <i>Leishmania infantum</i> GFP	54
Figura 13: Avaliação da expressão intracelular de óxido nítrico, por macrófagos derivados de monócitos sanguíneos em co-cultivo com linfócitos T CD4 ⁺ e/ou linfócitos T CD8 ⁺ e <i>Leishmania infantum</i> GFP, em situações de ausência, baixo ou alto parasitismo	55

Figura 14: Carga parasitária esplênica e hepática avaliada por qPCR de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i>	59
Figura 15: Carga parasitária esplênica e hepática avaliada por LDU (Leishman Donovan Units), de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i>	59
Figura 16: Avaliação por ultrassonografia da espessura do baço em cães não infectados e naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i>	60
Figura 17: Avaliação da função renal através das concentrações séricas de uréia e creatinina	63
Figura 18: Avaliação da função hepática, através das concentrações séricas de aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT), fosfatase alcalina e gama glutamil transpeptidase (GGT).....	64
Figura 19: Avaliação do proteinograma através da concentração sérica de proteínas totais, albumina, globulinas e razão albumina/globulina nos diferentes grupos	65
Figura 20: Percentual de linfócitos T totais (CD3 ⁺) e das subpopulações CD3 ⁺ CD4 ⁺ e CD3 ⁺ CD8 ⁺ no baço de cães não infectados e naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i>	66
Figura 21: Perfil de linfócitos T esplênicos (CD4 ⁺ e CD8 ⁺), produtores de IFN- γ e IL-4	67
Figura 22: Expressão de mRNA de citocinas associadas à resistência e susceptibilidade no baço de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i>	68
Figura 23: Perfil de macrófagos esplênicos (CD11b ⁺), produtores de NO e ROS	69
Figura 24: Percentual de linfócitos T totais (CD3 ⁺) e linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ hepáticos ..	70
Figura 25: Perfil de linfócitos T hepáticos (CD4 ⁺ e CD8 ⁺), produtores de IFN- γ e IL-4	71
Figura 26 Expressão de mRNA de citocinas associadas à resistência e susceptibilidade no fígado de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i>	72
Figura 27: Perfil de macrófagos hepáticos (CD11b ⁺), produtores de NO e ROS.....	73
Figura 28: Fotomicrografias da diferenciação de monócitos em macrófagos em cultura.....	74
Figura 29: Microscopia convencional da infecção de macrófagos derivados de monócitos circulantes, infectados com <i>Leishmania infantum</i> GFP ⁺	75
Figura 30: Avaliação da infecção de macrófagos derivados de monócitos circulantes, infectados com <i>Leishmania infantum</i> GFP ⁺ , quando em co-cultivo com diferentes subpopulações de linfócitos T(CD4 ⁺ e/ou T CD8 ⁺)	76
Figura 31: Perfil de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ produtores de IFN- γ e IL-4 quando cultivados isoladamente (M ϕ + CD4 ⁺ e M ϕ + CD8 ⁺), num contexto de co-cultivo com macrófagos	

derivados de monócitos circulantes e <i>L. infantum</i> GFP ⁺	77
Figura 32: Perfil de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ produtores de IFN- γ e IL-4 ⁺ quando cultivados em conjunto, no contexto de co-cultivo com macrófagos derivados de monócitos sanguíneos e <i>L. infantum</i> GFP (M ϕ + CD4 ⁺ + CD8 ⁺).....	78
Figura 33: Perfil de macrófagos derivados de monócitos sanguíneos produtores de NO, no contexto de co-cultivo com linfócitos T CD4 ⁺ e/ou T CD8 ⁺ infectados por amastigotas de <i>L. infantum</i> GFP ⁺	79
Figura 34: Perfil de macrófagos derivados de monócitos sanguíneos produtores de NO, no contexto de co-cultivo com linfócitos T CD4 ⁺ e/ou T CD8 ⁺ infectados por amastigotas de <i>L. infantum</i> GFP ⁺ , de acordo com o nível de parasitismo	80
Figura 35: Perfil de macrófagos derivados de monócitos sanguíneos produtores de ROS, no contexto de co-cultivo com linfócitos T CD4 ⁺ e/ou T CD8 ⁺ e <i>L. infantum</i> GFP ⁺	81
Figura 36: Perfil de macrófagos derivados de monócitos sanguíneos produtores de ROS, no contexto de co-cultivo com linfócitos T CD4 ⁺ e/ou T CD8 ⁺ infectados por amastigotas de <i>L. infantum</i> GFP ⁺ , de acordo com o nível de parasitismo	82

Quadro 1: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores senso (forward: F), antisenso (reverse: R) utilizados nas qPCRs.....	35
Quadro 2: Tubos para avaliação da expressão intracelular de IFN- γ e IL-4 em linfócitos T CD4 ⁺ e linfócitos T CD8 ⁺	44
Quadro 3: Tubos para avaliação do percentual de macrófagos infectados e expressão intracelular de NO.....	45
Quadro 4: Tubos para avaliação da expressão intracelular de ROS.....	45
Quadro 5: Diluição e fluorescência dos anticorpos utilizados.....	45
Quadro 6: Correlações entre carga parasitária, esplenomegalia e parâmetros imunológicos no compartimento esplênico.....	82
Quadro 7: Correlações entre carga parasitária e parâmetros imunológicos no compartimento hepático.....	83
Quadro 8: Correlações entre índice de infecção e parâmetros imunológicos no contexto de co-cultivo de leucócitos circulantes.....	83
Quadro 9: Correlações entre parâmetros imunológicos e parasitológicos das metodologias <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	83
Quadro 10: Sinais clínicos presentes nos cães do grupo sintomático.....	124

Tabela 1: Caracterização clínico-laboratorial baseado em sinais clínicos e resultados dos testes sorológicos (ELISA e DPP) e parasitológicos (isolamento em NNN/LIT).....56

Tabela 2: Eritrograma de cães controles não infectados e naturalmente infectados por *L. infantum*, pertencentes aos grupos assintomático e sintomático.....59

Tabela 3: Leucograma de cães controles não infectados e naturalmente infectados por *L. infantum*, pertencentes aos grupos assintomático e sintomático.....60

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES.....	1
1.2 - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA E SUA IMPORTÂNCIA NO CONTEXTO EPIDEMIOLÓGICO	3
1.3 - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS	4
1.4 - IMUNOPATOLOGIA DAS ALTERAÇÕES HEPATOESPLÊNICAS NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	6
1.4.1 - <i>Imunopatologia no baço</i>	6
1.4.2 - <i>Imunopatologia no fígado</i>	9
1.5 - LEISHMANIOSE VISCERAL: MEDIADORES MICROBICIDAS DOS MACRÓFAGOS	11
2 – OBJETIVOS	15
2.1 - OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 – MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	18
3.2 - MANEJO DOS ANIMAIS	19
3.3 - AVALIAÇÃO CLÍNICA	21
3.4 – COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO	21
3.4.1 - <i>Obtenção de amostras de sangue periférico para hemograma, avaliações bioquímicas e co-cultivo celular</i>	21
3.4.2 - <i>Obtenção de amostras de baço e fígado</i>	21
3.5 – AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA.....	22
3.5.1 - <i>Punções aspirativas de medula óssea e isolamento de formas promastigotas de Leishmania infantum em mielocultura</i>	22
3.5.2 - <i>Análise molecular para quantificação da carga parasitária no baço e fígado pela técnica de PCR em tempo real</i>	23
3.5.2.1 - <i>Extração de DNA da massa de promastigotas para curva padrão</i>	23
3.5.2.2 - <i>Construção da curva padrão para a PCR em tempo real</i>	23
3.5.2.3 - <i>Extração de DNA de tecidos</i>	24
3.5.2.4 - <i>PCR em tempo real</i>	24
3.5.3 – <i>Quantificação do parasitismo empregando a técnica de Leishman Donovan Units - LDU</i>	26
3.6 - EXAME ULTRASSONOGRÁFICO.....	26
3.7 - AVALIAÇÃO DO QUADRO HEMATOLÓGICO E BIOQUÍMICO	26
3.8 - IMUNOFENOTIPAGEM DO COMPARTIMENTO HEPÁTICO E ESPLÊNICO POR CITOMETRIA DE FLUXO NO CONTEXTO <i>EX VIVO</i>	27
3.8.1 - <i>Obtenção das células do compartimento esplênico</i>	27
3.8.2 - <i>Obtenção das células do compartimento hepático</i>	28
3.8.3 - <i>Imunofenotipagem para caracterização do perfil de linfócitos T no compartimento esplênico e</i>	

<i>hepático</i>	28
3.8.4 - <i>Imunofenotipagem para caracterização do perfil de linfócitos produtores IL-4 e IFN-γ no compartimento esplênico e hepático</i>	29
3.8.5 - <i>Imunofenotipagem para caracterização do perfil de macrófagos produtores de NO e ROS no compartimento esplênico e hepático</i>	29
3.10 - TRANSFEÇÃO DAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. INFANTUM</i> COM O GENE REPÓRTER GFP PARA O CO-CULTIVO	35
3.10.1 - <i>Plasmídeo pIR1-SAT</i>	35
3.10.2 - <i>Eletroporação de Leishmania infantum</i>	36
3.10.3 - <i>Avaliação da fluorescência por citometria de fluxo</i>	37
3.11 - CO-CULTIVO: MACRÓFAGOS, PROMASTIGOTAS GFP DE <i>L. INFANTUM</i> E LINFÓCITOS (CD4 E/OU CD8)	38
3.11.1 - <i>Obtenção de células mononucleares do sangue periférico</i>	38
3.11.2 – <i>Condições de cultivo para derivação de monócitos circulantes em macrófagos</i>	39
3.11.3 - <i>Purificação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺</i>	40
3.11.4 - <i>Co-Cultivo celular</i>	42
3.11.5 – <i>Avaliação da expressão intracelular de IFN-γ e IL-4 em linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ autólogos, por citometria de fluxo</i>	43
3.11.6 - <i>Imunofenotipagem de macrófagos e avaliação da expressão intracelular de NO e ROS por citometria de fluxo</i>	44
3.11.7 – <i>Avaliação da evolução morfológica dos monócitos em cultura com M-CSF e realização de microfotografias representativas da infecção por Leishmania infantum</i>	45
3.11.8 – <i>Realização de microfotografias representativas da infecção por Leishmania infantum, por microscopia convencional e microscopia confocal</i>	46
3.12 - ESTRATÉGIAS DE ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO	47
3.12.1 - <i>Estratégias para análise imunofenotípica celular no contexto ex vivo no baço e fígado</i>	47
3.12.2 – <i>Estratégia de análise da produção citocinas intracitoplasmáticas (IFN-γ e IL-4) por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no compartimento esplênico e hepático</i>	49
3.12.3 - <i>Estratégia de análise de produção de NO e ROS por macrófagos hepáticos e esplênicos no contexto ex-vivo</i>	50
3.12.4 - <i>Estratégia de análise da produção citocinas intracitoplasmáticas (IFN-γ e IL-4) por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em co-cultivo com macrófagos infectados derivados de monócitos circulantes</i>	52
3.12.5 - <i>Estratégia de análise de produção de NO e ROS por macrófagos infectados derivados de monócitos circulantes em co-cultivo com subpopulações de linfócitos autólogos</i>	53
3.12.6 - <i>Estratégia de análise de produção de NO e ROS por macrófagos derivados de monócitos circulantes, com diferentes níveis de parasitismo, em co-cultivo com subpopulações de linfócitos autólogos</i>	54
3.13 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS	55
4 - RESULTADOS	56

4.1 – AVALIAÇÕES SOROLÓGICA E PARASITOLÓGICA DOS CÃES INFECTADOS POR <i>LEISHMANIA INFANTUM</i>	57
4.1.1 – <i>Diagnóstico sorológico e isolamento de promastigotas em mielocultura</i>	57
4.1.2 – <i>Avaliação da carga parasitária por qPCR e pelo método Leishman Donovan Units (LDU)</i>	58
4.2 – AVALIAÇÃO DO GRAU DE ESPLENOMEGALIA EM CÃES INFECTADOS COM <i>L. INFANTUM</i>	60
4.3 - AVALIAÇÃO LABORATORIAL: PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS.....	61
4.3.1 - <i>Parâmetros hematológicos: eritrograma e leucograma</i>	61
4.3.2 - <i>Parâmetros bioquímicos</i>	62
4.3.2.1- <i>Provas de função renal</i>	62
4.3.2.2- <i>Provas de função hepática</i>	63
4.3.2.3- <i>Proteinograma</i>	64
4.4 - AVALIAÇÃO EX-VIVO, NO COMPARTIMENTO ESPLÊNICO, DO PERFIL LINFOCITÁRIO E PRODUÇÃO DE CITOCINAS INTRACELULARES, BEM COMO DO PERFIL DE MACRÓFAGOS PRODUTORES DE NO E ROS	65
4.4.1 - <i>Imunofenotipagem para caracterização do perfil de linfócitos T no compartimento esplênico</i>	65
4.4.2 - <i>Imunofenotipagem para caracterização do perfil de linfócitos produtores IL-4 e IFN-γ no compartimento esplênico</i>	66
4.4.3 – <i>Avaliação da expressão de mRNA de citocinas e iNOS no compartimento esplênico de cães naturalmente infectados com L. infantum</i>	67
4.4.4 - <i>Imunofenotipagem para caracterização do perfil de macrófagos produtores de NO e ROS no compartimento esplênico</i>	68
4.5 - <i>Avaliação ex-vivo, no compartimento hepático, do perfil linfocitário e produção de citocinas intracelulares, bem como do perfil de macrófagos produtores de NO e ROS</i>	69
4.5.1 - <i>Imunofenotipagem para caracterização do perfil de linfócitos T no compartimento hepático</i>	69
4.5.2 - <i>Imunofenotipagem para caracterização do perfil de linfócitos produtores IL-4 e IFN-γ no compartimento hepático</i>	70
4.5.3 – <i>Avaliação da expressão de mRNA de citocinas e iNOS no compartimento hepático de cães naturalmente infectados com L. infantum</i>	71
4.5.4 - <i>Imunofenotipagem para caracterização do perfil de macrófagos produtores de NO e ROS no compartimento hepático</i>	72
4.6 - CO-CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO	73
4.6.1 – <i>Evolução morfológica dos monócitos em cultura com M-CSF</i>	73
4.5.2 - <i>Percentual de infecção de L. infantum GFP⁺ em macrófagos CD14⁺, derivados de monócitos do sangue periférico, co-cultivados com linfócitos T CD4⁺ e/ou CD8⁺ autólogos</i>	74
4.5.3 – <i>Avaliação de produção de citocinas intracitoplasmáticas por linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺, co- cultivados com macrófagos derivados de monócitos circulantes e L. infantum GFP⁺</i>	76
4.5.4 – <i>Avaliação de produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) em macrófagos derivados de monócitos sanguíneos, co-cultivados com linfócitos T (CD4⁺ e/ou CD8⁺) e L. infantum GFP⁺</i>	78
4.5.4.1 – <i>Óxido Nítrico (NO)</i>	78
4.5.4.2 - <i>Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)</i>	80
4.6 – <i>CORRELAÇÕES ENTRE A CARGA PARASITÁRIA, ESPLENOMEGALIA, PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS ESPLÊNICOS E HEPÁTICOS E</i>	

RELATIVOS AO CO-CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO	82
5 - DISCUSSÃO	86
6 - CONCLUSÃO	103
7- PERSPECTIVAS FUTURAS	105
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
9 – ANEXOS	121
9.1 – ANEXO 1	122
9.2 – ANEXO 2	123
9.3 - ANEXO 3	124
9.4 - ANEXO 5	125

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais das leishmanioses

O conjunto de doenças denominado de leishmanioses é causado por parasitos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (Ross, 1903). Podem ser infectados por estes parasitos um vasto número de animais incluindo os domésticos, os silvestres e o homem (Desjeux, 2004).

Em relação aos aspectos clínicos da doença, apesar de várias propostas terem sido apresentadas, são reconhecidas oficialmente pela Organização Mundial de Saúde (OMS) três formas distintas de leishmaniose: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LCM) e leishmaniose visceral (LV) (WHO, 2017). Dessas, a LV é considerada a mais grave, caracterizada por febre, perda de peso e hepatoesplenomegalia, sendo uma doença fatal em 95% dos casos não tratados (Alvar et al. 2012, WHO, 2017).

Estima-se que aproximadamente 400 mil novos casos de LV surjam anualmente, resultando na morte de 20 a 40 mil pessoas/ano. Ainda assim, devido ao extremo subdesenvolvimento dos países mais afetados pela doença é provável que estes valores estejam subestimados, em consequência de graves limitações nos sistemas de notificação (Alvar et al. 2012; WHO, 2017). No caso específico do Brasil, a média da incidência anual de LV entre 2000 a 2013 atingiu 3.454 casos reportados, representando cerca de 90% dos casos registados no continente americano. Neste período, a letalidade da doença apresentou uma tendência ascendente, de 3,2%, para 7,1% (Alvar et al. 2012, MS, 2015).

Os vetores responsáveis pela transmissão do parasito para o hospedeiro vertebrado são fêmeas de insetos da ordem Díptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. Dois gêneros, em específico, são responsáveis pela transmissão da doença: o gênero *Lutzomyia*, encontrado no “Novo Mundo” (América Central e América do Sul) e o gênero *Phlebotomus*, característico do “Velho Mundo” (África, Ásia e Europa) (Adler & Theodor, 1931; Cunha & Chagas, 1937). Dentro do gênero *Lutzomyia*, a espécie *Lutzomyia longipalpis* é a principal responsável pela transmissão de *L. infantum*, causadora da LV na América do Sul (Sacks & Kamhawi, 2001; Lainson & Rangel, 2005).

Em relação à transmissão do parasito, ocorre inicialmente a dilaceração da pele do hospedeiro pelo inseto vetor, formando uma poça subcutânea de sangue, onde são depositadas as formas promastigotas metacíclicas do parasito. Essas formas parasitárias invadem as células alvo, os macrófagos, no interior dos quais se transformam em formas amastigotas que são replicativas e não flageladas. Esta replicação culmina, eventualmente, na rotura do macrófago e na liberação das formas amastigotas que parasitam outros macrófagos (Handman, 2001; Nieto et al. 2011).

1.2 Leishmaniose visceral canina e sua importância no contexto epidemiológico

O papel do cão no ciclo epidemiológico da LV já vem sendo estudado desde o início do século XX, tendo sido teorizada a sua participação como reservatório por Nicolle & Comte (1908) na Tunísia, após observarem a presença de formas amastigotas do parasito na medula óssea e pele destes animais. Já no Brasil, Chagas et al. (1936) foram pioneiros no estudo epidemiológico da leishmaniose visceral canina (LVC), tendo encontrado na região de Abaeté, no estado do Pará, uma incidência de 4,9%. Deane et al. (1955), num estudo epidemiológico realizado por todo o estado do Ceará reforçaram o papel de canídeos silvestres, como as raposas (*Cerdocyon thous* e *Lycalopex vetulus*) e dos cães domésticos (*Canis familiares*), na propagação da doença ao agirem como reservatórios em áreas de grande prevalência.

A espécie *L. infantum* é a única capaz de causar LVC, tanto no Velho Mundo, quanto no Novo Mundo. A teoria mais aceita sobre a sua inserção no continente americano implica o transporte de cães infectados nos barcos de colonizadores vindos da Europa (Momen et al. 1993, Tuon et al. 2008).

O cão é considerado, desde a década de 50, o principal reservatório doméstico de *Leishmania infantum*. Isto se deve ao fato de cumprir condições essenciais, tais como, a alta susceptibilidade à infecção, o tropismo ou atratividade alimentar pelo vetor, um intenso parasitismo cutâneo e o convívio próximo com o homem. A sua importância como reservatório e o fato de ser extremamente popular como animal de estimação a uma escala global, contribui para que a LV zoonótica seja uma das mais importantes zoonoses no mundo (Gramiccia & Gradoni, 2005, Esch & Petersen, 2013).

Os dados mais atuais sobre a LVC indicam que esta é endêmica em mais de 70 países, sendo estimado que pelo menos 2,5 milhões de cães estejam infectados por *L. infantum* somente no sudoeste europeu. Já no continente americano, o número de casos caninos da doença é estimado em milhões, com maior prevalência na Venezuela e no Brasil (Baneth et al. 2008, Solano-Gallego et al. 2009, 2011, Gradoni, 2015).

A LVC, tal como a LV humana, é uma doença heterogênea, clinicamente multifacetada e com altas taxas de prevalência, podendo afetar grande parte da população canina de uma determinada área endêmica, mesmo que apenas uma pequena parcela desses cães apresente sinais clínicos característicos da doença (Coura-Vital et al. 2013a).

Os estudos clínicos realizados até o momento não demonstraram nenhuma predisposição racial para a doença canina, com exceção da raça *Ibizan hound* que parece apresentar uma resposta imune protetora perante a infecção por *L. infantum* (Solano-Gallego et al., 2000, 2009). Além de fatores relacionados a raça, outras particularidades parecem favorecer a resistência ou

susceptibilidade à doença. Nomeadamente, cães com acesso mais frequente ao exterior das habitações e cães com idades inferiores a 3 anos e entre 8 e 10 anos apresentam maior prevalência que os restantes (Blavier et al. 2001; Cardoso et al. 2004; Solano-Gallego et al. 2009; Paltrinieri et al. 2010; Coura-Vital et al. 2013a). Acredita-se que os animais que apresentam estas características apresentam uma maior probabilidade de serem reservatórios de *L. infantum*, por se encontrarem mais sujeitos ao repasto sanguíneo do inseto vetor (Dantas-Torres et al. 2006, Coura-Vital et al. 2013b).

1.3 Leishmaniose visceral canina: aspectos clínicos e laboratoriais

A LVC é uma doença sistêmica, crônica e severa que é frequentemente fatal, uma vez que não existe um protocolo terapêutico que conduza a uma cura parasitológica completa, com remissão total dos sinais clínicos e sem recidivas da doença a longo prazo (Yasur-Landau et al. 2016, Noli & Auxilia, 2005; Baneth & Shaw, 2002; Slappendel & Teske, 1997). É importante salientar, que é proibido no Brasil o tratamento de cães com medicamentos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), de acordo com portaria interministerial do Ministério da Saúde (nº 1.426 de 11 de julho de 2008). Até recentemente, nenhum fármaco se encontrava registrado junto ao MAPA, no entanto, a nota técnica nº11 de 2016 do MAPA veio permitir a utilização do fármaco miltefosina (Milteforan, Virbac Saúde Animal[®]) para o tratamento de cães com LVC por médicos veterinários privados, não fazendo ainda parte dos programas de saúde pública.

Os aspetos clínicos da LVC apresentam grandes variações como consequência dos vários mecanismos patogênicos envolvidos no decorrer da doença, da multiplicidade de órgãos afetados e do espectro de possíveis respostas imunes desencadeadas nos diferentes animais (Baneth et al. 2008; Reis et al. 2009, Solano-Gallego et al. 2009). Em alguns cães, sinais clínicos graves da doença surgem logo após a infecção, porém, outros animais permanecem infectados por um longo período, sendo capazes de evitar o aparecimento de sinais clínicos. Entre os principais sinais e sintomas clínicos sugestivos de LVC podemos observar: lesões cutâneas (alopecia, dermatite seca, esfoliativa, ulcerativa, nodular, proliferativa ou papular simétrica), linfadenopatia local ou generalizada, perda de peso, apatia, claudicação, lesões oculares (uveíte anterior, queratoconjuntivite e blefarite), vômito, anemia, febre, epistaxes e onicogribose (Ciaramella et al. 1997; Koutinas et al. 1999; Baneth et al. 2008). Dessa forma, Mancianti et al. (1988) perante esta heterogeneidade de manifestações clínicas, propuseram classificar a doença em três grupos distintos, de acordo com a severidade do estado clínico em: cães assintomáticos (CA), sem sinais clínicos característicos da doença, cães oligossintomáticos (CO), com um

máximo de três sinais clínicos sugestivos de LVC e cães sintomáticos (CS), com mais de três sinais clínicos típicos de LVC.

Além dos sinais clínicos detectáveis ao exame físico, cães com LVC tendem a apresentar uma miríade de alterações nos parâmetros hematológicos, entre as quais, observamos uma redução de hemácias, hemoglobina e hematócrito, resultando num quadro de anemia normocítica/normocrômica (Reis et al. 2006a). O quadro hematológico, agrava-se com o surgimento de trombocitopenia afetando diretamente os mecanismos de coagulação. Adicionalmente, no leucograma, é frequente o aparecimento de leucopenia, em consequência de linfopenia, eosinopenia e monocitopenia. (Reis et al. 2006a,b, 2009, Freitas et al. 2012 Momo et al. 2014). A medula óssea é o local onde são formados os leucócitos, eritrócitos e plaquetas, a partir de células hematopoiéticas, sendo também um dos órgãos mais parasitados no contexto da infecção por *L. infantum* (Reis et al., 2006, Rubin & Strayer, 2007). As alterações hematológicas características da LVC podem ser acompanhadas de alterações ao nível destas células hematopoiéticas na medula óssea, tanto nos precursores de leucócitos, como de eritrócitos (Nicolato et al., 2013). Estas alterações incluem uma diminuição do número de várias células da série eritroblástica em cães infectados, em comparação a cães não infectados, encontrando uma correlação entre estas alterações ao nível da medula óssea e alterações existentes ao nível hematológico (Trópia de Abreu et al., 2011, Nicolato et al., 2013). Além disso foi ainda relatada uma diminuição no número de promielócitos nos cães assintomáticos, em relação aos sintomáticos (Trópia de Abreu et al., 2011).

Quanto às células da série granulocítica, cães infectados, apresentam maior frequência de precursores de neutrófilos, comparativamente a cães não infectados, sendo estas alterações mais marcadas em cães que apresentam sinais clínicos característicos de LVC. Já os precursores de eosinófilos apresentam o comportamento contrário, sendo mais escassos em cães infectados, comparativamente a cães normais. Cães infectados apresentam ainda uma população linfocitária medular, superior à de cães não infectados (Tropia de Abreu et al., 2011, Nicolato et al., 2013).

Além das alterações hematológicas e medulares, os animais infectados podem apresentar alterações bioquímicas importantes, tais como aumento sérico das enzimas hepáticas, como aminoalanina transferase (ALT) e aspartato transferase (AST), aumento de ureia e creatinina, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia com diminuição da razão albumina/globulina (Reis et al., 2006a,b, Trópia de abreu et al., 2011, Freitas et al., 2012).

1.4 Imunopatologia das alterações hepatoesplênicas na leishmaniose visceral

1.4.1 Imunopatologia no baço

O baço é o principal órgão linfoide secundário, sendo que, no contexto de infecção por *L. infantum*, este órgão sofre dramáticas alterações estruturais, mais frequentes em animais susceptíveis (Lima et al., 2014, Cavalcanti et al., 2015). As células macrofágicas esplênicas apresentam uma localização otimizada para a remoção de qualquer agente patogênico que trafegue por este órgão através da corrente sanguínea (Mebius & Kraal, 2005). Essas células são as mais parasitadas por amastigotas de *L. infantum* no compartimento esplênico, representando cerca de 90% de todas as células infectadas (Gorak et al., 1998). Ao contrário das células de Kupffer no fígado, os macrófagos esplênicos apresentam uma marcada capacidade inata para a eliminação de formas parasitárias de *L. infantum*, sendo estimado que cerca de 70% do inóculo inicial é eliminado pelos macrófagos da zona marginal no espaço temporal de 24h (Gorak et al., 1998). Assim, poucas horas após o inóculo já é possível verificar uma resposta inicial no compartimento esplênico, com o aparecimento de células dendríticas maduras nas folhas linfoides periarteriolas, capazes de produzir IL-12 e ativar os linfócitos T para o estabelecimento de uma resposta imune protetora (Engwerda et al., 1998; Gorak et al., 1998). Curiosamente, estas células dendríticas não apresentam em seu interior parasitos viáveis, supondo-se que apenas foram expostas a antígenos parasitários, mas não infectadas por parasitos vivos. A forma como estes antígenos são adquiridos não é clara, no entanto, evidências demonstram que as células dendríticas são capazes de fagocitar detritos parasitários ou macrófagos contendo parasitos digeridos (de Trez et al., 2004).

Quanto aos linfócitos T, a ativação do subtipo CD4⁺ pode ser detectada logo no primeiro dia após a infecção, sendo que a quantidade de células T CD4⁺ parasito-específicas presentes no baço aumenta exponencialmente durante as primeiras semanas, contribuindo para o aparecimento de esplenomegalia (Polley et al., 2005). A ativação destas células se dá pela ação da citocina IL-12, que conduz à translocação de STAT-4 para o núcleo, resultando na indução do fator de transcrição T-bet e aumento da expressão do receptor de IL-12 (Zhu et al., 2010). Este fator de transcrição induz a produção de citocinas pro-inflamatórias como IFN- γ que, através de sinalização autócrina, ativa STAT-1 em células fagocitárias aumentando o potencial macrofágico para a produção de NO e ROS neste compartimento (Usui et al., 2006, Zhu et al., 2010, Rodrigues et al., 2016).

Quanto à subpopulação de linfócitos T CD8⁺ na LV, existe pouco conhecimento na literatura sobre estas células em comparação aos linfócitos T CD4⁺. Sabe-se no entanto, que

linfócitos T CD8⁺, tal como os linfócitos T CD4⁺, sofrem uma grande expansão após a infecção, podendo apresentar um número 10 vezes superior após dois meses de infecção (Polley et al., 2005, Rodrigues et al., 2016). Os linfócitos T CD8⁺, também são capazes de responder à IL-12 e a outras citocinas pro-inflamatórias, aumentando a expressão do fator de transcrição T-bet e omeosodermina, além de serem capazes de promover a expressão de citocinas pro-inflamatórias, como TNF- α e IFN- γ e a produção de moléculas citotóxicas como granzima b e perforinas (Takemoto et al., 2006, Kaech & Cul, 2012). A produção dessas citocinas por linfócitos T CD8⁺, com consequente ativação de macrófagos esplênicos, é apontado como o principal mecanismo desempenhado por estas células na destruição de formas amastigotas de *L. infantum* neste sítio (Tsagozis et al., 2005).

Em camundongos, após um período inicial de eliminação intensa de parasitos por macrófagos esplênicos, a carga parasitária se mantém estável durante as duas semanas seguintes, sugerindo um equilíbrio entre a replicação e a eliminação dos parasitos. Embora seja capaz de controlar a infecção, a resposta imune não consegue ser totalmente eficaz, visto que não é capaz de erradicar as formas parasitárias. Na verdade, após as duas semanas de estabilidade, a carga parasitária esplênica inicia uma trajetória ascendente ligeira, sinalizando o início da fase crônica (Engwerda et al., 2004).

O estabelecimento da fase crônica da LV depende de citocinas imunorreguladoras, dentro das quais a IL-10 se destaca. Camundongos *knock out* para o receptor de IL-10, ou nos quais a sua sinalização foi bloqueada, são altamente resistentes à infecção por *L. donovani* (Murray et al., 2002, 2003). Ensaaios *in vitro* demonstraram que a neutralização de IL-10 aumenta a produção de IFN- γ em células esplênicas na LV humana e experimental (Murphy et al., 2001, Murray et al., 2003, Nysten & Sacks, 2007 Gautam et al., 2011). Apesar disso, a expressão dessa citocina por células imunomoduladoras é um fenômeno multifacetado que assegura um controle sobre uma resposta pró-inflamatória exagerada, capaz de causar danos teciduais graves (Saraiva & O'Garra, 2010).

Mais recentemente, foi demonstrado que infecções crônicas, no geral, se caracterizam por uma disfunção das células T, conhecida como exaustão, que está intimamente ligada a um aumento da expressão de receptores de inibição, tais como, PD-1, CTLA-4 e LAG-3 (Jin et al., 2010, 2011).

Essa disfunção prejudica uma resposta imune bem-sucedida devido à perda de determinadas funções, tais como citotoxicidade, produção de IL-2 e proliferação celular numa fase mais inicial da doença, culminando em uma fase mais avançada, na inabilidade de produção de TNF- α , IFN- γ e desgranulação. No caso da LV, esta disfunção das células T resulta

num aumento da carga parasitária (Wherry, 2011, Esch et al., 2013, Schietinger & Greenberg, 2014).

Em camundongos experimentalmente infectados com *L. donovani*, linfócitos T CD8⁺ esplênicos exibem sinais iniciais de exaustão na terceira semana pós-infecção e uma disfunção mais severa na quarta semana, com diminuição da produção de IFN- γ , TNF- α , IL-2 e granzima B e aumento da expressão de PD-1 (Joshi et al., 2009). Indícios de exaustão desses linfócitos também foram confirmados em pacientes com LV, que exibiram disfunção funcional com aumento na expressão de PD-1 e CTLA-4 (Esch et al., 2013).

Ao contrário do recente conhecimento sobre a exaustão em células T CD8⁺, o mesmo fenômeno em linfócitos T CD4⁺ é menos compreendido. É sabido que na LVC a exaustão de células T CD4⁺ é menos severa do que nas células CD8⁺ e aparece apenas em fases clínicas mais avançadas da doença (Esch et al., 2013).

Na infecção canina, tal como em modelo experimental murino, o baço é um dos principais órgãos afetados pela doença, sendo verificada a existência de uma elevada carga parasitária, tornando este órgão de fundamental importância no estabelecimento de uma resposta imune adaptativa durante a LVC (Reis et al., 2006a,c, 2014).

Está bem descrito na literatura que cães assintomáticos (CA) apresentam uma menor carga parasitária esplênica, assim como um maior percentual de linfócitos B, em comparação com cães sintomáticos (CS) (Reis et al., 2006a). Em cultura estimulada com antígeno de *Leishmania*, esplenócitos de CA, apresentam uma resposta linfoproliferativa mais eficiente e expressaram MHC-II de forma mais intensa do que CS (Reis et al., 2014).

Um estudo desenvolvido para investigar a resposta imune em esplenócitos de cães natural ou experimentalmente infectados por *L. infantum*, demonstrou um aumento dos níveis de IFN- γ , T-bet, IP-10 e RANTES. Por outro lado, os níveis de IL-4 encontravam-se elevados na fase inicial da infecção experimental, enquanto os níveis de IL-5 foram maiores nas fases mais tardias da infecção (Strauss-Ayali et al., 2007).

Outros estudos têm demonstrado que a LVC é marcada por uma produção de citocinas associadas com a resistência e a susceptibilidade, com acúmulo predominante de IFN- γ e IL-10, como consequência de um aumento da carga parasitária esplênica e da progressão da doença (Lage et al., 2007). Por outro lado, estes autores não observaram diferenças na expressão do RNAm de citocinas (TNF- α , IL-12, IL-4, IFN- γ e IL-10) em esplenócitos de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, apresentando diferentes formas clínicas da doença. Além disso, é bem descrito na literatura uma elevada associação entre a carga parasitária esplênica e a gravidade das manifestações clínicas (Guerra et al., 2009; Reis et al., 2009).

Em relação à histopatologia do baço durante a infecção por *L. infantum* no cão, é possível verificar a existência de infiltrado inflamatório na região capsular, que é mais intenso em animais sintomáticos em comparação com os animais assintomáticos. É possível ainda observar a existência de hipertrofia e hiperplasia na polpa vermelha em todos os grupos clínicos, caracterizada por um infiltrado inflamatório em que predominam células mononucleares, maioritariamente plasmócitos (Santana et al., 2008).

Assim, considerando a ocorrência de extensas alterações morfológicas e uma grande atividade imunológica em resposta ao parasitismo intenso que afeta o compartimento esplênico, fica evidenciada a importância do baço no contexto da LVC (Reis et al., 2009).

1.4.2 Imunopatologia no fígado

Em relação à resposta imune compartimentalizada no fígado, é sabido que, em modelo murino, a infecção apresenta-se como auto-limitante, sendo a sua resolução dependente do desenvolvimento de imunidade mediada por linfócitos T e formação de granulomas (Engwerda et al. 2004). As células de Kupffer (macrófagos hepáticos) são as células mais parasitadas após infecção de camundongos por *L. infantum*, apresentando uma limitada capacidade para destruir as formas parasitárias, sendo observado um aumento rápido da carga parasitária nas primeiras semanas da infecção (Wilson et al., 1996, Leclercq et al., 1996, Rodrigues et al., 2016).

A restrição do parasitismo hepático acontece paralelamente à formação de estruturas inflamatórias denominadas granulomas, constituídas por um núcleo central de células de Kupffer fundidas e parasitadas rodeado por camadas periféricas formadas por linfócitos e outras células imunes (Mcelrath, 1988, Tafuri et al., 2004). Estas estruturas permitem a concentração de células inflamatórias que produzem as citocinas necessárias para ativar de forma eficiente a atividade microbicida das células de Kupffer (Rodrigues et al., 2016).

Numa fase inicial da formação do granuloma hepático em modelo murino, verifica-se uma ativação precoce de células de Kupffer expostas ao ambiente inflamatório, mas não diretamente parasitadas, desempenhando um papel crucial na resposta imune inicial, através da secreção de citocinas e quimiocinas capazes de recrutar células, tais como monócitos, neutrófilos e células NKT (Cervia et al., 1993, Cotterell et al., 1999, Svensson et al., 2005 Beattie et al., 2013). Aproximadamente uma semana após a infecção, linfócitos T são recrutados para o granuloma, tornando-se a população predominante (Mcelrath et al., 1988).

A ativação de linfócitos T no fígado é bastante limitada, sendo que a população que existe no compartimento hepático tende a ser primada previamente no baço, migrando em seguida para o fígado. Provavelmente, isto deve-se à baixa morte parasitária no fígado nas 24-48h de

infecção, o que limita a quantidade de antígeno disponível para a ativação dos linfócitos T (Cotterell et al., 1999, Engwerda & Kaye, 2000). Apesar disso, já foi também demonstrado que linfócitos T podem ser ativados no compartimento hepático contribuindo para a imunidade neste órgão (Bunn et al., 2014).

Várias citocinas desenvolvem um papel importante na formação do granuloma e na destruição dos parasitos no fígado. Entre elas, destaca-se a IL-12, produzida principalmente por células de Kupffer ativadas, que é capaz de induzir a produção de IFN- γ por células linfoides associadas ao granuloma, maximizando assim a morte parasitária (Stanley & Engwerda, 2007). A citocina considerada mais importante para a formação do granuloma e o controle da infecção no fígado é o TNF- α . Na ausência desta citocina não é observada a formação de granulomas, levando a um crescimento exponencial do parasitismo nas primeiras semanas, sendo que entre a 6^a e 8^a semana da infecção é desenvolvida uma atividade inflamatória intensa e descontrolada, levando à morte por necrose hepática fulminante (Murray et al., 2000). De um modo geral, em modelo murino, o granuloma hepático se torna totalmente maduro 2-4 semanas após a infecção e com 8 semanas, existe já um declínio muito acentuado da carga parasitária (Murray et al., 1987, Stanley & Engwerda, 2007).

Em modelo canino foi ainda demonstrado que cães assintomáticos apresentam níveis mais elevados de TGF- β , IL-10, TNF- α , IFN- γ e iNOS no fígado, em comparação com cães sintomáticos (Corrêa et al., 2007, Maia & Campino, 2012). Foi observado ainda que cães naturalmente infectados por *L. infantum* e sintomáticos apresentam uma clara incapacidade na expressão de quimiocinas e seus receptores no compartimento hepático, comparativamente aos animais assintomáticos, resultando assim numa deficiente resposta imune contra a LVC (Nascimento et al., 2013).

A avaliação imunopatológica do compartimento hepático é extremamente importante para que se entenda o curso da infecção na LVC. Em relação à histopatologia, verifica-se a existência de um infiltrado inflamatório portal e capsular caracterizado por intensa participação de células de Kupffer, com a característica presença de granulomas intralobulares nos diferentes grupos clínicos. CS demonstram uma carga parasitária mais elevada e alterações inflamatórias estruturais mais intensas em comparação com cães assintomáticos, encontrando-se estes fatores intimamente relacionados. Além disso, também é observado que estas alterações histológicas estão associadas a alterações nos parâmetros bioquímicos relacionados com a função hepática, principalmente os níveis séricos de globulina (Giunchetti et al., 2008; Reis et al., 2009).

A existência de hepatite crônica granulomatosa já foi documentada em casos de LVC, tanto na infecção natural, como experimental. Esta alteração caracteriza-se pelo aparecimento

de um núcleo histiocítico envolvido por uma camada de linfócitos e células plasmáticas, representando o granuloma imaturo da fase inicial da infecção. Esta estrutura caracteriza-se pelo seu aspecto desarticulado, sem a presença de células gigantes multinucleadas, nem formações colágenas (Gutierrez et al., 1984, Gonzalez et al., 1988, Rallis et al., 2005). Na LVC experimental a formação de granulomas começa durante as primeiras quatro semanas da infecção, atinge um pico máximo em número e maturidade após 4 meses, período a partir do qual estas estruturas começam a se resolver (Gutierrez et al., 1984). CA apresentam um maior número de granulomas do que CS, sendo que o parasitismo decresce à medida que o tamanho médio dos granulomas aumenta (Melo et al., 2009).

1.5 Leishmaniose visceral: mediadores microbicidas dos macrófagos

O macrófago não é apenas a célula alvo para a infecção por *L. infantum*, estando também na linha da frente na destruição das formas amastigotas do parasito (Haidaris & Bonventre, 1981, Liew et al., 1990). São células dotadas de atividade microbicida à qual os parasitos ativamente tentam escapar. Um dos mediadores microbicidas à disposição destas células é a produção de óxido nítrico (NO), molécula extremamente instável que apresenta uma meia vida de 3 a 15 segundos, desempenhando um importante papel num grande número de funções biológicas, incluindo agregação plaquetária, neurotransmissão e citotoxicidade (Liew et al., 1990, Fang, 1997, Wink et al., 2011). A produção de NO, como mecanismo efetor do macrófago é conhecida desde a década de oitenta (Hibbs et al., 1988)

A destruição das formas amastigotas ocorre fundamentalmente através de um aumento na expressão da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) após ativação do macrófago por citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ e TNF- α . Esta enzima catalisa uma reação entre L-arginina e oxigênio molecular com o complexo enzimático NADPH oxidase e tetrahydrobiopterina como cofatores, culminando na produção de NO, que por sua vez é capaz de eliminar as formas amastigotas do parasito (Liew et al., 1990, 1991).

Estudos tem demonstrado que macrófagos peritoneais de camundongos *knock out* para iNOS produziram quantidades significativamente inferiores de NO após estimulação com LPS e IFN- γ em comparação com os camundongos heterozigóticos, manifestando ainda uma incapacidade de eliminação das formas intracelulares de *L. major*. Isto aconteceu apesar dos camundongos mutantes terem sido capazes de desenvolver uma resposta Th1 intensa, produzindo mais IFN- γ e menos IL-4 do que o outro grupo, comprovando assim a importância do NO para a eliminação dos parasitos (Wei et al., 1999). A forma amastigota de *Leishmania major* apresenta ainda a capacidade de suprimir a ativação macrofágica mediada por IFN- γ ,

provocando um aumento na atividade das fosfatases macrofágicas (Forget et al., 2001). Além disso, é capaz de inibir a síntese de NO e indiretamente bloquear o desenvolvimento de células Th1, através da inibição da produção de IL-12 por macrófagos infectados (Olivier et al. 2005). Por outro lado, as formas promastigotas de *L. infantum* apresentam mecanismos únicos para se protegerem contra a destruição mediada por oxidantes, tais como uma camada glicolipídica de superfície denominada lipofosfoglicano, moléculas antioxidantes, como superóxido dismutase, peroxidoxinas e tripanotona (Paramchuk et al., 1997; Levick et al., 1998; Oza et al., 2005).

Foi demonstrado que macrófagos caninos da linhagem DH82 ativados produzem uma quantidade menor de NO em comparação aos macrófagos murinos, no entanto esta produção de NO está diretamente relacionada com aumento da capacidade leishmanicida (Pinelli et al., 2000). Estudos utilizando macrófagos derivados de monócitos circulantes de cães, que passaram por quimioterapia bem sucedida, demonstraram que estas células apresentaram uma maior capacidade leishmanicida, correlacionada com aumento na expressão da enzima iNOS (Vouldoukis et al., 1996).

Em relação ao modelo canino, já foi demonstrado que o co-cultivo de macrófagos infectados com linfócitos autólogos, derivado de cães imunizados com antígeno solúvel de *L. infantum* (SLA), resultou na morte apoptótica das formas amastigotas intracelulares mediada por NO (Holzmuller et al., 2005). Adicionalmente, experimentos *in vitro* demonstraram que macrófagos de cães infectados com *L. infantum* e ativados com IFN- γ recombinante humano, apresentaram uma maior expressão de iNOS e foram capazes de controlar o parasitismo (Sisto et al., 2001). Também já foi demonstrado que uma maior expressão de iNOS em macrófagos está relacionada com menor carga parasitária na pele, linfonodo e fígado de cães naturalmente infectados com *L. infantum* (Zafra et al., 2008).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são um grupo de moléculas altamente reativas capazes de auxiliar na destruição de parasitos intracelulares (Thannickal & Fanburg, 2000; Wink et al., 2011). Três importantes oxidantes produzidos por macrófagos foram identificados como críticos no controle da infecção por *Leishmania*, tais como o íon superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH) que são produzidos como parte do estresse oxidativo de macrófagos humanos e murinos em resposta à fagocitose (Channon et al., 1984). Estas moléculas podem ser geradas na mitocôndria como produtos da cadeia respiratória e também participar em vários processos biológicos, tais como biossíntese hormonal, sinalização celular e destruição de patógenos intracelulares, induzidos por IFN- γ ou receptores do tipo Toll (Nüsse et al., 2011; Roma et al., 2016). Numa primeira fase ocorre uma resposta oxidativa estimulada pela fagocitose, sendo que numa segunda fase o macrófago quiescente

pode ser ativado para potencialmente matar o parasito intracelular (Channon et al., 1984).

Há poucos estudos em relação ao papel de ROS na infecção *in vivo* causada por *Leishmania*, visto que acredita-se que o NO é a principal molécula efetora responsável pela destruição das formas parasitárias (Green et al., 1990). Estudos *in vitro* demonstraram um papel irrelevante de ROS na destruição de parasitos infectados com *L. major* e *L. guyanensis*, enquanto que *in vivo* esta molécula foi capaz de controlar o parasitismo em camundongo após infecção com *L. major* (Assreuy et al., 1994; Blos et al., 2003; Sousa-Franco et al., 2006). Já na infecção *in vivo* de camundongos com *L. donovani*, a liberação de ROS foi apenas importante para o controle de curto prazo da infecção (Murray & Nathan, 1999). Parasitos do gênero *Leishmania* são capazes de inibir a produção de ROS em macrófagos caninos, sendo que o aumento de ROS é mais decorrente da inflamação do que da presença do parasito intracelular (Paltrinieri et al., 2010).

Além destas duas moléculas que medeiam a atividade microbicida dos macrófagos contra patógenos intracelulares, temos ainda o peroxinitrito. Esta molécula, formada pela interação entre os radicais livres NO^\cdot e O_2^\cdot (Blough & Zafiriou, 1985), já demonstrou ser um agente citotóxico potente à disposição do macrófago na resposta a patógenos intracelulares (Linares et al., 2001, Alvarez et al., 2011, Bose et al., 2012).

Apesar da informação escassa na literatura sobre a real importância deste radical livre para a eliminação de formas amastigotas das várias espécies de *Leishmania*, sabe-se já que o peroxinitrito não se apresenta como fundamental para a destruição de amastigotas de *L. major*, no entanto, ele demonstrou ser de importância crítica na eliminação de amastigotas de *L. amazonensis in vitro*, sendo a sua ação mais eficiente que a do NO (Linares et al., 2001, Horta et al., 2012, Assreuy et al., 1994).

Considerando a importância do cão como reservatório e modelo experimental, assim como as grandes alterações macro e microscópicas no baço e fígado decorrentes do intenso parasitismo observado nestes órgãos na LVC, é importante esclarecer de que forma células fundamentais na resposta a infecções por patógenos intracelulares, como os macrófagos e linfócitos T contribuem para o estabelecimento de uma resposta imune associada à resistência e susceptibilidade nestes órgãos. O desconhecimento existente sobre qual o papel de citocinas pró-inflamatórias e imunomoduladoras, assim como da produção de ROS e NO por macrófagos esplênicos e hepáticos, no nível de parasitismo observado nestes órgãos e na severidade clínica da doença, tornam premente o desenvolvimento de estudos que avaliem a resposta imune hepatoesplênica após infecção natural canina por *L. infantum*. Além disso, as poucas opções existentes para o tratamento e vacinação de cães infectados, evidenciam a importância do

desenvolvimento de novas drogas e vacinas para a prevenção e terapia da doença. Desta forma, é essencial o desenvolvimento de metodologias *in vitro* capazes de mimetizar de forma tão fidedigna e pouco invasiva quanto possível os efeitos destas intervenções em cães infectados por *L. infantum*, no contexto de ensaios clínicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar e correlacionar parâmetros parasitológicos e imunológicos no baço, fígado e em células derivadas de leucócitos circulantes, de forma a entender a sua importância para o estabelecimento de uma resposta imune associada a uma infecção assintomática ou sintomática, em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a presença de alterações hematológicas e bioquímicas, em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, assintomáticos ou sintomáticos;
- Avaliar a carga parasitária, o grau de esplenomegalia, a produção de IFN- γ e IL-4 por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, a expressão de citocinas associadas com a resistência e susceptibilidade, a expressão de iNOS e a produção de NO e ROS por macrófagos no baço e fígado de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, assintomáticos ou sintomáticos;
- Avaliar a produção intracelular de IFN- γ e IL-4 em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, a produção de NO e ROS por macrófagos e qual o impacto destes fatores na taxa de infecção, em contexto de co-cultivo envolvendo macrófagos infectados derivados de monócitos e linfócitos T autólogos de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*;
- Buscar possíveis correlações entre os parâmetros parasitológicos e imunológicos estudados, dentro dos compartimentos hepático e esplênico, assim como no contexto de co-cultivo celular de leucócitos circulantes, em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*;
- Buscar possíveis correlações entre as metodologias *ex vivo* e *in vitro*, envolvendo os parâmetros parasitológicos e imunológicos estudados, em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

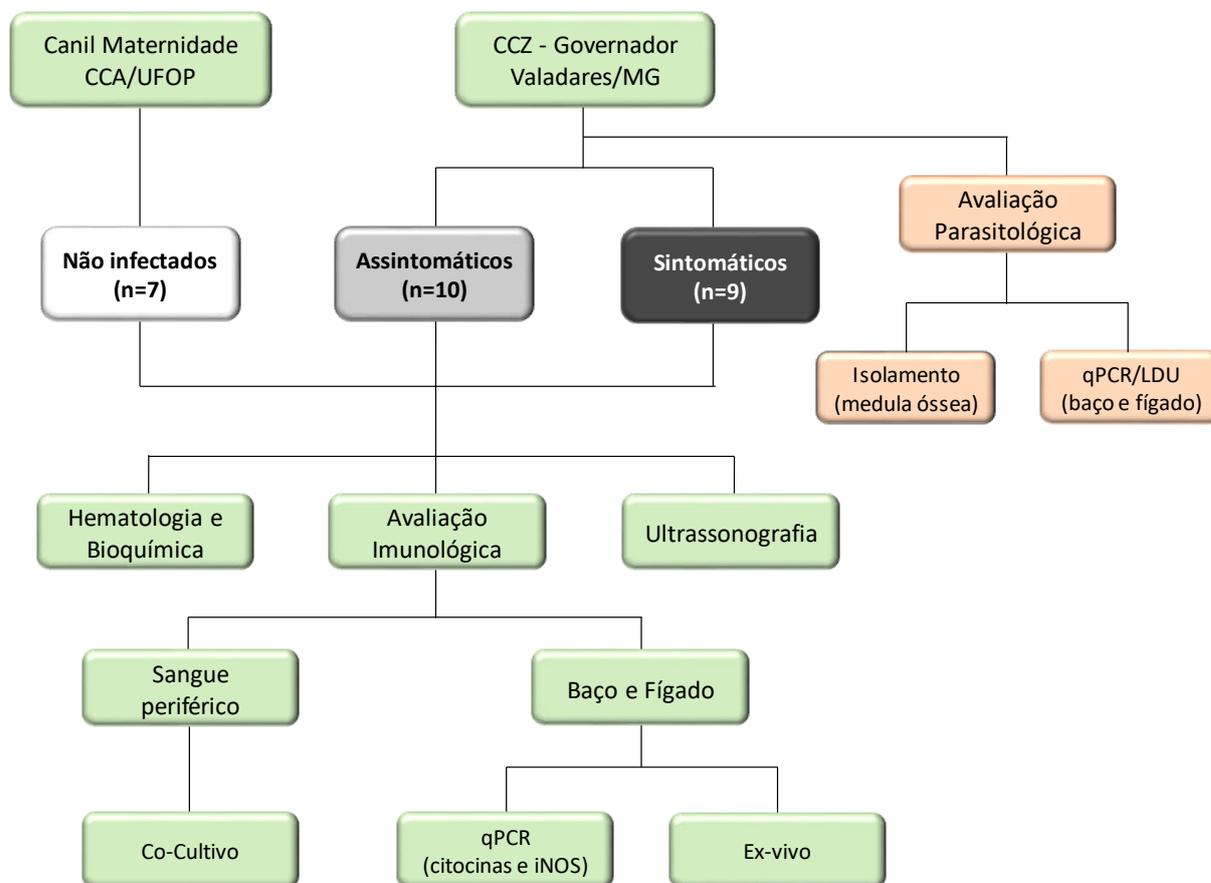
Nesse trabalho foram utilizados 19 cães naturalmente infectados por *L. infantum* provenientes de Governador Valadares (Minas Gerais, Brasil), área endêmica para LV e 7 cães não infectados provenientes de matrizes reprodutoras do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA/UFOP). Esses animais foram divididos em três grupos: grupo CNI, composto por 7 cães não infectados, grupo CA, incluindo 10 cães assintomáticos e grupo CS, com 9 cães sintomáticos. Os cães dos grupos infectados (CA e CS) apresentaram resultados sorológicos positivos no teste rápido (DPP[®]) e imunoenzimático (ELISA[®]) ambos produzidos pela Biomanguinhos, Fiocruz/RJ, por outro lado todos os cães do grupo CNI apresentaram resultado sorológico negativo em ambos os testes. A infecção foi confirmada por isolamento de promastigotas de *L. infantum* em meio de cultura (NNN/LIT) do aspirado de medula óssea e posterior realização de PCR RFLP para confirmação da espécie. Para avaliação da carga parasitária esplênica e hepática destes animais, foi realizada uma avaliação por qPCR e a contagem de formas amastigotas, por LDU (*Leishman donovan units*).

Nos três grupos experimentais foi realizado ainda um exame ultrassonográfico, para aferição da presença e grau de esplenomegalia. Todos os cães foram submetidos também a uma avaliação hematológica, incluindo eritrograma e leucograma, e por uma avaliação bioquímica, na qual foi realizada a aferição da função renal, hepática e do balanço de proteínas séricas.

Posteriormente, foi realizada uma avaliação imunológica *ex-vivo* no compartimento esplênico e hepático, sendo avaliado o percentual de linfócitos totais (CD3⁺), linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺, a produção intracelular de IFN- γ e IL-4 nestas células, a expressão de RNAm de citocinas (IL-12, IFN- γ , IL-10, IL-4 e TGF- β) e iNOS, assim como, a produção intracelular de NO e ROS em macrófagos do baço e fígado.

Foi realizada ainda, uma avaliação imunológica *in vitro*, utilizando sistemas de cocultivo de linfócitos T CD4⁺ e/ou linfócitos T CD8⁺ com macrófagos derivados de monócitos circulantes infectados com *L. infantum* e posterior avaliação do índice de infecção dos macrófagos, da expressão intracelular de IFN- γ e IL-4 nas subpopulações de linfócitos T e da expressão de NO e ROS nestes macrófagos, nas diferentes formas clínicas.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos preconizados pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), tendo sido aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CETEA-UFOP), conforme o protocolo nº 2015/33 em 23/06/2016 (Anexo 1). O delineamento experimental deste trabalho encontra-se explicitado no Fluxograma 1.



Fluxograma 1: Delineamento experimental.

3.2 Manejo dos animais

Este trabalho contou com um convênio de cooperação técnico científica entre o Laboratório de Imunopatologia (NUPEB/UFOP) e a Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura Municipal de Governador Valadares, Minas Gerais, representada pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ/GV).

No momento de recolhimento dos cães naturalmente infectados por *L. infantum* pelos agentes do CCZ/GV para posterior eutanásia, seguindo a conduta proposta pelo MAPA (Portaria Interministerial - Ministérios da Saúde e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Nº 1.426, de 11 de julho de 2008) o veterinário responsável pelo projeto, João Filipe Pereira Vieira, solicitou ao proprietário do animal a doação do mesmo para pesquisa científica. É importante ressaltar que todos os animais infectados utilizados no estudo eram domésticos e foram doados por seus donos. Após esclarecimentos de todas as dúvidas referentes ao processo de adoção e posterior assinatura do termo de consentimento livre esclarecido pelos

proprietários (Anexo 2), esses animais receberam uma identificação numérica para controle interno do CCZ/GV, que foi a mesma adotada para esse animal até o final do experimento. Antes do transporte, os cães receberam anti-helmíntico oral de largo espectro (Helfine[®], Agener União, Brasil) e imunização contra raiva (Rabisin[®], Merial, Brasil), além de um tratamento específico empregando medicamentos anti-ectoparasitários a base de fipronil (Frontline Top Spot[®], Merial, Brasil).

De forma prévia à alocação dos cães no Canil de Experimentação em Testes de Drogas e Vacinas para Leishmaniose, no Centro de Ciência Animal, da Universidade Federal de Ouro Preto (CETDVL/CCA/UFOP), foi realizado um "vazio sanitário", que consistiu numa restrição à presença de qualquer animal nas baias por período mínimo de 30 dias, mais o tempo necessário para a realização dos procedimentos de desinfecção das instalações, realizada com solução de hipoclorito de sódio a 1%. Vinte e quatro horas antes da entrada dos animais no recinto, as paredes internas e externas das baias, incluindo as telas protetoras, foram borrifadas com inseticida de poder residual a base de deltametrina (K-Otrine CE25[®], Bayer Cropscience Ltda, Brasil). O controle de insetos durante a permanência dos animais no canil foi realizado também pela aspersão trimestral com deltametrina (25 mg/m²) nas paredes, no teto e nas telas interna e externamente.

O canil em causa possui baias coletivas com áreas cobertas e abertas, favorecendo a incidência de luz solar, ventilação adequada e cobertura com tela de aço inox em toda sua extensão, para impedir o possível contato entre os animais infectados e o hospedeiro invertebrado *Lutzomia spp.* Os animais foram então distribuídos, respeitando a lotação máxima por baia, de forma a atender as necessidades fisiológicas e comportamentais (micção e defecação, manutenção da temperatura corporal, movimentação e ajustes de postura), gênero, além da interação social co-específica e desenvolvimento de hierarquias entre eles.

A limpeza das baias, além da alimentação dos animais, foi sempre realizada por técnicos do CCA/UFOP, paramentados com equipamentos de proteção individual (EPI's) e devidamente treinados para tais tarefas. Diariamente, foram realizadas duas vistorias por integrantes do projeto, os quais realizavam atividades lúdicas com os cães, afim de diminuir o estresse dos mesmos. Sempre que necessário (devido a brigas, ferimentos e administração da medicação), a frequência de vistorias diárias foi maior. A dieta durante todo o período experimental foi baseada em ração comercial balanceada e água potável *ad libitum*.

Posterior à chegada ao CCA/UFOP, cada animal foi fotografado e suas características fenotípicas, como tipo e coloração do pelo, marcas naturais e gênero, foram anotados

juntamente com a identificação (Anexo 3). Além disso, os cães foram submetidos à punção aspirativa de medula óssea para o isolamento e confirmação da infecção por *L. infantum*.

Findos estes procedimentos iniciais, os cães foram submetidos a um período de quarentena, sendo posteriormente realizadas as atividades descritas abaixo.

3.3 Avaliação clínica

A avaliação clínica dos animais foi realizada antes de quaisquer procedimentos experimentais, através de um exame clínico executado pelo veterinário responsável pelo projeto. Os animais foram divididos, em cães assintomáticos (CA), sem a presença de sinais clínicos característicos de LV e cães sintomáticos (CS), com a presença de sinais clínicos característicos da doença, tais como, febre, linfadenopatia severa, anorexia, alopecia, lesões de pele e oculares, epistaxes, poliartrite e diarreia (Mancianti et al. 1988, de Carvalho et al. 2018). A discriminação dos sinais clínicos dos cães do grupo CS encontra-se no Anexo 4 (Quadro 10).

3.4 Coleta de material biológico

3.4.1 Obtenção de amostras de sangue periférico para hemograma, avaliações bioquímicas e co-cultivo celular

Amostras de sangue periférico foram coletadas em seringas descartáveis estéreis de 20 mL (BD Plastipak[®], Becton Dickison and Company, EUA), mediante punção da veia jugular ou radial. Em seguida, foram transferidos 5 mL de sangue para um tubo contendo EDTA (na proporção de 1mg/mL), para realização do hemograma completo, enquanto 10 mL foram transferidos para dois tubos sem anticoagulante, destinados à realização das dosagens bioquímicas. Os dois tubos sem anticoagulante foram imediatamente centrifugados a 450 x g por 10 minutos para obtenção das amostras de soro, que foram aliquotadas e encaminhadas para realização das provas bioquímicas. Foram ainda coletados 40mL de sangue, para a realização de co-cultivo celular, em seringas de 20mL previamente rinsadas com heparina (Heparin[®] 5.000 UI/mL, Cristália, Brasil).

3.4.2 Obtenção de amostras de baço e fígado

A coleta de amostras de baço e fígado foi realizada após a eutanásia, no momento da necropsia dos cães. A eutanásia dos cães infectados ocorreu 60 dias após o final da quarentena. Antes da eutanásia, foi realizada uma pré-anestesia com cloridrato de ketamina (10% via

endovenosa, 10mg/kg - Ketamina Agener[®], Agener União, Brasil) e cloridrato de xilazina (2% via endovenosa, 1mg/kg - Calmium[®], Agener União, Brasil), seguida de anestesia geral com Tiopental 2,5% (via endovenosa, 25mg/Kg - Thiopentax, Cristália, Brasil). Finalmente, após a confirmação da ausência de estímulos e resistência à dor, foi realizado o procedimento de eutanásia, utilizando cloreto de potássio 10%, por via endovenosa. Após a confirmação do óbito, os animais foram submetidos ao exame necroscópico, com avaliação macroscópica, seguida de retirada de fragmentos de baço e fígado recortados em tamanho aproximado de 1 cm², embalados em papel alumínio e rapidamente acondicionados em nitrogênio líquido para avaliação da carga parasitária (qPCR) e expressão de RNAm de citocinas. Foram ainda coletados fragmentos de cada um dos órgãos para a realização da caracterização fenotípica celular por citometria de fluxo, que, após a lavagem em PBS, foram armazenados em RPMI 1640 (Sigma Co., EUA) até o início do protocolo experimental.

3.5 Avaliação parasitológica

3.5.1 Punções aspirativas de medula óssea e isolamento de formas promastigotas de *Leishmania infantum* em mielocultura

A punção de medula óssea na região do esterno foi realizada, utilizando agulha 18G (1,25mm x 38mm) acoplada em uma seringa de 20 mL (BD Plastipak[®], Becton Dickison and Company, EUA). De cada animal foi coletado aproximadamente 0,25 mL do aspirado medular, posteriormente semeado em tubos contendo 3 mL do meio de cultura NNN (Novy, McNeal e Nicolle), enriquecido com meio LIT (*Liver infusion tryptose*) para tentativa de isolamento do parasito, a fim de confirmar a infecção por *L. infantum*. Esse procedimento foi realizado próximo ao bico de Bunsen para evitar contaminação, sendo utilizados três tubos previamente identificados para cada animal. Os tubos foram armazenados em estufa biológica refrigerada BOD (Fanem, Brasil), à temperatura de 23°C ± 1°C por 7 dias. Após este período, as culturas foram avaliadas por microscopia óptica a fim de se identificar a presença de formas promastigotas do parasito. Finda a análise das lâminas, foi retirado 1 mL de meio de cultura de cada tubo e repassado para um novo tubo contendo 3 mL de meio de cultura novo. Após mais 7 dias foi realizada nova avaliação. Estas culturas foram expandidas em meio de cultura NNN/LIT e posteriormente foram criopreservadas. Além disso, massas secas de promastigotas foram obtidas de 10 mL das culturas de cada isolado e armazenadas em freezer -20 °C, para posterior extração do DNA e realização da PCR RFLP, de forma a confirmar a especificidade da infecção por *L. infantum*.

3.5.2 Análise molecular para quantificação da carga parasitária no baço e fígado pela técnica de PCR em tempo real

3.5.2.1 Extração de DNA da massa de promastigotas para curva padrão

Para extração do DNA genômico dos parasitos, foi utilizado o método CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio), seguindo o seguinte procedimento: 1×10^8 parasitos (*L. infantum* – cepa MOM/BR/2008/OP46) estocados em tubos de 1,5 ml (Eppendorf, Eppendorf AG, Alemanha) foram retirados do freezer -80°C e, após o descongelamento, foram ressuspensos em 500 μL solução de lise (SDS 1%, 5mM EDTA, 400mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 8,0) e incubados por uma hora em banho seco a 37°C . Pela parede do tubo, foram adicionados 20 μL de Proteinase K (20mg/mL - Sigma Co., EUA), seguido de homogeneização e incubação em banho seco a 55°C *overnight*. Após esse período foram adicionados 100 μL de NaCl 5M, seguido de incubação por 10 minutos à 65°C , após a qual foram adicionados 50 μL de solução CTAB 10% (v/v). As amostras foram mantidas por 20 minutos a 65°C e posteriormente foram adicionados 400 μL de clorofórmio (Sigma Co., EUA) sob agitação em vortex, seguido de centrifugação a 12000 x g em microcentrífuga (Eppendorf AG, Alemanha), por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para novo tubo, ao qual foram adicionados 400 μL de isopropanol (Merck, Darmstad, Alemanha), sendo incubado por cerca de uma hora no freezer. Após precipitação do DNA centrifugou-se o tubo novamente por 10 minutos a 12000 x g descartando o sobrenadante. Em seguida, foi efetuada a lavagem do pellet com etanol 70% (Merck, Darmstad, Alemanha) gelado, homogeneização suave por inversão do tubo durante um minuto e centrifugação por 5 minutos a 12000 x g com posterior descarte do sobrenadante. O precipitado remanescente foi homogeneizado em 100 μL de água destilada autoclavada para hidratação do DNA. Após um período de aproximadamente 24 horas, 2 μL foram utilizados para estimar a concentração de DNA e o grau de pureza nas absorvâncias de 230/280 nm e 260/280 nm em nanoespectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA). O restante foi estocado em freezer a -20°C até a sua utilização na construção da curva padrão.

3.5.2.2 Construção da curva padrão para a PCR em tempo real

Após contagem de 1×10^8 parasitos utilizando câmara de Neubauer e subsequente extração de DNA da massa de promastigotas por CTAB, foi construída a curva padrão para posterior amplificação por qPCR. Após eluição do pellet de DNA extraído em 100 μL de água destilada autoclavada, a concentração foi de 1×10^6 parasitos/ μL , assumindo-se que a extração

apresentou uma eficiência de aproximadamente 100%. A concentração e a pureza do DNA extraído foram mensuradas em nanoespectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA) nos comprimentos de onda de 260/280 e 260/230 nm. A partir daí, foram feitas diluições de forma seriada de 10x, com obtenção de sete pontos na curva de 1×10^6 a 1 parasitos.

3.5.2.3 Extração de DNA de tecidos

Para extrações de DNA das amostras de baço e fígado foi utilizado o kit WizardTM Genomic DNA Purification Kit (Promega[®], EUA) conforme manual do fabricante com algumas modificações. Em tubos de 1,5 mL (Eppendorf[®], Eppendorf AG, Alemanha) contendo as amostras de interesse, foram adicionados 500 μ L de solução de lise nuclear (SLN), seguida por incubação em gelo por 2 minutos. Posteriormente, foram adicionados pela parede dos tubos, 20 μ L de proteinase K (20mg/mL - Sigma Co.[®], EUA) seguido de homogeneização e incubação overnight em banho seco a 55°C. Após esse período, os tubos foram homogeneizados e adicionados 3 μ L de RNase, seguida de outra incubação em banho seco, a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, 200 μ L de solução de precipitação proteica foi adicionado aos tubos, que foram então homogeneizados em vortex, incubados em gelo por 5 minutos e posteriormente centrifugados a 16000 x g (Microcentrífuga Eppendorf[®], EUA) por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 600 μ L de isopropanol (Merck[®], Alemanha), com posterior homogeneização dos tubos por inversão (10 vezes) e centrifugação a 16000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado ao pellet residual 200 μ L de etanol 70% (Merck[®], Alemanha), seguido de homogeneização por inversão dos tubos (10 vezes). Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 16000 x g por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados abertos à temperatura ambiente para a evaporação do etanol. Depois de secos, foi realizada a ressuspensão do DNA remanescente com adição de 100 μ L de solução de hidratação. Após hidratação por 24 horas, 2 μ L da solução contendo o DNA extraído foram utilizados para estimar a concentração do mesmo e o grau de pureza nas absorvâncias de 230/280 nm e 260/280 nm em nanoespectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA). O restante foi estocado em freezer a -20°C até a sua utilização.

3.5.2.4 PCR em tempo real

As reações de qPCR foram realizadas em placas de 96 poços - MicroAmp[®]Optical 96 - Well Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystems by Life Technologies[®], EUA), cobertas com adesivos ópticos - Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems by Life Technologies, EUA) e processadas em termociclador ABI Prism 7500 Sequence Detection

System (Applied Biosystems[®], EUA). Os controles positivos de cada placa foram as amostras diluídas de *L. infantum* utilizadas na curva padrão. Como controle negativo foi usado água livre de nucleases, ao invés de DNA. A reação de cada amostra foi realizada em duplicata, com as seguintes condições: uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Ao final das reações a temperatura da máquina foi elevada gradualmente até que todas as fitas duplas de material amplificado se dissociassem, para a verificação de possível contaminação dos DNA's das amostras em estudo com DNA genômico ou dímeros dos iniciadores. As reações foram realizadas utilizando-se TaqMan[®] Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, EUA); DNA (10 ng/μL); iniciadores (1 μM) e água livre de nucleases em quantidade suficiente para um volume final de 10 μL por poço. Para a quantificação do número de moléculas de DNA de *Leishmania* nas amostras, inicialmente foi determinado para cada poço o número de ciclos em que a fluorescência cruzou uma linha limiar arbitrária, denominada threshold (Ct), calculada pelo programa 7500 Software v.2.0.1 for 7500 and 7500 Fast RealTime PCR Systems (Applied Biosystems, EUA). A quantidade de cópias de DNA em cada amostra foi determinada a partir de uma regressão linear usando os valores do Ct das amostras utilizadas na curva padrão, gerada com quantidades conhecidas das diluições prévias das massas de promastigotas de *L. infantum* desta curva. O procedimento descrito acima foi também realizado para a amplificação do gene de GAPDH de cão, que é expresso de forma constitutiva e por este motivo foi utilizado para verificar a integridade dos DNA's analisados. Para a amplificação do gene GAPDH, foram utilizados os iniciadores direto: 5' TTCCACGGCACAGTCAAG 3' e reverso: 5' ACTCAGCACCAGCATCAC 3', que amplificam um fragmento de 115pb (acesso no GenBank: AB038240). Para detecção e quantificação do parasito, foram utilizados primers que amplificam o gene de DNAPol *Leishmania spp.* Foram utilizados os iniciadores direto: 5' AGC GCC TCA CCA CGA TTG 3' e reverso: 5' AGC GGG CAC CGA AGA GA 3', que amplificam um fragmento de 57pb (acesso no GenBank: AF009147). Após a amplificação e obtenção do número de cópias de DNA de GAPDH de cada amostra, o menor valor obtido de Ct foi selecionado e os demais valores foram divididos por esse número. Os resultados desta razão constituíram os fatores de correção individual, que posteriormente foram multiplicados pelo número de cópias de DNA de *Leishmania* obtido para a respectiva amostra, determinando assim a carga parasitária. Para a análise dos resultados foram consideradas as reações com eficiência entre 90-100% e curva padrão com valores satisfatórios de coeficiente de linearidade ($r^2 = 0,95-0,999$). Os resultados foram expressos pelo número de amastigotas/mg de tecido (baço ou fígado).

3.5.3 Quantificação do parasitismo empregando a técnica de *Leishman Donovan Units* - LDU

Os esfregaços por aposição de baço e fígado foram confeccionados utilizando lâminas previamente limpas e desengorduradas, posteriormente fixadas em solução de álcool metílico e coradas por Panótico Rápido InstantProv (Newprov[®], Brasil). Estes esfregaços foram analisados utilizando-se microscopia óptica em objetiva de imersão (aumento de 100x com óleo de imersão). Desta forma, foi avaliada a carga parasitária pelo índice LDU (*Leishman Donovan Units*), no qual foi quantificado o número de amastigotas de *Leishmania* por 1000 células nucleadas do esfregaço (STAUBER, 1955 e modificado por REIS et al. 2006c).

3.6 Exame ultrassonográfico

Com o objetivo de avaliar a possível existência de esplenomegalia, foram realizados exames ultrassonográficos nos cães dos grupos CNI, CA e CS, através de aparelho de ultrassonografia (Medison Sonoace Pico Ultrasound MyColor 202). Para tal, os animais foram submetidos a um jejum alimentar de 12h, com disponibilidade apenas de água *ad libitum*. Previamente ao procedimento, foi realizada tricotomia do abdômen, desde o sétimo espaço intercostal até ao osso púbis e lateralmente até a região proximal dos processos transversos das vértebras. Seguidamente, os animais foram colocados em decúbito lateral direito, com variação em decúbito dorsal e a cabeça paralela ao aparelho de ultrassonografia com a região abdominal do lado direito do examinador. Para a realização dos exames, os animais foram sujeitos a leve contenção física. Uma camada de gel acústico, à base de água, foi usada para facilitar a visualização dos órgãos, atuando como meio de contato para transmissão do ultrassom e eliminando o ar entre o transdutor e a pele.

As imagens e dimensões esplênicas foram registradas no software de aquisição do ultrassom e em planilhas para posterior análise.

3.7 Avaliação do quadro hematológico e bioquímico

A avaliação do perfil hematológico foi realizada através do aparelho Auto Hematology Analyzer (Mindray BC-2800 Vet, Hamburgo, Alemanha), com análise global de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, plaquetas e leucócitos. O leucograma foi determinado pelo aparelho hematológico em número de leucócitos x 10³/mm³. A contagem diferencial de células foi realizada em esfregaços sanguíneos corados com Panótico Rápido e avaliada por microscopia

óptica em objetiva de imersão. Desta forma, foi estimado o número absoluto de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos, por meio da contagem de 100 leucócitos/lâmina.

As avaliações bioquímicas consistiram das seguintes análises: proteinograma, por dosagem de proteína total (g/dL); dosagem de albumina (g/dL); globulina (g/dL); razão albumina/globulina; prova de função renal por dosagem de ureia (mg/dL) e creatinina (mg/dL) e provas de função hepática, incluindo a dosagem das enzimas alanina amino transferase – ALT (U/L), aspartato amino transferase – AST (U/L), fosfatase alcalina – FA (U/L) e gama glutamil transferase – GGT (U/L). Para a avaliação desses parâmetros foi utilizado o Sistema Bioquímico Automático (CELM SBA-200, Brasil) e empregados *Kits* comerciais do Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil), seguindo o método descrito pelo fabricante.

3.8 Imunofenotipagem do compartimento hepático e esplênico por citometria de fluxo no contexto *ex vivo*

3.8.1 Obtenção da suspensão celular do compartimento esplênico

Após a coleta das amostras de baço (item 3.4.2), foi iniciado o processamento das mesmas. Estas amostras foram cortadas em pequenos fragmentos, utilizando bisturi e maceradas juntamente com cerca de 1mL de RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). O produto da maceração foi transferido para novos tubos de 50 mL de polipropileno, centrifugado a 400 x g, 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado, 30 mL de PBS com EDTA (2mM) foram adicionados, sendo a suspensão celular resultante, filtrada em malha de 100 µm, agregada a uma unidade filtrante.

O filtrado foi novamente centrifugado a 400 x g, 10 minutos a 4°C, ressuspendido em 30mL de PBS com EDTA, seguido de nova filtração em malha de 40µm, agregada a uma unidade filtrante e posterior centrifugação a 400 x g, 10 minutos a 4°C. Após descarte do sobrenadante e homogeneização do *pellet*, este foi ressuspendido em 10mL de cloreto de amônio, seguido de 5 minutos em agitação no vortex e outros 5 minutos de incubação a temperatura ambiente (TA).

Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 400 x G, 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 5mL de RPMI 1640 (10% SFB), seguido de contagem celular em câmara de Neubauer. O volume final foi ajustado com RPMI 1640 (10% SFB) de forma a conter 1×10^7 células/mL. Posteriormente, 100 µl de suspensão celular foram transferidos para tubos de poliestireno próprios para leitura em citometria de fluxo.

3.8.2 Obtenção da suspensão celular do compartimento hepático

Após a coleta das amostras de fígado (item 3.4.2), o processamento das mesmas foi realizado. Procedeu-se ao corte das amostras em pequenos fragmentos, utilizando bisturi e placa de petri estéril. Os cortes foram transferidos para o macerador juntamente com cerca de 1mL de RPMI 1640 (10% SFB). Em seguida, estes fragmentos foram macerados e o produto dessa maceração transferido para tubos de 50 mL de polipropileno. Este macerado foi centrifugado a 400 x g, 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado, o pellet ressuscitado em 30mL de PBS com EDTA, seguido de filtração utilizando uma malha de 100 µm, agregada a uma unidade filtrante.

A suspensão celular resultante da filtração foi novamente centrifugada a 400 x g, 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e a suspensão celular remanescente foi incubada na presença de uma solução de RPMI-1640 (10% SFB) e colagenase de *Clostridium histolyticum* (2.5mg/mL) (Sigma-Aldrich Co. LLC) durante 30 minutos em agitação a 37°C. Após a incubação, possíveis grumos foram desfeitos por homogeneização com ajuda de uma seringa de 1mL. A seguir, os procedimentos foram conduzidos de forma semelhante ao experimento em baço (item 3.8.1).

3.8.3 Imunofenotipagem para caracterização do perfil de linfócitos T no compartimento esplênico e hepático

Todos os anticorpos utilizados nesse estudo, assim como o seu clone e diluição encontram-se descritos no Quadro 4 (ver página 45).

Nos tubos referentes a avaliação do perfil linfocitário do compartimento hepático e esplênico foram acrescentados, ao abrigo da luz, 10µL dos anticorpos monoclonais anti-moléculas de superfície anti-CD3 FITC, anti-CD4 PE e anti-CD8 AF647 previamente diluídos.

Os tubos foram homogeneizados e incubados por 30 minutos a TA e ao abrigo da luz, sendo posteriormente centrifugados a 400 x g, por 10 minutos a 25°C. Em seguida foi adicionado 1 mL de solução de fixação contendo formaldeído (Facs lysing solution - Becton Dickison and Company, EUA), sob agitação em vortex, sendo os tubos incubados por 10 minutos a TA. Após a incubação, foram adicionados aos tubos 2 mL de PBS. Os tubos foram centrifugados a 400 x g, por 10 minutos a 25°C, o sobrenadante foi descartado e o conteúdo restante ressuscitado em 200 µL de PBS, para posterior leitura em citômetro de fluxo FACSCalibur.

3.8.4 Imunofenotipagem para caracterização do perfil de linfócitos produtores IL-4 e IFN- γ no compartimento esplênico e hepático

Nos tubos destinados à avaliação do perfil de linfócitos produtores de citocinas no compartimento hepático e esplênico, foram adicionados 20 μ L de brefeldina A (10 μ g/mL), com posterior incubação por mais 4 horas à 37°C em estufa incubadora com 5% de CO₂. Ao término da incubação, as culturas foram tratadas com EDTA (Sigma Co., EUA), concentração final de 2 mM, e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas com 2 mL de PBS-W e centrifugadas por 10 minutos a 400 x g, a 18°C. Em seguida, foram acrescentados, ao abrigo da luz, 10 μ L dos anticorpos monoclonais anti-moléculas de superfície anti-CD4 APC e anti-CD8 AF647, previamente diluídos. Os tubos foram homogeneizados e incubados por 30 minutos a TA e ao abrigo da luz, sendo posteriormente centrifugados a 400 x g, por 10 minutos a 4°C. Em seguida foi adicionado aos tubos, 1 mL de solução fixadora (Facs lysing solution - Becton Dickison and Company, EUA) sob agitação em vórtex. A seguir, os tubos foram incubados por 10 minutos à TA e centrifugados a 400 x g, por 10 minutos a 4°C, com o sobrenadante desprezado e o *pellet* homogeneizado em vortex até a ressuspensão total das células. Seguidamente, foram adicionados à suspensão, 2 mL de PBS acrescido de saponina (PBS-P) para a permeabilização das células seguindo-se incubação por 10 minutos a TA. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 400 x g, por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado, os tubos homogeneizados até a ressuspensão total das células e o *pellet* ressuspendido em 200 μ L de PBS. De forma consecutiva, aos tubos anteriormente marcados com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 foram adicionados 10 μ L de anticorpos anti-citocinas: anti-IFN- γ PE e anti-IL-4 PE, previamente diluídos, seguido de homogeneização e incubação por 30 minutos. Seguidamente, foram adicionados 2 mL de PBS em cada um dos tubos e estes foram centrifugados a 400 x g, por 10 minutos a 4°C. Finalmente, o sobrenadante foi descartado, homogeneizado em vortex e adicionados 200 μ L de PBS para posterior leitura em citômetro de fluxo FACSCalibur.

3.8.5 Imunofenotipagem para caracterização do perfil de macrófagos produtores de NO e ROS no compartimento esplênico e hepático

Para realizar a identificação intracelular da produção de NO e ROS, foram utilizados dois reagentes com capacidade de atravessar a membrana celular, reagir com estes radicais de

oxigênio e nitrogênio, formando moléculas fluorescentes passíveis de serem identificadas por citometria de fluxo.

O reagente 4',5'-Diaminofluoresceína diacetato penetra na célula por difusão, é hidrolisado por esterases intracelulares, produzindo assim a forma DAF2, que é incapaz de sair da célula por difusão. Esta molécula reage com o NO, formando uma triazolofluoresceína (DAF-2T). Este produto fluorescente pode ser detectado por citometria de fluxo utilizando um filtro de excitação de 492nm e um filtro de emissão de 515nm (Figura 1A).

De forma semelhante, o reagente 2'7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) é um corante não fluorescente, capaz de entrar na célula por difusão, sendo hidrolisado pela ação de esterases intracelulares formando a molécula DCFH, incapaz de sair da célula por difusão. A oxidação do DCFH por ROS intracelulares, provoca a transformação da molécula em 2'7'-diclorofluoresceína (DCF), que pode ser detectada por citometria de fluxo, no mesmo espectro de excitação e emissão que o DAF2-DA (Figura 1B).

Para a avaliação da produção de NO em macrófagos, foram adicionados 10µl de DAF2-DA (Sigma-Aldrich Co. LLC®) previamente diluído para 10µM e colocados na estufa de CO₂ a 37°C em incubação por 3 horas.

Nos tubos destinados à avaliação da produção de ROS em macrófagos, foram adicionados 10 µl de DCFH (Sigma-Aldrich Co. LLC®), previamente diluído para 0,1 mM, com posterior incubação por 30 minutos em estufa de CO₂ a 37°C.

Após incubação com ambos os reagentes, as células foram ressuspensas em 2mL de PBS e os tubos centrifugados a 400 x g, 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células incubadas por 30 minutos com 10µl de anticorpo anti-CD11bPE, previamente diluído. Seguidamente, as células foram ressuspensas em 2mL de PBS e os tubos centrifugados a 400 x g, 10 minutos a 4°C. Novamente, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 200µl de PBS, para posterior leitura no citômetro de fluxo FACSCalibur.

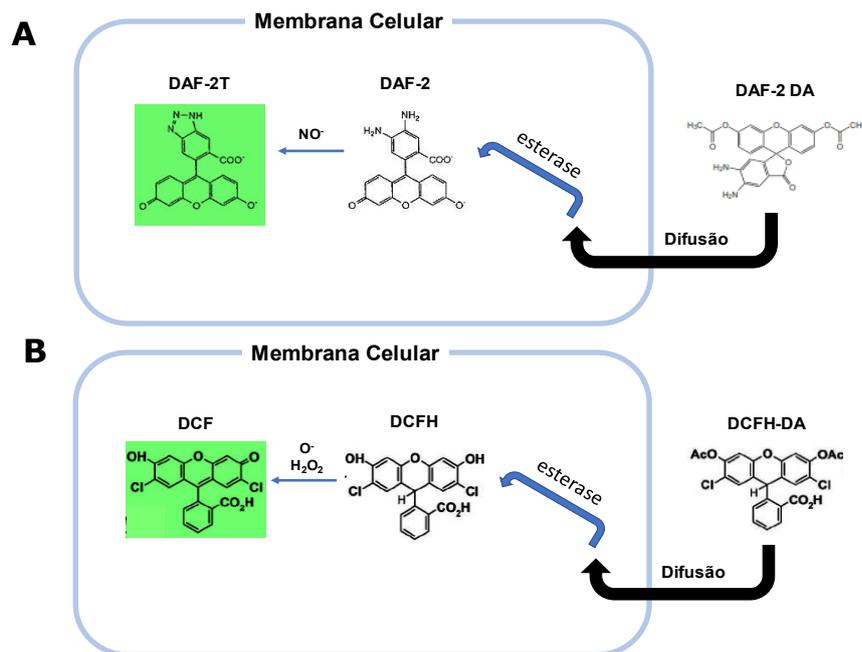


Figura 1: Representação do modo de ação dos reagentes 4',5'-Diaminofluoresceína diacetato (DAF-2 DA) e 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). **(A)** O reagente 4',5'-Diaminofluoresceína diacetato penetra na célula por difusão, é hidrolisado por esterases intracelulares, se transformando em DAF2, molécula incapaz de sair da célula por difusão. Esta molécula reage com o NO, formando uma triazolofluoresceína fluorescente (DAF-2T), detectável por citometria de fluxo. **(B)** O reagente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) entra na célula por difusão, sendo hidrolisado pela ação de esterases intracelulares formando a molécula DCFH, incapaz de sair da célula por difusão. A oxidação do DCFH por ROS intracelulares, transforma a molécula em 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), que pode ser detectada por citometria de fluxo.

3.9 Avaliação por qPCR da expressão de RNAm de iNOS e citocinas no baço e fígado de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*

3.9.1 Extração e purificação do RNA total das amostras de baço e fígado

Na etapa de extração do RNA total, foram utilizadas amostras de tecidos com 50mg. Aos tubos contendo os fragmentos de baço e fígado foram adicionados 1mL de TRIzol[®] Reagent (Invitrogen São Paulo, SP, Brasil), tendo as amostras sido maceradas utilizando um homogeneizador de tecidos. Todos os instrumentos utilizados no processo de maceração foram lavados com água tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC) e posteriormente limpos com gaze embebida com um removedor de nucleases RNaseAway (Invitrogen, São Paulo). Posteriormente, o homogeneizado de cada amostra foi transferido para um tubo “*ependorf*” de 1,5mL e mantido no gelo até que todas fossem maceradas. Seguidamente, as amostras foram retiradas do gelo e incubadas à temperatura de 21-23°C para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Foram então adicionados 0,2mL de clorofórmio (Sigma, St. Louis, MO, USA) para cada 1mL de TRIzol[®] aos tubos contendo o homogeneizado. Em

seguida, os tubos foram fechados e agitados vigorosamente por 15 segundos e incubados por cinco minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000 x g em centrífuga (Eppendorf® centrifuge 5810 R, NY, USA). A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,5mL, seguido da adição de volume equivalente de etanol 95% (v/v) (preparado com água tratada com DEPC) e homogeneização suave invertendo o tubo por três vezes para precipitação do RNA total. Para purificação do RNA total contido na amostra, utilizou-se o *kit* de extração de RNA total (SV total RNA Isolation System - Promega, Madison, WI, USA) com algumas adaptações descritas a seguir.

O RNA obtido como descrito acima, foi transferido para um “*spin basket*” acoplado a um tubo coletor de 2mL e centrifugado a 12000 x g por dois minutos em centrífuga. O líquido residual no tubo coletor foi descartado após as centrifugações. Foram então adicionados 600µL de solução de lavagem (*SV RNA Wash Solution*), seguido de centrifugação a 12000 x g por 2 minutos. As amostras de RNA foram tratadas com DNase para assegurar a ausência de contaminação por DNA genômico. Desta forma, foi preparado um *mix* contendo 40µL de “*yellow core buffer*”, 5,0µL MnCl₂ 0,09M e 5µL de DNase que foi aplicado sobre a membrana do *spin* e incubado por 25 minutos a temperatura de 21-25°C. Posteriormente, foram adicionados 200µL de “*SV DNase Stop Solution*” para inibição da atividade enzimática da DNase. A seguir, foi feita a centrifugação a 12000 x g por 2 minutos e o líquido contido no tubo coletor foi descartado. Foram adicionados 600µL de solução de lavagem (*SV RNA Wash Solution*) seguido de centrifugação a 12000 x g por dois minutos. Seguidamente, foram adicionados aos tubos 250µL de solução de lavagem (*SV RNA Wash Solution*), seguido de centrifugação a 14000 x g por 3 minutos. Posteriormente, o *spin* foi transferido para um tubo de eluição, 100µL de água livre de nucleases foram adicionados, seguido de centrifugação a 12000 x g por 2 minutos. As amostras foram armazenadas em - 80°C até o momento do uso.

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

Para a quantificação e avaliação do grau de pureza do RNA extraído as amostras foram dosadas utilizando o equipamento Nanovue (GE Healthcare Bio Sciences AB Sweden). Foram utilizados 2µL de RNA total e o grau de pureza em relação à presença de proteínas foi avaliado utilizando a relação dos valores de absorvância obtidos A₂₆₀/A_{280nm}. O grau de contaminação por outros compostos (como sais, polissacarídeos e compostos orgânicos como fenol) foi avaliado pela absorvância A₂₆₀/A_{230nm}. As amostras que apresentaram absorvância A₂₆₀/A_{280nm} maior ou igual a 2 foram consideradas com um grau de pureza satisfatório.

3.9.3 Integridade do RNA extraído

A separação eletroforética das amostras de RNA total foi realizada em gel de agarose em condições desnaturantes e específicas para RNA. Sendo assim, 0,6g de agarose foram dissolvidas em 40mL de água tratada com DEPC. A mistura foi aquecida com auxílio de um micro-ondas convencional. Após a agarose atingir uma temperatura de 45°C, foi adicionada uma segunda solução composta por 12,8mL de água tratada com DEPC, 6mL de tampão MOPS 10X e 1,2mL de formaldeído (Sigma, St. Louis, MO, USA). Após homogeneização, a solução foi vertida sobre o aparato de eletroforese com pente apropriado e aguardado a completa solidificação. Paralelamente, foi preparado o tampão de amostra contendo 93,75µL de formamida (Sigma, St. Louis, MO, USA), 13,75µL de formaldeído, 18,75µL de MOPS 10X, 21µL de água (tratada com DEPC), 0,25µL de azul de bromofenol (100mg/mL) e 0,25µL de brometo de etídio (Sigma, St. Louis, MO, USA). Foi utilizado 5µg das amostras de RNA para 10µL de tampão de amostra e incubado por cinco minutos a 65°C (desnaturação doRNA) seguido de banho de gelo por 3 minutos. Posteriormente, as amostras foram aplicadas ao gel e corridas a 90V em tampão MOPS 1X. As amostras consideradas adequadas para avaliação dos níveis de transcritos de mRNA foram as que apresentavam bandas íntegras referentes as subunidades do RNA ribossomal.

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

A primeira fita de cDNA foi sintetizada utilizando o *kit "High Capacity cDNA Reverse Transcription kit"* (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Para isso, adicionou-se em um tubo 1µg de RNA total presente em um volume final máximo de 10µL. Posteriormente, foram adicionados 10µL do mix de transcrição reversa (RT Buffer 10X, dNTP Mix (100mM) 25X, RT Random primers 10X, enzima Multiscribe, Rnase inhibitor e água livre de nucleases) em cada tubo de 0,2mL contendo o RNA. Além disso, foi adicionado um controle negativo contendo todos os reagentes, exceto a amostra, com o objetivo de se verificar possíveis contaminações dos reagentes. Subsequentemente, os tubos contendo as amostras foram colocados no termociclador (Veriti™ Thermal Cycler PE Applied Biosystems) nas seguintes condições: 1 ciclo de 10 minutos a 25°C, 1 ciclo de 120 minutos a 37°C, 1 ciclo de 15 segundos a 85°C e 1 ciclo de 5 minutos a 4°C, consecutivamente. Após o término, os tubos foram retirados do termociclador e armazenados a temperatura de -20°C até o momento da amplificação por PCR em tempo real.

3.9.5 Avaliação da curva de eficiência dos primers

Para avaliar a eficiência da reação de PCR com os diversos iniciadores utilizados neste estudo, foram construídas curvas padrão, utilizando diluições seriadas em uma amostra de baço e fígado. O ensaio foi realizado em duplicata e a concentração dos iniciadores foi de 2,5pmol/ μ L. Os iniciadores específicos para todos os alvos analisados apresentaram eficiência entre 95 a 100%.

3.9.6 Expressão de citocinas por qRT-PCR

O ensaio para avaliar a expressão gênica das citocinas (IFN- γ , TGF- β , IL-10, IL-12 e IL-4) e da enzima iNOS nas amostras de baço e fígado foi realizado utilizando os iniciadores (Quadro 1) na concentração de 2,5pmol, SYBRTM Green (Applied Biosystems, EUA) e cDNA diluído 5x em água livre de nucleases, perfazendo um volume final de 10 μ L de reação. O ensaio foi realizado em duplicata para todos os genes, com o gene normalizador presente na mesma placa que os genes avaliados. Os resultados foram expressos pelo método C_T comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), que consiste em uma quantificação relativa que utiliza fórmulas aritméticas para determinar as diferenças na expressão de um alvo de uma amostra, comparando com a sua expressão em uma amostra controle. Sendo assim, foi realizada uma normalização de expressão deste alvo para cada amplificação, ou seja, sua expressão foi subtraída pela expressão de um gene constitutivo, que é expresso de maneira semelhante em diferentes tecidos e em diferentes condições. Assim, para cada amostra alvo foram amplificados os genes das citocinas (IFN- γ , TGF- β , IL-10, IL-12 e IL-4), da enzima iNOS e o gene constitutivo (GAPDH), de forma a se obter os valores dos *Threshold Cycles* (C_T) correspondentes para realização dos cálculos e obtenção dos resultados. De forma a realizar uma análise com base nos valores do $\Delta\Delta C_T$ é necessário que as eficiências entre alvos (citocinas) e o gene endógeno sejam semelhantes. Assim, os cálculos para a determinação do $\Delta\Delta C_T$ foram realizados a partir do cálculo das diferenças na expressão gênica baseando-se apenas nas eficiências das amplificações e diferenças de C_T s do alvo na amostra e no controle.

Quadro 1 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores senso (forward: F), antisenso (reverse: R) utilizados nas qPCRs

Gene Alvo	Oligos e Sondas	Sequência (5' → 3')	Função
GAPDH	Fw	TTCCACGGCACAGTCAAG	Constitutivo
	Rv	ACTCAGCACCAGCATCAC	
IL-12	Fw	CAGCAGAGAGGGTCAGAGTGG	Citocina
	Rv	ACGACCTCGATGGGTAGGC	
IFN- γ	Fw	TCAACCCCTTCTCGCCACT	Citocina
	Rv	GCTGCCTACTTGGTCCCTGA	
IL-10	Fw	AGAACCACGACCCAGACATC	Citocina
	Rv	CCACCGCCTTGCTCTTATTC	
IL-4	Fw	CACCTCCCAACTGATTCCAA	Citocina
	Rv	CTCGCTGTGAGGATGTTCAA	
TGF- β	Fw	AGGATCTGGGCTGGAAGTG	Citocina
	Rv	CGGGTTGTGCTGGTTGTA	
iNOS	Fw	GCCCTGTGCCTCGGATAATC	Enzima
	Rv	CCACGGAAGAAGTTAAAGTTG	

3.10 Transfecção das promastigotas de *L. infantum* com o gene repórter GFP para o cultivo

3.10.1 Plasmídeo pIR1-SAT

O plasmídeo contendo o gene da proteína GFP (pIR1-SAT) foi gentilmente cedido pela Dra. Mary Wilson e transfectado seguindo o protocolo do Dr. Stephen M. Beverley, da Washington University, St. Louis (USA). Para a estratégia de seleção foi utilizado o gene NAT, que codifica a acetil transferase em pIR1-SAT e confere melhor resistência a nourseotricina em diversas espécies de *Leishmania*. Existem dois locais de expressão em pIR1-SAT, localizados nos sítios SmaI e Bg/II. Ambas são flanqueadas por regiões intergênicas de *Leishmania* fornecendo informação para *trans-splicing* e poliadenilação e ambos os locais produzem altos níveis de expressão. Foi selecionado o sítio de inserção usando SmaI que confere maior expressão em formas amastigotas. Durante o procedimento, o plasmídeo foi digerido com SwaI

para obter, de forma linear, o fragmento a ser incluído no genoma do parasito. A transfecção em *Leishmania infantum* e a seleção para expressão SAT produz parasitos onde a construção substitui uma cópia do gene SSU (*small subunit* RNA gene in rDNA locus– subunidade pequena do gene no locus do DNA ribossomal) e adquire o promotor RNA pol ribossomal, conduzindo à transcrição em níveis elevados. Para a construção plasmídica pIR1-SAT foi utilizada a concentração de 235 ng/mL de forma a fornecer plasmídeo suficiente para a realização de duas transfecções. O plasmídeo foi então incubado *overnight*, a temperatura de 25°C. Posteriormente, 200 ng (1 uL) de plasmídeo digerido e 200 ng (x uL) de plasmídeo não digeridos foram colocados em gel de agarose a 0,7% com brometo de etídio. Após análise para verificação se a digestão estava completa, o plasmídeo digerido com SmaI foi armazenado a 4°C até estar pronto para a transfecção.

Para a transfecção, foram cultivadas promastigotas de *L. infantum* da cepa OP46, em volume de 10 ml de cultura, na concentração de 10^6 células/mL incubadas na temperatura de 26°C. As formas promastigotas foram transfectadas 5 dias após a incubação quando a cultura atingiu a fase logarítmica de 8×10^6 células/mL.

3.10.2 Eletroporação de *Leishmania infantum*

Após as promastigotas atingirem a fase logarítmica na concentração ideal de 8×10^6 células/mL, as mesmas foram centrifugadas a 500 G, 24°C durante 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e 15 mL de Cytomix[®] foram adicionados, seguido de nova centrifugação a 500 g, 24°C durante 5 minutos. O sedimento foi ressuspenso novamente em Cytomix[®] para atingir uma concentração de 1×10^8 de células/ml. Foram utilizadas 3 cubetas de eletroporação (com abertura de 0,4cm) para realização do procedimento. Em uma cubeta foram adicionados 50 uL de Cytomix[®] e em outras duas 50 uL do plasmídeo digerido com 20 ug de SmaI. Em cada cubeta foram adicionados 500 uL (na concentração de 1×10^8 de células/ml) de solução contendo *L. infantum* com Cytomix[®] e agitadas suavemente para homogeneização. Os parasitos foram então eletroporados a 1500 V por duas vezes, com intervalos de 10 segundos entre cada eletroporação. Após 24 horas, cada amostra foi colocada em 10 mL de meio M199 (Sigma-Aldrich[®]) contendo 100 µg/mL de antibiótico Nourseothricin (NTC, Nurseotricin, Nourseotricin, clonNAT, da USBiological) e incubada *overnight*, em temperatura de 26°C. As culturas foram mantidas em pressão em meio líquido por 15 dias, monitorando o controle sem DNA (Mock), até que o mesmo demonstrou perda de viabilidade celular (analisado por microscopia ótica).

Seguidamente, 1,8 mL das amostras foram retirados e transferidos para microtubos com

capacidade de 2 mL. As amostras foram centrifugadas a 500G, 24°C durante 2 minutos e o sobrenadante descartado. Desta forma, o sedimento de promastigotas foi ressuscitado em meio LIT para expansão e foi realizada a análise da fluorescência dos parasitos por citometria de fluxo.

3.10.3 Avaliação da fluorescência por citometria de fluxo

Para confirmação da fluorescência GFP nas promastigotas, foi feita a análise em Citômetro de Fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Diego, EUA). Com o intuito de comparar a fluorescência das promastigotas normais com as transfectadas com o gene repórter para GFP, um volume de 100 µL das culturas de promastigotas de *L. infantum* OP46 e OP46GFP foi transferido para os respectivos tubos de poliestireno (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) de 12x75mm, 2mL de PBS foram adicionados para lavagem, seguido de centrifugação a 500 g, 10 minutos, 24°C. Seguidamente, o sobrenadante foi descartado e as promastigotas foram ressuscitadas em 200 µL de formalina para leitura e análise no citômetro de fluxo.

Os parâmetros de tamanho e granulosidade na citometria de fluxo foram utilizados para avaliação biológica da transfecção e verificação de alterações de sua morfologia. Na figura 2 encontra-se a comparação entre a emissão de fluorescência da cepa normal e da cepa GFP pela quantificação da intensidade média de fluorescência (IMF) emitida no citômetro de fluxo, com intuito de confirmar o sucesso da transfecção dos parasitos (Salomão, 2016). O número de eventos da aquisição de promastigotas no citômetro FACSCalibur foi de 100.000, e os dados gerados foram analisados pelo *software FlowJo*.

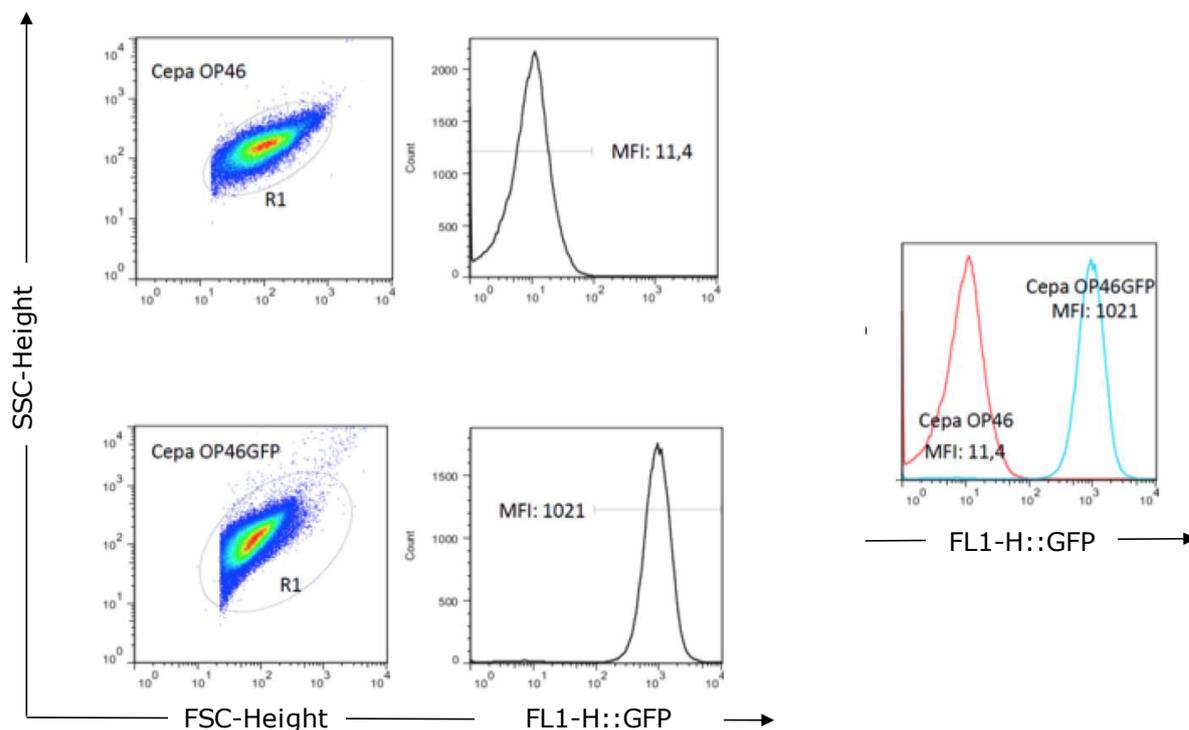


Figura 2: Avaliação da morfologia e fluorescência de promastigotas de *Leishmania infantum* OP46 e OP46GFP por citometria de fluxo. Na parte superior e inferior à esquerda da figura, estão representados os gráficos de tamanho (FSC) x granulicidade (SSC), respectivamente, eixo x e y, para avaliação da morfologia das promastigotas. No centro da figura estão representados os gráficos de histograma para a fluorescência FL-1 (GFP), das respectivas populações de promastigotas no “gate” R1 nos gráficos FSC x SSC, onde avaliamos a intensidade média de fluorescência (MFI) das populações de promastigotas normais OP46 (MFI: 11,4) e transfectadas com gene repórter OP46GFP (MFI: 1021). Na direita da figura está representado o gráfico de histograma para FL-1 das duas populações simultaneamente, demonstrando a diferença de MFI e do deslocamento no eixo x (FL-1) entre as duas populações OP46 (cor vermelha) e a OP46 GFP (cor azul).

3.11 Co-cultivo: linfócitos T (CD4 e/ou CD8), macrófagos e promastigotas GFP de *L. infantum*

3.11.1 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico

Inicialmente, as seringas heparinizadas contendo sangue destinado aos ensaios de cultivo celular, foram descontaminadas com álcool 70% (Veco[®], Brasil) para início do processamento do material. Logo em seguida, os 40 mL de sangue coletados foram aplicados lentamente sobre um gradiente de Ficoll-Hypaque constituído por 15mL de Ficoll-hypaque 1.119 e 15 mL de Ficoll-hypaque 1.077 (Histopaque[®] - Sigma Co., EUA) em dois tubos de 50 mL de polipropileno (Falcon[®], Becton Dickison and Company, EUA), os quais foram centrifugados a 450 x g por 70 minutos a 4°C. Após este procedimento, o anel celular contendo as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foi recolhido com auxílio de pipeta Pasteur autoclavada e transferido para outro tubo de 50 mL de polipropileno. À suspensão de

CMSP foi adicionado 30mL de PBS + EDTA (2mM), seguido de centrifugação a 400 x g por 10 minutos a 4°C. Este processo foi repetido, sendo realizada finalmente uma última lavagem com RPMI 1640 (10% SFB), a 400 x g por 10 minutos a 4°C. Ao final, as células foram ressuspensas em 2 mL de RPMI 1640 (10% SFB).

Para contagem celular, foi utilizada a câmara de Neubauer (Boeco, Germany). Desta forma, foram utilizados 10 µL da suspensão celular diluídos em 190 µL de solução de Azul de Trypan (Sigma Co., EUA) (diluição 1:20). O valor obtido foi multiplicado pelo volume ressuspendido e o fator de diluição. Assim, o volume final foi ajustado para conter 1×10^6 células/mL.

Além disso, separou-se uma alíquota de 50µl de cada amostra para obtenção da percentagem de monócitos por citometria de fluxo (FACScalibur - Becton Dickinson®, Mountain View, CA, USA). As CMSP foram então transferidas para garrafas de cultura de 400 mL (Nunc®, Thermo Fisher, Denmark) que permaneceram incubadas durante 24h em estufa com 5% CO₂ a 37°C. Finda a incubação, os monócitos encontravam-se aderidos ao fundo da garrafa e os linfócitos permaneceram no sobrenadante. Sendo assim, o meio de cultura contendo os linfócitos foi transferido para outra garrafa de cultura, separando os dois tipos de CMSP.

3.11.2 Condições de cultivo para derivação de monócitos circulantes em macrófagos

Após separação dos linfócitos presentes no sobrenadante, foi adicionada à garrafa contendo os monócitos, a mesma quantidade de RPMI (10% SFB) suplementado com 20% de sobrenadante de fibroblastos da linhagem L929 contendo fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF). Ambas as garrafas de cultura foram incubadas por mais 4 dias, nas mesmas condições anteriores. Todo esse procedimento foi realizado de acordo com VIANA et al. (2013, 2015, 2016). Após os 5 dias de cultivo, o sobrenadante das garrafas de cultura contendo os macrófagos foi descartado, sendo a garrafa completa com 50mL de RPMI 1640 (10% SFB) gelado. Posteriormente, as células foram raspadas levemente com a ajuda de um *cell scraper* (SPL Life Sciences Co., Ltd®) e o sobrenadante transferido para um tubo de polipropileno de 50 mL. Após o processo de centrifugação a 450 x g, 10 minutos, 4°C, o pellet foi ressuspendido em 2 mL de RPMI (10% SFB). Uma alíquota foi separada para contagem das células na câmara de Neubauer e posteriormente foi realizado o ajuste para 1×10^6 macrófagos/mL.

3.11.3 Purificação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺

Após 5 dias de cultivo, as células linfocitárias foram coletadas e transferidas para tubos de 50 mL de polipropileno (Falcon[®], Becton Dickison and Company, EUA), que foram centrifugados a 400 x g, 10 minutos, 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 6 mL de RPMI 1640 (10% SFB), colocado sobre 4,5 mL de Ficoll-hypaque 1.119 e 4,5 mL de Ficoll-hypaque 1.077, seguido de centrifugação a 450 x g, 70 minutos, 4°C, de forma a separar os linfócitos num anel celular distinto. Seguidamente, o anel foi recolhido para um tubo de polipropileno de 15mL, completado com RPMI 1640 (10% SFB), centrifugado a 400 x g, 10 minutos a 4°C e ressuspendido em 1 mL de RPMI 1640 (10% SFB), para contagem na câmara de Neubauer e posterior marcação com 8µL de anticorpo anti-CD8FITC, seguida de incubação ao abrigo da luz por 20 minutos. Após a incubação, foram adicionados 10 mL de PBS-W + EDTA (0.5% albumina sérica bovina + 2mM EDTA), seguido de centrifugação a 400 x g, 10 minutos, 4°C e ressuspenção em PBS-W + EDTA na proporção de 90ul por cada 1x10⁷ células. Posteriormente, 10µL das *beads* anti-FITC (BD-Biosciences[®]) foram adicionadas, com incubação por 20 minutos, centrifugação a 400 x g, 10 minutos, 4°C e ressuspenção em 500 µL de PBS-W + EDTA.

Em seguida, a suspensão celular foi adicionada à coluna de MACS (Miltenyi Biotec[®]). Após todo o líquido ser absorvido pela coluna, foram adicionados à mesma 15 mL de PBS-W + EDTA, deixando gotejar todo o volume para um tubo de polipropileno de 50 mL (Depletado 1). De forma a liberar os linfócitos T CD8⁺ retidos, a coluna foi retirada do suporte e lavada 3 vezes com 5 mL de solução tampão (PBS-W + EDTA), pressionando vigorosamente o êmbolo, sendo os linfócitos T CD8⁺ transferidos para um tubo de polipropileno de 50mL. Este tubo foi centrifugado a 400 x g, 10 minutos, 4°C, o sobrenadante descartado, ressuspendido em 1mL, e uma alíquota foi retirada para avaliação da pureza desta subpopulação por citometria de fluxo. Finalmente, foi efetuada a contagem em câmara de Neubauer, de forma a ressuspende os linfócitos T CD8⁺ na concentração de 2x10⁵/mL.

O tubo contendo a suspensão celular após depleção dos linfócitos T CD8⁺ (depletado 1), foi centrifugado 400 x g, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 8 µL de anti-CD4FITC, seguido de incubação ao abrigo da luz durante 20 minutos. Em seguida, foram adicionados à suspensão celular 10 mL de PBS-W + EDTA, seguido de centrifugação a 400 x g, 10 minutos, 4°C e ressuspenção em PBS-W + EDTA na proporção de 90ul por cada 1x10⁷ células. Posteriormente, 10µL das *beads* anti-FITC foram adicionadas, incubadas por 20 minutos, centrifugadas a 400 x g 10 minutos, 4°C e ressuspendidas em 500

μL de PBS-W + EDTA. Tal como descrito no processo de isolamento de linfócitos T CD8⁺, a suspensão celular foi adicionada à coluna de MACS, seguida de 15 mL de PBS-W + EDTA e após passagem de todo o líquido pela coluna, os linfócitos T CD4⁺ foram libertados e lavados 3 vezes com 15 mL solução tampão, pressionando de forma vigorosa o êmbolo. Este tubo foi centrifugado a 515 x G, 10 minutos, 4°C, o sobrenadante descartado e ressuspendido em 1mL para contagem dos linfócitos T CD4⁺, ajustando-se para a concentração de $2 \times 10^5/\text{mL}$. Uma alíquota foi retirada para aferição da pureza dos linfócitos T CD4⁺ por citometria de fluxo.

A figura 3 representa os gráficos demonstrativos da pureza do isolamento de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺. As figuras da esquerda representam gráficos de densidade, coloridos artificialmente segundo o número de células em cada ponto, em função da granulosidade (SSC – *side light scatter*) versus fluorescência 4 (FL-4) (Figura 3A), ou fluorescência 1 (FL-1) (Figura 3C) da população de linfócitos, de forma a estabelecer o limite de auto-fluorescência das células não marcadas. As figuras 2B e 2D representam gráficos de densidade SSC versus FL-4 (anti-CD4⁺APC) e FL-1 (anti-CD8⁺FITC), respetivamente. Utilizando a fronteira estabelecida anteriormente é possível observar no quadrante 3 (Q3) de ambos os gráficos, que foram conseguidos graus de pureza superiores a 90%, tanto em linfócitos T CD4⁺ (Figura 3B), como em linfócitos T CD8⁺ (Figura 3D).

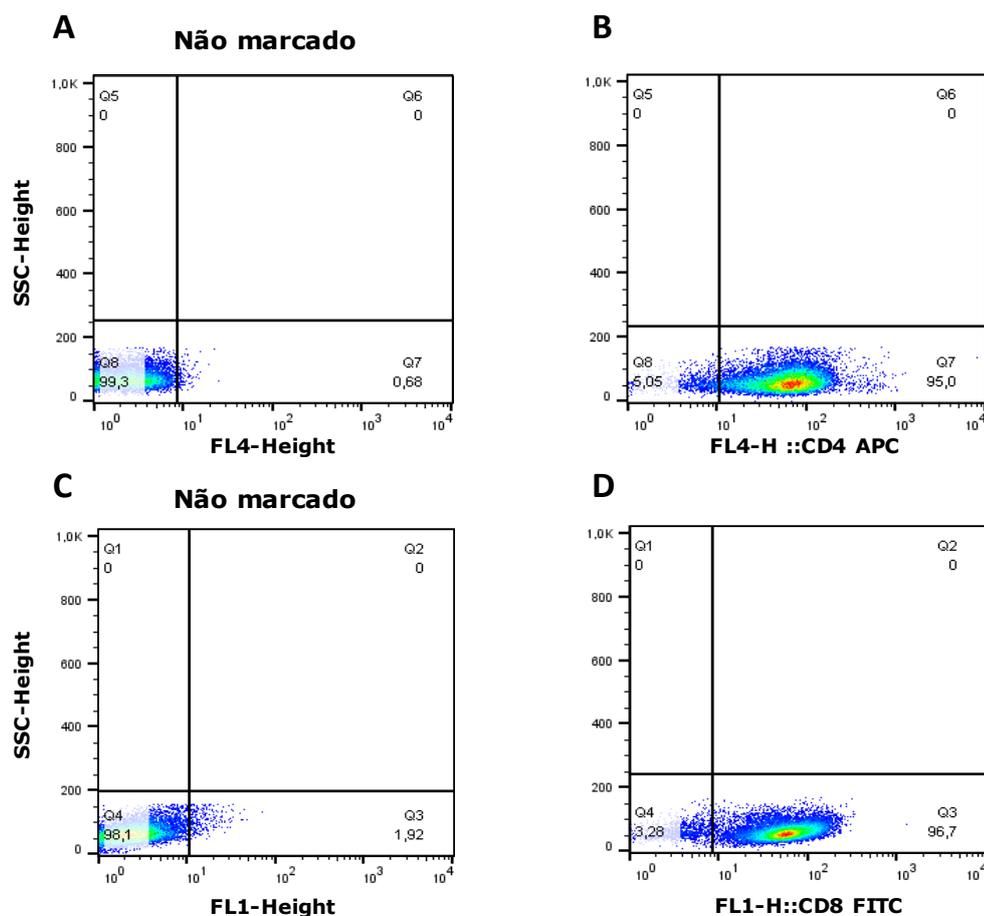


Figura 3: Percentual de pureza de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ a partir do sangue periférico de cães naturalmente infectados e hígidos, mantidos em cultura por cinco dias e submetidos à purificação com *microbeads* e colunas magnéticas. (A e C) Gráficos de densidade SSC vs (A) FL-4 ou (C) FL-1 utilizados para estabelecer o limite de auto-fluorescência da população negativa. (B e D) Gráfico de densidade de SSC vs (B) CD4⁺ - APC/FL-4 ou (D) CD8⁺ - FITC/FL1, empregado para quantificar o percentual de linfócitos T purificados. No quadrante 7 (Q7) da figura B e quadrante 3 (Q3) da figura D estão indicados, respectivamente, os percentuais (%) de pureza das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺.

3.11.4 Co-Cultivo celular

Além dos linfócitos e macrófagos foi necessário preparar as promastigotas de *L. infantum* OP46 GFP para o co-cultivo. Para isto, 2 mL da cultura de promastigotas de *L. infantum*, em fase estacionária de crescimento, cultivadas em meio NNN/LIT foram transferidas para um tubo falcon de 15mL, ao qual foram adicionados 8 mL de RPMI (10% SFB). O tubo foi centrifugado por 550 x g, 10 minutos, 24°C, o sobrenadante foi descartado, as promastigotas ressuspendidas em 1 mL de RPMI com 10%SFB e contadas em câmara de Neubauer. A seguir, foi ajustada a concentração de promastigotas para 1x10⁷ parasitos/mL.

No final de todo o processo descrito até aqui (obtenção dos macrófagos, separação das subpopulações de linfócitos em colunas magnéticas e crescimento de promastigotas de *L. infantum* OP46 GFP), 1x10⁵ macrófagos foram transferidos para cada um dos tubos de

polipropileno estéreis de 5mL, juntamente com promastigotas de *L. infantum* GFP na proporção de dez parasitos por macrófago e linfócitos T CD4⁺, linfócitos T CD8⁺, ou ambas as subpopulações de linfócitos T, na proporção de um linfócito para cinco macrófagos (Viana, 2012). Todos os tubos foram incubados durante 48h em estufa de CO₂ 5% a 37°C.

3.11.5 Avaliação da expressão intracelular de IFN- γ e IL-4 em linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ autólogos, por citometria de fluxo

Findo o período de incubação, os tubos referentes à avaliação da expressão intracelular de citocinas foram retirados da estufa de CO₂. As marcações e finalidade de cada um deles encontram-se no Quadro 2.

Inicialmente, foram adicionados 20 μ L de brefeldina A (10 μ g/mL), com posterior incubação por mais 4 horas à 37°C em estufa incubadora com 5% de CO₂. Ao término da incubação, as culturas foram tratadas com EDTA (Sigma Co., EUA), concentração final de 2 mM, e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas com 2 mL de PBS-W e centrifugadas por 10 minutos a 400 x g, 18°C. Para distinguir as subpopulações de linfócitos T produtores de citocinas, foram acrescentados 10 μ L dos anticorpos monoclonais anti-moléculas de superfície CD4 APC e CD8 FITC ou AF647, previamente diluídos. Após incubação por 30 minutos à TA, ao abrigo da luz, foram acrescentados 2 mL de PBS a cada um dos tubos, e estes foram centrifugados por 10 minutos a 400 x g, 18°C. Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução fixadora contendo formaldeído (Facs lysing solution - Becton Dickison and Company[®], EUA) sob agitação em vortex, seguido de incubação por 10 minutos à TA e centrifugação por 10 minutos a 400 x g, 18°C. O sobrenadante foi então desprezado e o *pellet* homogeneizado em vortex até à ressuspensão total das células. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de PBS-P, os tubos foram homogeneizados e incubados por 10 minutos à TA e ao abrigo da luz. Finalmente, os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 400 x g, 18°C, o sobrenadante desprezado e o *pellet* ressuspendido em 200 μ L de PBS.

Após a ressuspensão das células foi adicionado 10 μ L de cada um dos anticorpos anti-citocinas previamente diluídos, anti-IFN- γ PE e anti-IL-4 PE, sendo os tubos homogeneizados e incubados ao abrigo da luz por 30 minutos. Após acrescentar 2 mL de PBS em cada um dos tubos, os mesmos foram centrifugados por 10 minutos a 400 x g, 18°C. O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 200 μ L de PBS, para posterior leitura no citômetro de fluxo FACSCalibur.

Quadro 2: Avaliação da expressão intracelular de IFN- γ e IL-4 em linfócitos T CD4⁺ linfócitos T CD8⁺ autólogos.

Tubo	Marcação	Avaliação
Mϕ + CD4⁺	CD4APC IFN- γ PE	Avaliação da produção intracelular de IFN- γ , em linfócitos T CD4 ⁺
Mϕ + CD8⁺	CD8AF647 IFN- γ PE	Avaliação da produção intracelular de IFN- γ , em linfócitos T CD8 ⁺
Mϕ + CD4⁺ + CD8⁺	CD4APC CD8FITC IFN- γ PE	Avaliação da produção intracelular de IFN- γ , em linfócitos T CD4 ⁺ e linfócitos T CD8 ⁺ , juntos em cultivo
Mϕ + CD4⁺	CD4APC IL-4PE	Avaliação da produção intracelular de IL-4 em linfócitos T CD4 ⁺
Mϕ + CD4⁺ + CD8⁺	CD4APC CD8FITC IFN- γ PE	Avaliação da produção intracelular de IL-4, em linfócitos T CD4 ⁺ e linfócitos T CD8 ⁺ , juntos em cultivo

3.11.6 Imunofenotipagem de macrófagos e avaliação da expressão intracelular de NO e ROS por citometria de fluxo

Após o período de incubação os tubos foram retirados da estufa de CO₂. As marcações e finalidade de cada um dos tubos destinados à avaliação da taxa de infecção e produção intracelular de NO e ROS encontram-se nos Quadros 3 e 4, respetivamente.

Os tubos destinados à avaliação da expressão intracelular de NO foram centrifugados a 400 x g, por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi ressuspensionado em 100 μ L de PBS e foi acrescentado 1 μ L de Orange Nitric Oxide Probe (ONOP) (BD-Biosciences[®]) para identificação intracelular de NO, sendo os tubos incubados por 3 horas. Os tubos destinados à avaliação da expressão intracelular de ROS foram também centrifugados a 400 x g, 10 minutos, 25°C, o sobrenadante foi descartado e ressuspensionado em 100 μ L de PBS, posteriormente foram acrescentados 10 μ L de CellROX[®] Orange Reagent (CROR) (Thermofisher scientific[®]) para identificação de ROS intracelular, seguido de incubação em estufa 5% CO₂ a 37°C por 30 minutos.

Após a incubação foram acrescentados 10 μ L de anticorpo anti-CD14 Alexa Fluor 647 (AF647) previamente diluído, seguido de incubação por 20 minutos, à TA e ao abrigo da luz. Posteriormente, os tubos foram centrifugados 400 x g, por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o conteúdo ressuspensionado em 200 μ L de PBS. Finalmente, o conteúdo dos tubos foi transferido para tubos FACS para leitura no citômetro de fluxo FACSCalibur.

Quadro 3: Avaliação do percentual de macrófagos infectados derivados de monócitos circulantes em co-cultivo com linfócitos T autólogos e sua expressão intracelular de NO.

Tubo	Marcação	Avaliação
Mϕ	-	Controle Negativo
Mϕ	CD14AF647	Percentual de Macrófagos
Mϕ + <i>L. infantum</i>	CD14AF647 GFP	Percentual de macrófagos infectados
Mϕ + <i>L. infantum</i>	CD14AF647 GFP ONOP	Percentual de macrófagos infectados produtores de NO
Mϕ + CD4 + <i>L. infantum</i>	CD14AF647 GFP ONOP	Percentual de macrófagos infectados Produtores de NO, em co-cultivo com linfócitos T CD4 ⁺
Mϕ + CD8 + <i>L. infantum</i>	CD14AF647 GFP ONOP	Percentual de macrófagos infectados produtores de NO, em co-cultivo com linfócitos T CD8 ⁺
Mϕ + CD4 + CD8 + <i>L. infantum</i>	CD14AF647 GFP ONOP	Percentual de macrófagos infectados produtores de NO, em co-cultivo com linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺

Quadro 4: Avaliação da expressão intracelular de ROS por macrófagos infectados derivados de monócitos circulantes em co-cultivo com linfócitos T autólogos.

Tubo	Marcação	Avaliação
Mϕ + <i>L. infantum</i>	CD14AF647 GFP CROR	Percentual de macrófagos infectados produtores de ROS
Mϕ + CD4 + <i>L. infantum</i>	CD14AF647 GFP CROR	Percentual de macrófagos infectados produtores de ROS, em co-cultivo com linfócitos T CD4 ⁺
Mϕ + CD8 + <i>L. infantum</i>	CD14AF647 GFP CROR	Percentual de macrófagos infectados produtores de ROS, em co-cultivo com linfócitos T CD8 ⁺
Mϕ + CD4 + CD8 + <i>L. infantum</i>	CD14AF647 GFP CROR	Percentual de macrófagos infectados produtores de ROS, em co-cultivo com linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺

3.11.7 Avaliação da evolução morfológica dos monócitos em cultura com M-CSF e realização de microfotografias representativas da infecção por *Leishmania infantum*

Após separação dos monócitos e linfócitos, tal como descrito no item 3.11.1, estes foram contados em câmara de Neubauer e colocados em chamber slides de 16 poços (5x10⁴ macrófagos/poço) durante 6 horas. A seguir, a parte superior da chamber slide foi retirada e a lâmina foi corada com Panótico Rápido InstantProv para realização de fotomicrografias representativas das características morfológicas dos monócitos.

Para avaliação da diferenciação dos monócitos circulantes em macrófagos, estes foram destacados da base da garrafa de cultura, tal como descrito no item 3.11.2, ao 3º e 5º dia, contados em câmara de Neubauer e colocados em cultura em chamber slides (5×10^4 macrófagos/poço) durante 6 horas com RPMI (10% SFB). Após este tempo, a lâmina foi corada com Panótico Rápido InstantProv para realização de fotomicrografias representativas das alterações morfológicas dos monócitos no processo de transformação em macrófagos (Figura 28A). As microfotografias foram realizadas utilizando a câmara Zeiss AxioCam mrC, acoplada ao microscópio de fluorescência Axio Imager Z2 (Carl Zeiss Microimaging GmbH®).

3.11.8 Realização de microfotografias representativas da infecção por *Leishmania infantum*, por microscopia convencional

Para a obtenção de imagens representativas da taxa de infecção, monócitos foram colocados em cultura, nas condições descritas no item 3.11.2, durante 5 dias. Após este período estas células foram raspadas com auxílio de um cell scraper, transferidas para tubos de polipropileno de 50mL e centrifugadas a $400 \times g$, 10 minutos 4°C . A seguir, o sobrenadante foi descartado e ressuspendido em 1mL de RPMI (10% SFB) para contagem na câmara de Neubauer. As células foram ressuspendidas para 5×10^5 M ϕ /mL, plaqueadas em chamber slide (5×10^4 macrófagos/poço) e infectadas com promastigotas de *Leishmania infantum* GFP em fase estacionária, na proporção de 10 promastigotas por macrófago, durante 48 horas. Após a incubação, a parte superior foi retirada e a lâmina foi corada com Panótico Rápido InstantProv para realização de fotomicrografias representativas. As microfotografias foram realizadas utilizando a câmara Zeiss AxioCam mrC, acoplada ao microscópio de fluorescência Axio Imager Z2 (Carl Zeiss Microimaging GmbH®).

Quadro 5: Diluição e fluorescência dos anticorpos utilizados.

Anticorpo	Hospedeiro	Clone	Diluição
CD3 FITC	Camundongo	CA17.2A12	1:25
CD4 FITC	Rato	YKIX302.9	-
CD4 APC	Rato	YKIX302.9	1:100
CD4 PE	Rato	YKIX302.9	1:50
CD8 FITC	Rato	YCATE55.9	1:25
CD8 AF647	Rato	YCATE55.9	1:25
CD14 AF647	Camundongo	TÜK4	1:25
IFN- γ PE	Camundongo	CC302	1:20
IL-4 PE	Camundongo	CC303	1:20
CD11b PE	Rato	M1/70	1:50

3.12 Estratégias de análise por citometria de fluxo

3.12.1 Estratégias para análise imunofenotípica de linfócitos T no contexto *ex vivo*, no baço e fígado

Os resultados referentes aos aspectos fenotípicos das subpopulações de linfócitos T no baço e no fígado foram obtidos considerando a frequência (%) de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ através do programa *FlowJo*[®]. A análise foi feita de forma semelhante nas células do compartimento esplênico (Figura 4) e hepático (Figura 5)

A análise da frequência de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD8⁺ foi realizada utilizando-se a estratégia de análise convencional. Iniciamos pela seleção, em gráficos de densidade do limite de auto-fluorescência da população não marcada no canal FL-1. Seguidamente, foi avaliado o percentual de células CD3⁺, em gráficos de densidade SSC *versus* CD3⁺ - FL-1. Após a demarcação da região contendo as células de fenótipo CD3⁺SSC^{Low}, foi avaliado em gráficos de densidade FL-3 *versus* CD4PE – FL-2 ou CD8 Alexa Fluor 647 – FL-4, o percentual de subpopulações T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD8⁺ no compartimento esplênico e hepático.

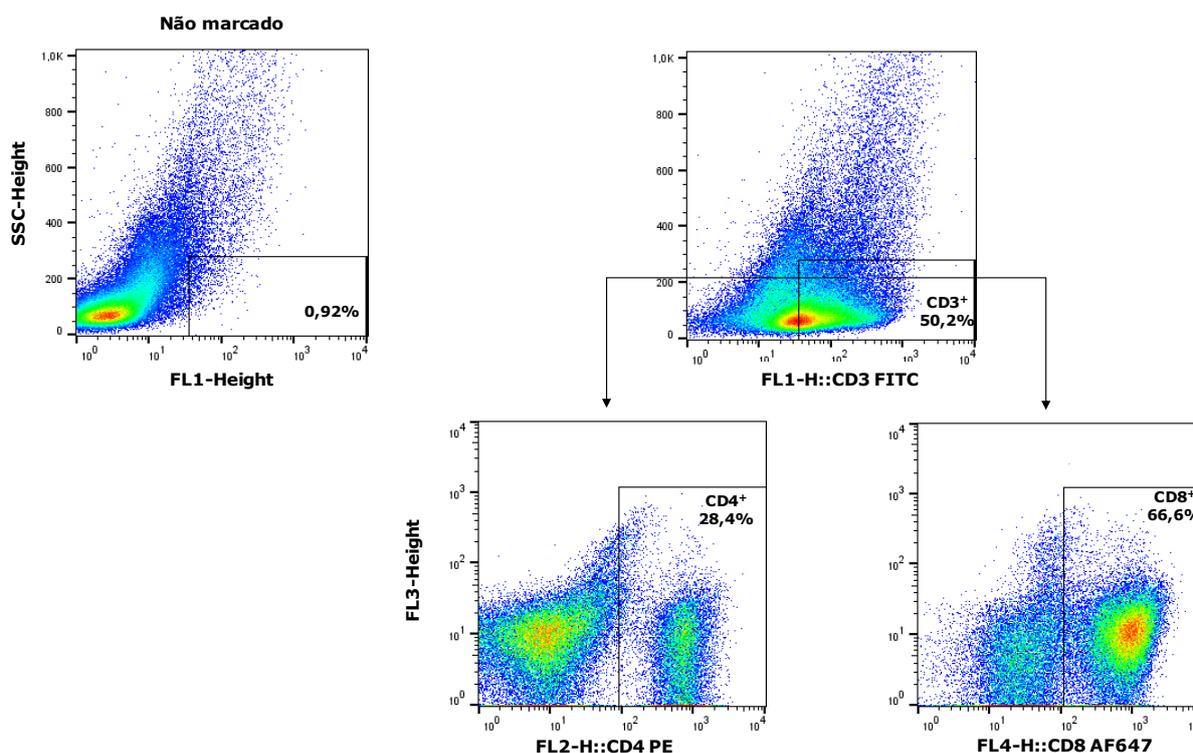


Figura 4: Sequência da análise realizada para determinar o percentual de linfócitos T totais (CD3⁺), CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD8⁺ no baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. Gráficos de densidade, representativo da expressão dos marcadores de superfície para a caracterização de linfócitos T. As regiões CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺, representam o percentual de cada uma destas populações no compartimento esplênico.

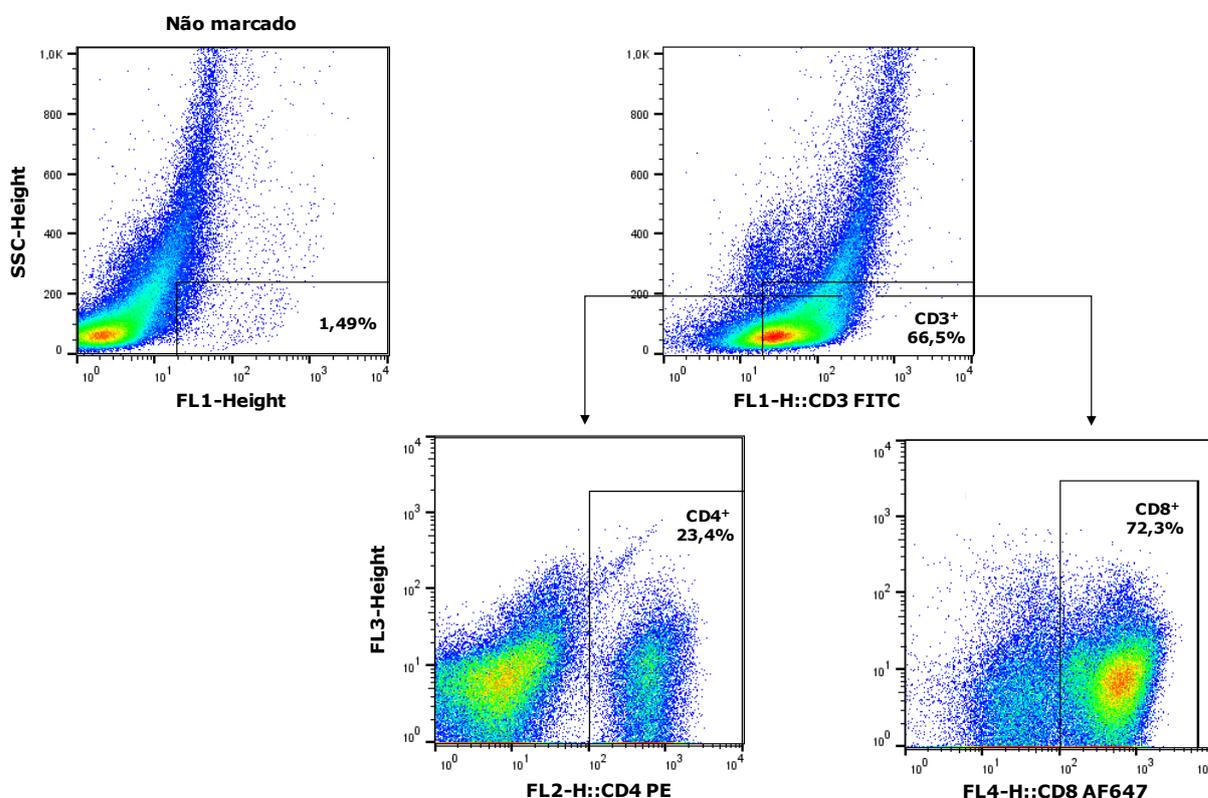


Figura 5: Sequência da análise realizada para determinar o percentual de linfócitos T totais (CD3⁺), CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD8⁺ no fígado de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. Gráficos de densidade, representativo da expressão dos marcadores de superfície para a caracterização de linfócitos T. As regiões CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺, representam o percentual de cada uma destas populações no compartimento hepático.

3.12.2 Estratégia de análise da produção citocinas intracitoplasmáticas (IFN- γ e IL-4) por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no compartimento esplênico e hepático

A análise das frequências de linfócitos T CD4⁺ (Figura 6) e linfócitos T CD8⁺ (Figura 7) esplênicos com expressão intracitoplasmática de IFN- γ e IL-4 foi realizada a partir da seleção da população CD4⁺/FL-4 ou CD8⁺/FL-4, baseada em aspectos imunofenotípicos, através de gráficos de densidade SSC *versus* FL-4. Após a seleção da região de interesse contendo células de fenótipo CD4⁺SSC^{low} (Figura 6) ou CD8⁺SSC^{low} (Figura 7), foram construídos gráficos de densidade de fluorescência SSC *versus* IFN- γ ⁺/FL2 ou IL-4⁺/FL2 para determinar o percentual de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores destas citocinas. As células produtoras de IFN- γ ⁺ e IL-4⁺ situam-se no quadrante 3 (Q3). Para avaliação da produção intracitoplasmática de citocinas por linfócitos T hepáticos foi realizada a mesma estratégia.

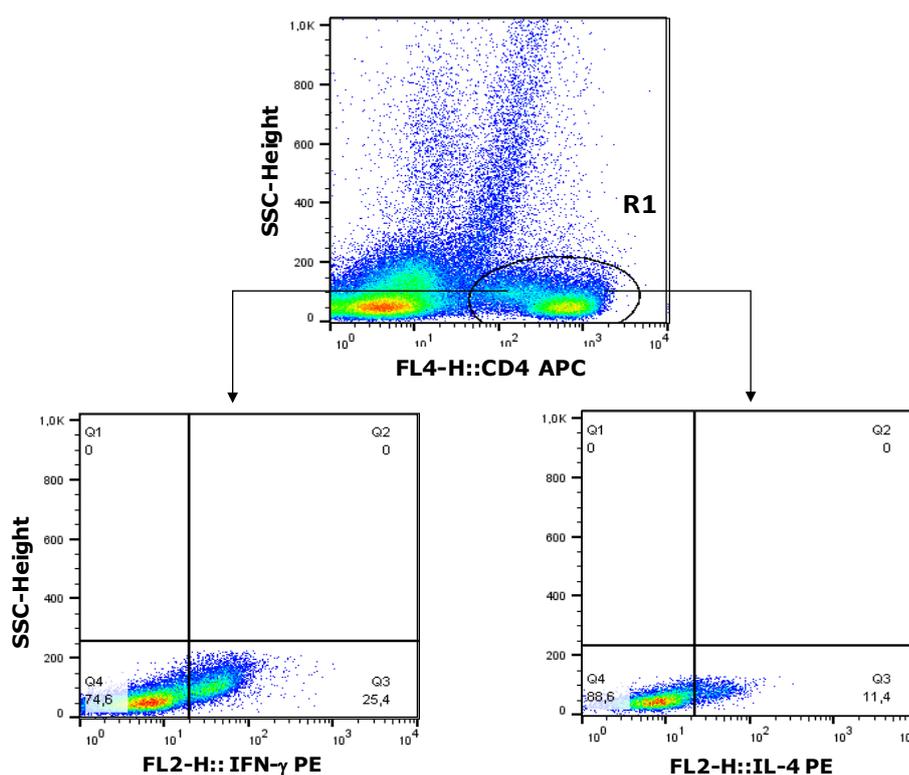


Figura 6: Sequência de procedimentos utilizados para análise do percentual de linfócitos T CD4⁺ IFN- γ ⁺ e CD4⁺ IL-4⁺ no compartimento esplênico. A região Q3 representa a percentagem de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ ou IL-4.

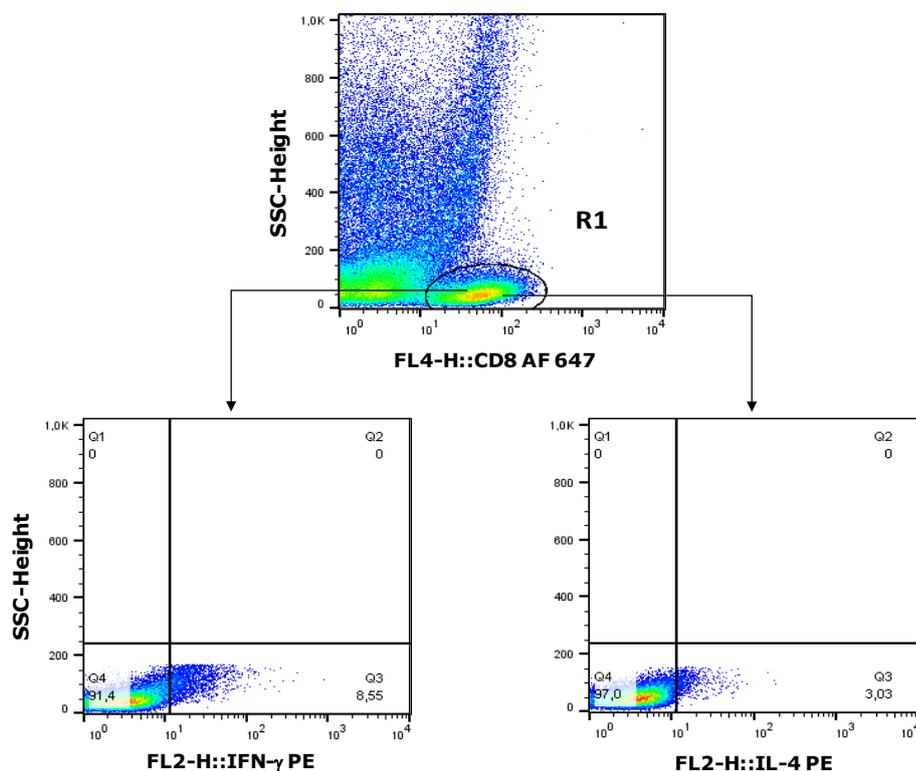


Figura 7: Sequência de procedimentos utilizados para análise do percentual de linfócitos T $CD8^+$ $IFN-\gamma^+$ e $CD8^+$ $IL-4^+$ no compartimento esplênico. O quadrante 3 (Q3) representa a percentagem de linfócitos T $CD8^+$ produtores de $IFN-\gamma$ ou $IL-4$.

3.12.3 Estratégia de análise de produção de NO e ROS por macrófagos hepáticos e esplênicos no contexto *ex-vivo*

A análise da produção de NO e ROS por macrófagos $CD11b^+$ no contexto de *ex-vivo* foi realizada de forma semelhante no baço (Figura 8) e no fígado (Figura 9). Esta análise foi iniciada pela definição do limite de auto-fluorescência da população não marcada no canal FL-2, através de gráficos de densidade SSC *versus* FL-2. A seguir, foi avaliado o percentual de células $CD11b^+$ (Região $CD11b^+$) em gráficos de densidade SSC *versus* $CD11b/FL-2$. Foi ainda avaliado o limite de auto-fluorescência da população não marcada no canal FL-1, através de gráficos de densidade FL-4 *versus* FL-1. Utilizando os limites definidos anteriormente, foi então avaliado o percentual de macrófagos $CD11b^+NO^+$ e $CD11b^+ROS^+$ através de gráficos de densidade FL-4 *versus* DAF/FL-1 ou DCFH/FL-1.

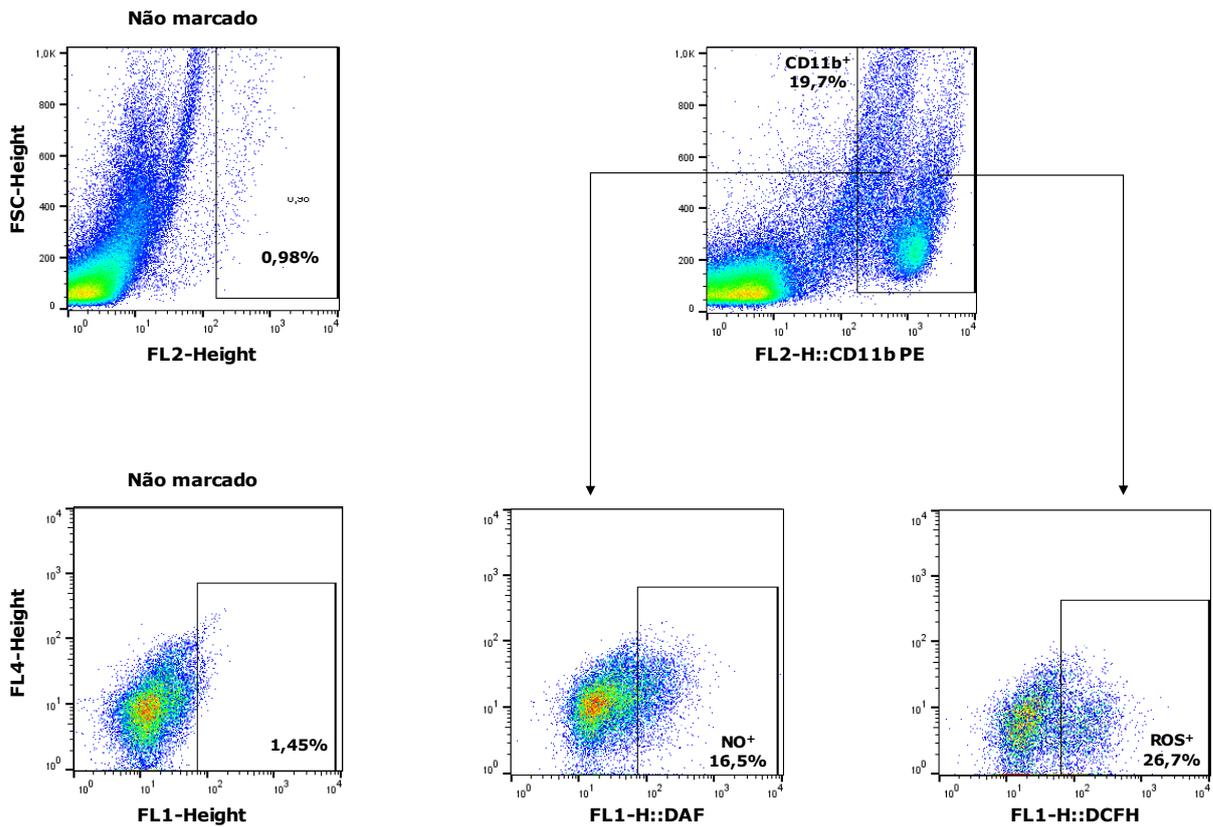


Figura 8: Avaliação da expressão intracelular de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) por macrófagos esplênicos (CD11b⁺). As regiões “NO⁺” e “ROS⁺” representam o percentual de células CD11b⁺ produtoras de NO e ROS, respectivamente.

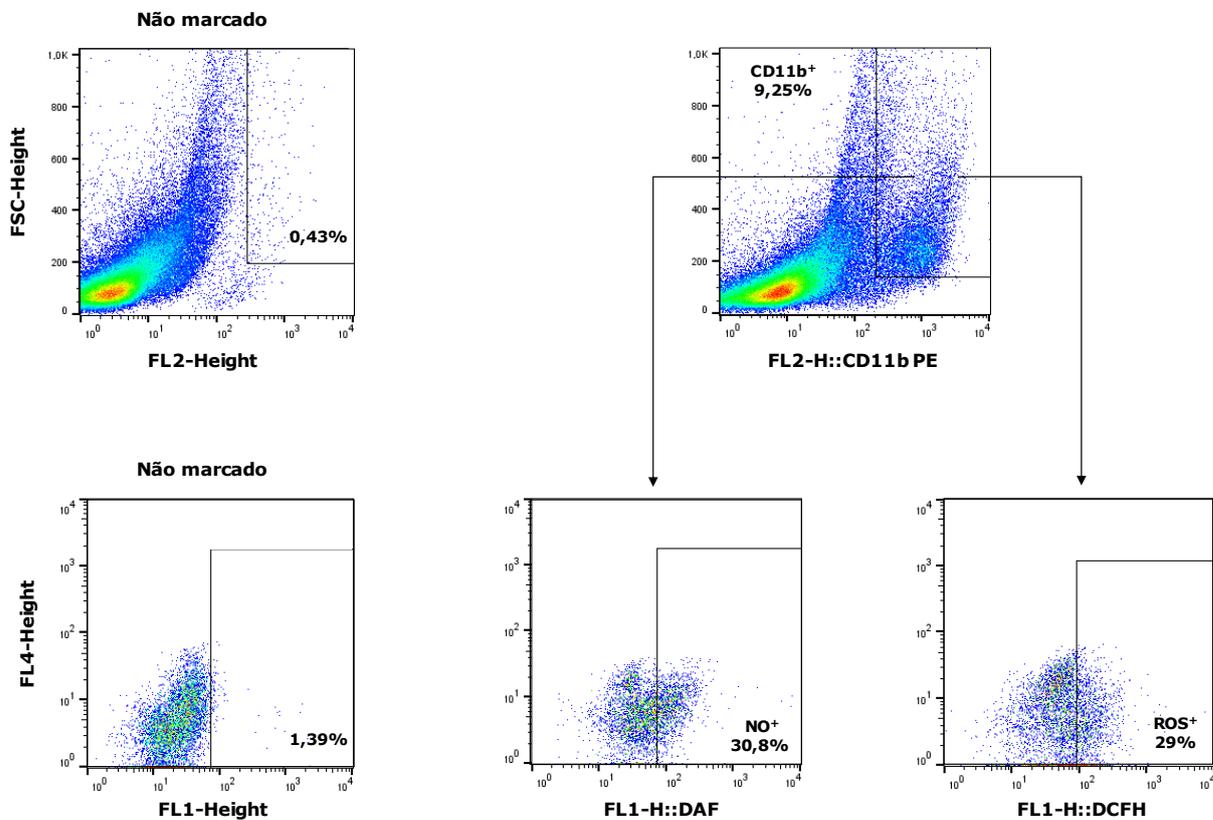


Figura 9: Avaliação da expressão intracelular de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) por macrófagos hepáticos (CD11b⁺). As regiões “NO⁺” e “ROS⁺” representam o percentual de células CD11b⁺ produtoras de NO e ROS, respectivamente.

3.12.4 Estratégia de análise da produção citocinas intracitoplasmáticas (IFN- γ e IL-4) por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em co-cultivo com macrófagos infectados derivados de monócitos circulantes

A análise das frequências de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ com expressão intracitoplasmática de IFN- γ e IL-4 nos experimentos de co-cultivo foi realizada a partir da seleção da população CD4⁺ (Figura 10) ou CD8⁺ (Figura 11), de acordo com aspectos imunofenotípicos, através de gráficos de densidade SSC *versus* CD4/FL-4 ou CD8/FL-4. Após a seleção da região de interesse contendo células de fenótipo CD4⁺SSC^{low} (Figura 10) ou CD8⁺SSC^{low} (Figura 11) - (Região R1), foram construídos gráficos de densidade SSC *versus* IFN- γ /FL2 ou IL-4/FL2 para determinar o percentual de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de cada citocina, situando assim as células produtoras de IFN- γ e IL-4 no quadrante 3 (Q3).

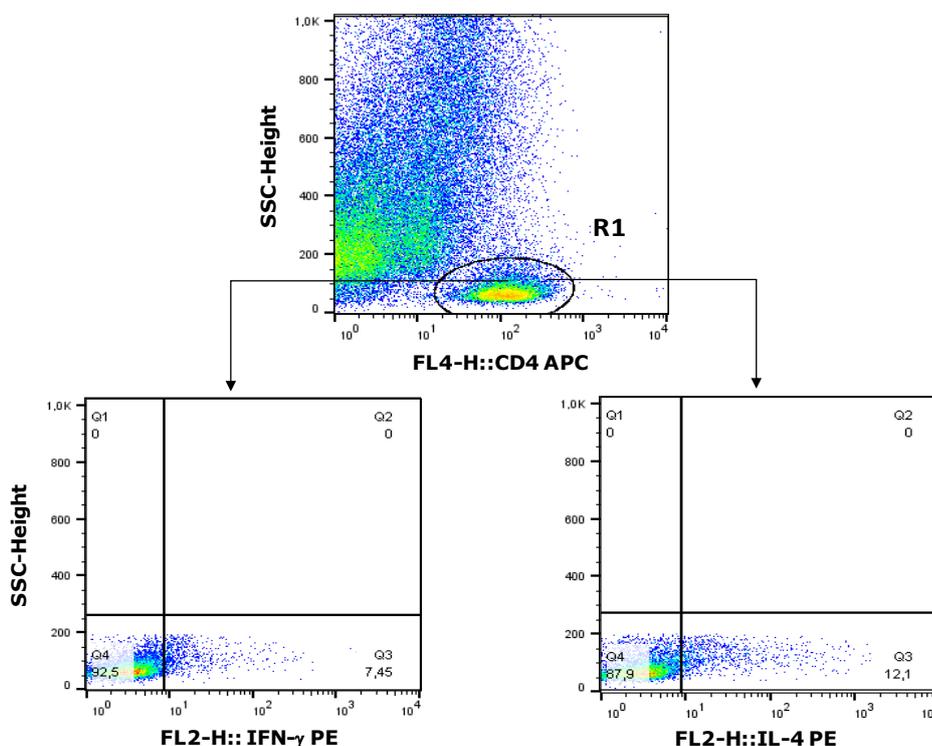


Figura 10: Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ e CD4⁺IL-4⁺ no contexto de co-cultivo com macrófagos derivados de monócitos caninos circulantes infectados com *Leishmania infantum*. O quadrante 3 (Q3) representa a percentagem de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ ou IL-4.

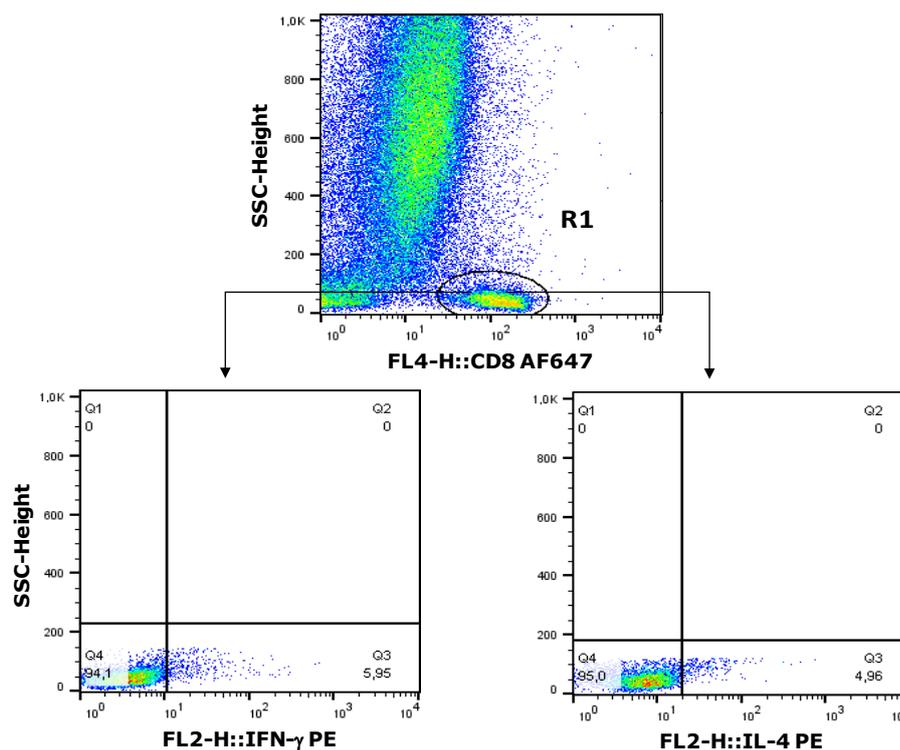


Figura 11: Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de linfócitos T CD8⁺IFN-γ⁺ e CD8⁺IL-4⁺ no contexto de co-cultivo com macrófagos derivados de monócitos caninos circulantes infectados com *Leishmania infantum*. O quadrante 3 (Q3) representa a percentagem de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN-γ ou IL-4.

3.12.5 Estratégia de análise de produção de NO e ROS por macrófagos infectados derivados de monócitos circulantes em co-cultivo com subpopulações de linfócitos autólogos

A análise da produção de NO e ROS por macrófagos CD14⁺ após 48h de co-cultivo com linfócitos T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ foi iniciada a partir da seleção baseada em aspectos imunofenotípicos da população CD14⁺, através de gráficos de densidade de SSC *versus* CD14/FL-4. A seguir, foi avaliado o percentual de células CD14⁺ infectadas com *L. infantum* GFP no canal de fluorescência FL-1, em gráficos de densidade de CD14/FL-4 *versus* GFP/FL-1. Após seleção da população GFP⁺, foi ainda avaliado o limite de auto-fluorescência da população não marcada no canal FL-2, através de gráficos de densidade FL-4 *versus* FL-2. Finalmente, tendo em conta esse limite, foi avaliada a produção de macrófagos produtores de NO, em gráficos de densidade de CD14/FL-4 *versus* ONOP/FL2 e ROS, em gráficos de densidade de FSC *versus* CROR/FL2 (Figura 12).

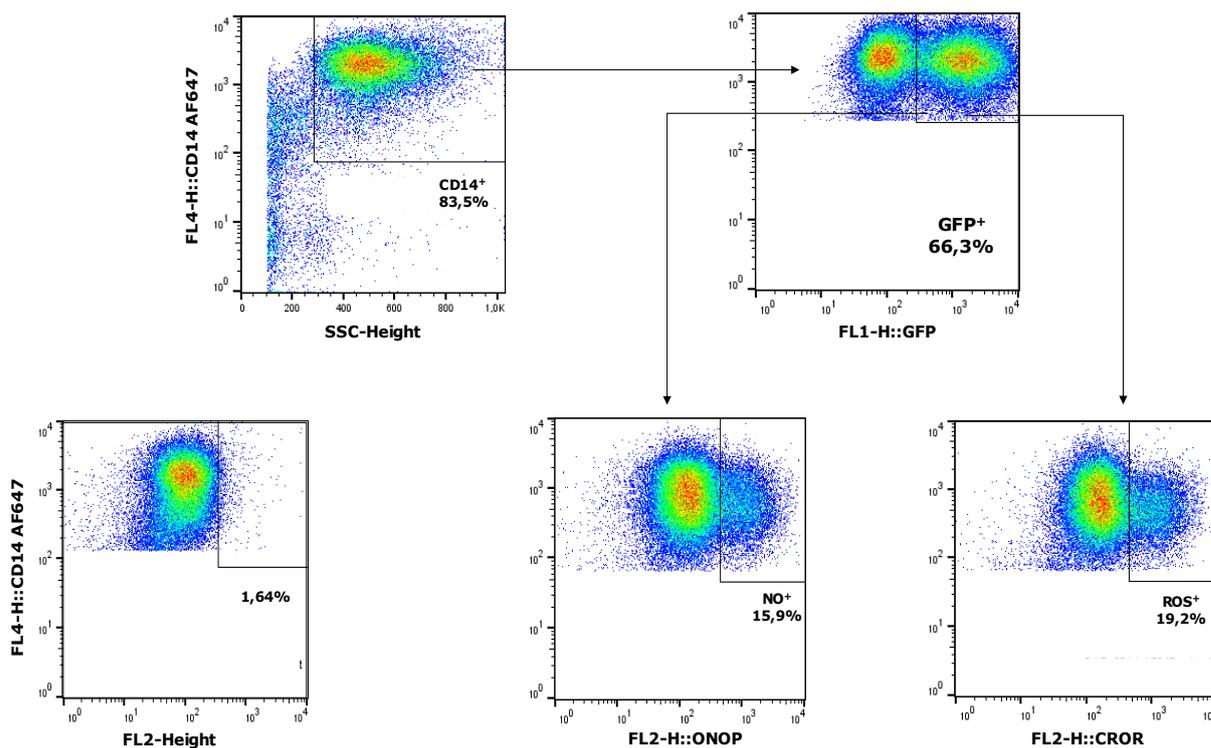


Figura 12: Avaliação da expressão intracelular de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, por macrófagos derivados de monócitos sanguíneos em co-cultivo com linfócitos T CD4⁺ e/ou linfócitos T CD8⁺ e infectados com *Leishmania infantum* GFP. A região CD14⁺ representa o percentual de macrófagos. A região GFP⁺ representa o percentual de macrófagos (CD14⁺) infectados e as regiões “NO⁺” e “ROS⁺” representam o percentual de macrófagos CD14⁺GFP⁺ produtores de NO e ROS, respetivamente.

3.12.6 Estratégia de análise de produção de NO e ROS por macrófagos derivados de monócitos circulantes, com diferentes níveis de parasitismo, em co-cultivo com subpopulações de linfócitos autólogos

A avaliação da produção de NO e ROS por macrófagos derivados de monócitos em co-cultivo com linfócitos T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ em situações de ausência, baixo ou alto parasitismo, foi iniciado pela seleção, através de aspetos fenotípicos da população CD14⁺, tal como descrito em 3.12.5 (Figura 12). A seguir, foi selecionada a população de células CD14⁺ não infectadas com *L. infantum* GFP, situadas na região de interesse GFP⁻/FL-1 e a população de macrófagos infectados, incluída na região de interesse GFP⁺/FL-1, em gráficos de densidade de CD14/FL-4 versus GFP/FL-1 (Figura 13). Dentro da população de macrófagos infectados foram selecionados os 50% de macrófagos com menor parasitismo (GFP_{low}/FL-1) e os 50% de macrófagos com maior parasitismo (GFP^{high}/FL-1). Após seleção de cada uma das populações de interesse GFP⁻, GFP_{low} e GFP^{high}, foi avaliada a produção de NO em cada uma destas populações, em gráficos de densidade de CD14/FL-4 versus ONOP/FL-2 (Figura 13) A mesma estratégia descrita acima foi adotada para avaliação da produção de ROS nas populações GFP⁻, GFP_{low} e GFP^{high} em gráficos de densidade de CD14/FL-4 versus CROR/FL-2.

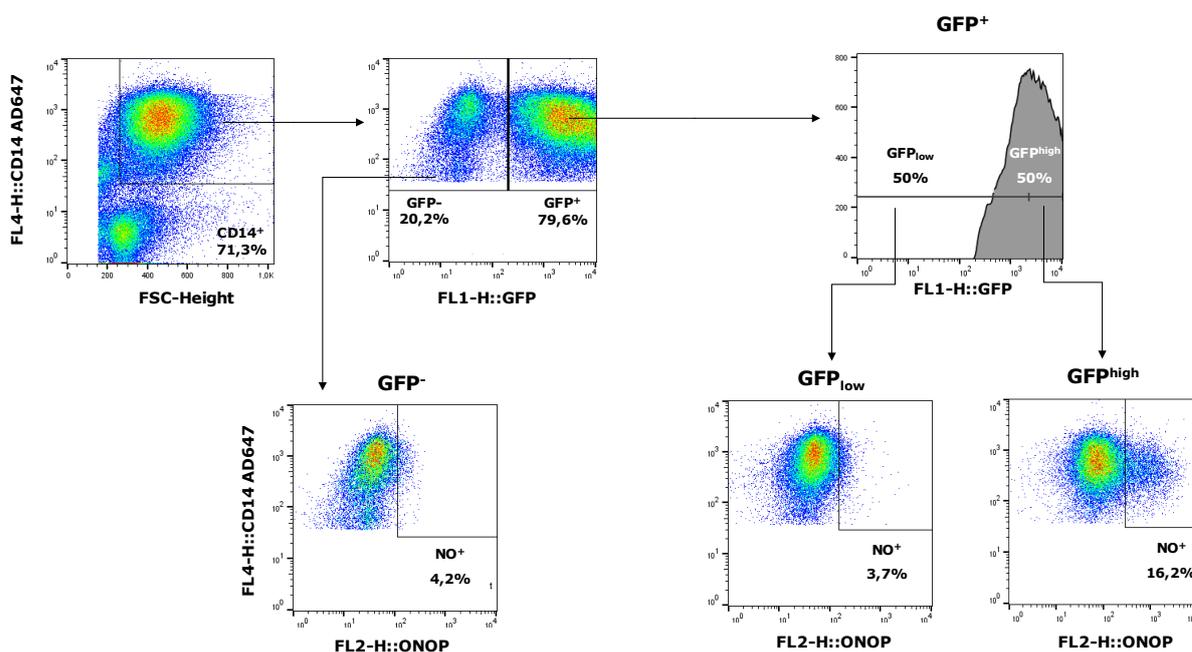


Figura 13: Avaliação da expressão intracelular de óxido nítrico, por macrófagos derivados de monócitos sanguíneos em co-cultivo com linfócitos T CD4⁺ e/ou linfócitos T CD8⁺ e *Leishmania infantum* GFP, em situações de ausência, baixo ou alto parasitismo. Regiões GFP⁻, GFP_{low} e GFP_{high}, correspondem ao percentual de macrófagos (CD14⁺), com ausência, baixo ou alto parasitismo. As regiões NO⁺, correspondem ao percentual de macrófagos CD14⁺ produtores de óxido nítrico, em cada uma das populações anteriores.

3.13 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas usando o *GraphPad Prism 6.0* (Prism Software, EUA). O teste de Kolmogorov-Smirnoff foi empregado para avaliar a distribuição amostral dos dados. Considerando os dados que não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste não paramétrico de KruskalWallis para investigar diferenças entre os grupos, acompanhado do teste de Dunns para as comparações múltiplas. Os dados que tiveram distribuição normal foram analisados pelo teste paramétrico de one-way-ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para as comparações múltiplas. As análises de correlação foram realizadas utilizando o teste de Pearson, nos dados que apresentaram distribuição normal, ou o teste de Spearman, nos dados que não apresentaram distribuição normal. Em todos os casos foram consideradas significativas as diferenças com valores de p igual ou menor 0,05 e todos os testes foram realizados com intervalo de confiança de 95%.

4 RESULTADOS

Esta tese gerou um conjunto de dados que poderá orientar futuras pesquisas no campo da imunopatologia da leishmaniose visceral canina, demonstrando a importância de alguns parâmetros imunológicos para o estabelecimento de uma resposta imune compartimentalizada associada à resistência ou susceptibilidade, em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Os resultados apresentados a seguir, agregam diferentes abordagens realizadas em grupos de cães não infectados e cães naturalmente infectados assintomáticos ou sintomáticos, que foram denominados, respectivamente, Grupo CNI (n=7), grupo CA (n=10) e grupo CS (n=9).

Para facilitar o entendimento dos dados, os resultados estão divididos em três partes. Na primeira parte encontram-se os resultados dos exames parasitológicos, da presença e grau de esplenomegalia, assim como das análises hematológicas e bioquímicas. Na segunda parte encontram-se os resultados referentes à imunofenotipagem, no contexto *ex-vivo*, de baço e fígado e à expressão de mRNA de citocinas associadas com a resistência e susceptibilidade à leishmaniose visceral. Na terceira parte encontram-se os resultados referentes à imunofenotipagem num sistema de co-cultivo de células do sistema imune derivadas do sangue periférico.

4.1 Avaliações sorológica e parasitológica dos cães infectados por *Leishmania infantum*

4.1.1 Diagnóstico sorológico e isolamento de promastigotas em mielocultura

Nos grupos CA e CS foram incluídos apenas cães que apresentaram teste rápido imunocromatográfico - (TR DPP[®] – Bio-Manguinhos[®]) e ensaio imunoenzimático - (EIE[®] – Bio-Manguinhos[®]) positivos (Tabela 1). Os ensaios sorológicos foram realizados pelo Centro de Controle de Zoonoses CCZ de Governador Valadares (CCZ/GV) de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde no seu Plano de Controle e Vigilância da LV no Brasil (Ministério da Saúde, 2006). Para confirmar a presença do parasito nos cães infectados, foi realizada, logo após a chegada dos mesmos ao CCA/UFOP, a tentativa de isolamento de formas promastigotas, a partir de culturas de medula óssea, em meio NNN/LIT. Os resultados demonstraram que foi possível isolar os parasitos na mielocultura de todos os cães de ambos os grupos infectados (CA e CS), como observado na Tabela 1. Além disso foi realizada uma avaliação por PCR-RFLP, que confirmou que os animais foram infectados por *L. infantum*.

Tabela 1: Resultados das avaliações sorológicas (EIE[®] e DPP[®]) e parasitológicas (mielocultura em NNN/LIT) em cães portadores de diferentes formas clínicas (assintomáticos e sintomáticos) na LVC.

Grupo Assintomático (CA)	ELISA	DPP[®]	Mielocultura
C24	+	+	+
C25	+	+	+
C42	+	+	+
C49	+	+	+
C57	+	+	+
C206	+	+	+
C207	+	+	+
C208	+	+	+
C212	+	+	+
C214	+	+	+
Grupo Sintomático (CS)			
C16	+	+	+
C26	+	+	+
C29	+	+	+
C31	+	+	+
C39	+	+	+
C209	+	+	+
C229	+	+	+
C267	+	+	+
C353	+	+	+

4.1.2 Avaliação da carga parasitária por qPCR e pelo método *Leishman Donovan Units* (LDU)

Para avaliar o parasitismo esplênico e hepático por *L. infantum* nos grupos infectados (CA e CS), foi feita a determinação da carga parasitária nestes grupos, através da contagem de formas amastigotas por mil células nucleadas em lâminas coradas por Giemsa, utilizando a técnica de LDU. Esta avaliação revelou uma maior carga parasitária no compartimento esplênico do grupo CS, em comparação ao grupo CA (Figura 14A). De forma diferente, no fígado, não se verificou diferença significativa entre os grupos (Figura 14B).

De forma a confirmar os resultados da avaliação da carga parasitária por LDU, foi também realizado nesses grupos a determinação da carga parasitária, através da quantificação do DNA parasitário em cada um dos órgãos, utilizando a técnica de qPCR. Esta avaliação, nos permitiu observar que tanto no compartimento esplênico, como no compartimento hepático,

existiu uma maior carga parasitária no grupo CS, em comparação ao grupo CA (Figura 15).

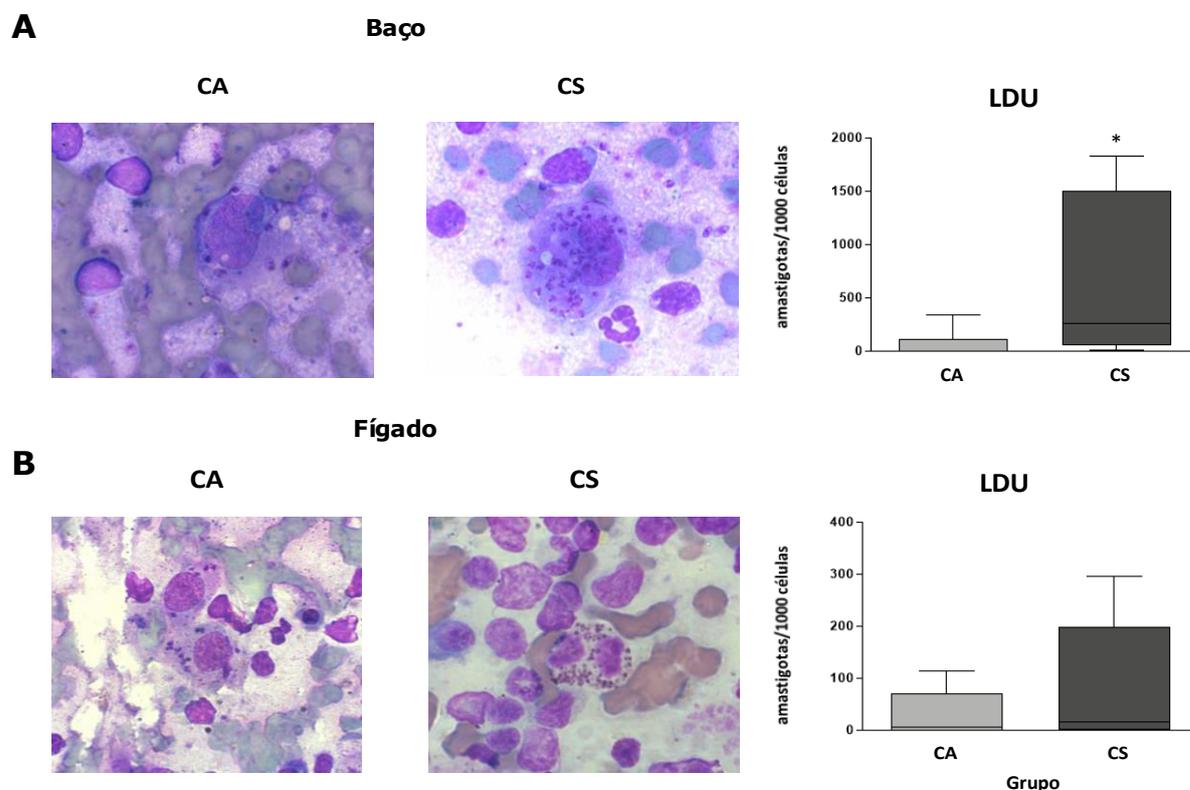


Figura 14: Carga parasitária avaliada por LDU (Leishman Donovan Units), de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Carga parasitária (A) esplênica e (B) hepática. Através dos gráficos de box plots estão representadas as medianas, intervalos interquartis e os valores máximos e mínimos das cargas parasitárias de cada grupo em amastigotas por 1000 células nucleadas. No eixo x estão representados os dois grupos experimentais (CA e CS). O asterisco (*) representa as diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos.

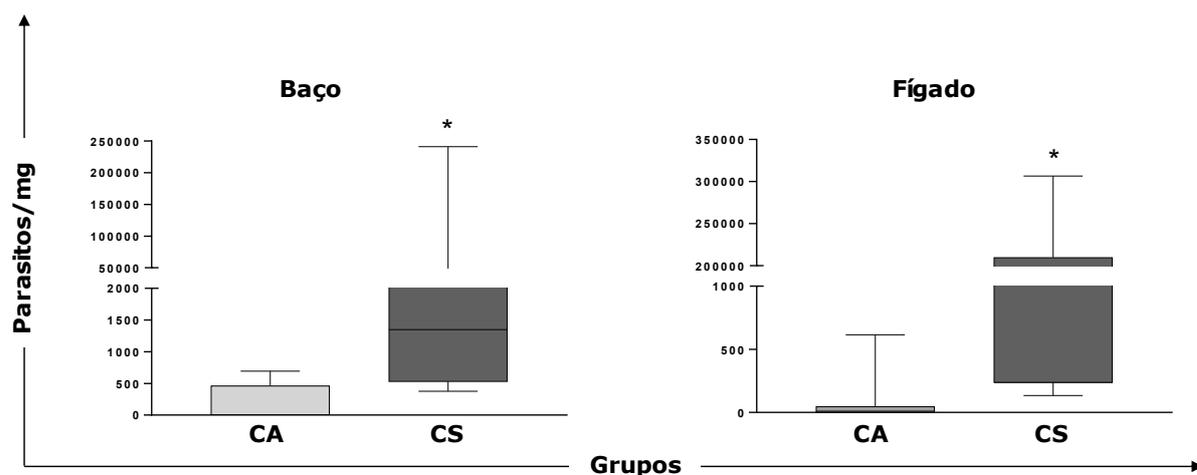


Figura 15: Carga parasitária esplênica e hepática avaliada por qPCR de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Através dos gráficos de box plots estão representadas as medianas, intervalos interquartis e os valores máximos e mínimos das cargas parasitárias de cada grupo em número de parasitos por mg de órgão. No eixo x estão representados os dois grupos experimentais (CA e CS). O asterisco (*) representa as diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos.

4.2 Avaliação do grau de esplenomegalia em cães infectados com *L. infantum*

Para avaliar alterações na espessura do baço, na presença ou ausência de sinais clínicos característicos de LVC foi empregada a ultrassonografia e posterior medição transversal, a partir das imagens recolhidas. A figura 16A representa, desta forma imagens representativas da espessura esplênica avaliada por ultrassonografia. Perante isto, observa-se na figura 16B que cães infectados (CA e CS) apresentam um aumento significativo ($p < 0,05$) na espessura do baço em relação a cães não infectados (CNI). Além disso, verificamos que os cães do grupo CS apresentam um aumento significativo ($p < 0,05$) na espessura do baço, quando comparado aos cães do grupo CA. Foi ainda observada uma correlação positiva ($r = 0,7263$, $p = 0,0004$) entre a carga parasitária esplênica e o grau de esplenomegalia nos cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*.

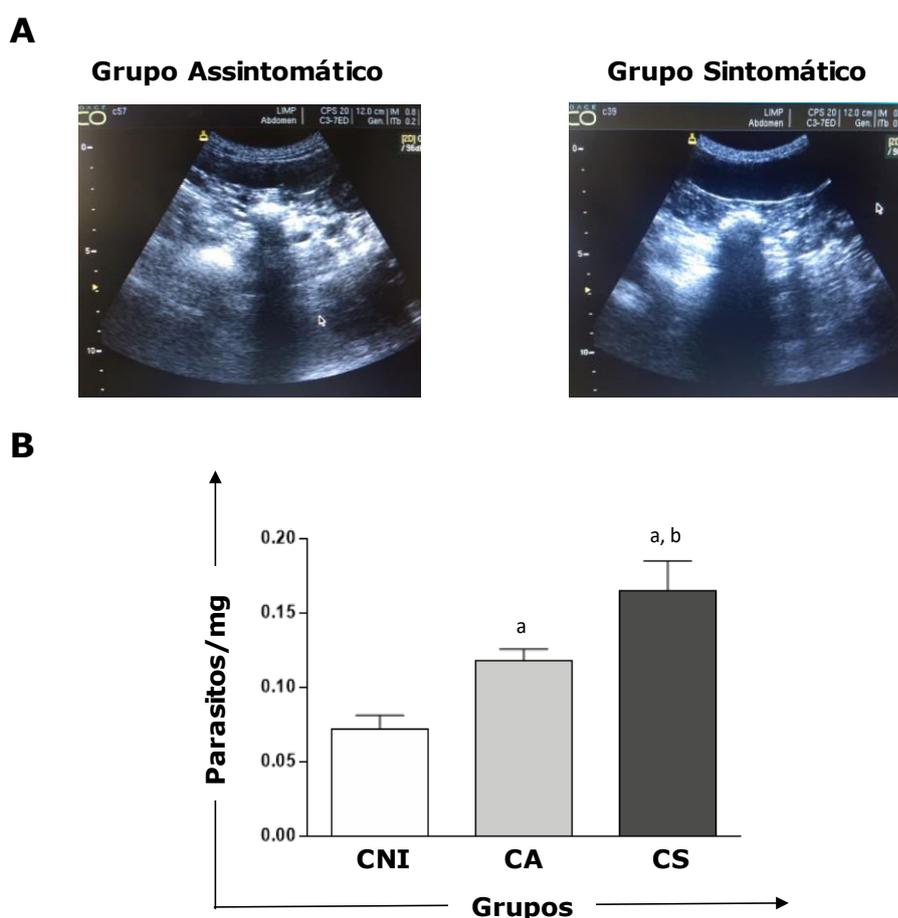


Figura 16: Avaliação por ultrassonografia da espessura do baço em cães não infectados e naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. As fotos são representativas de imagens de ultrassonografia do baço de um cão assintomático (CA) e um cão sintomático (CS). No gráfico de barras, o eixo x representa os grupos experimentais: controle não infectado (CNI), assintomático (CA) e sintomático (CS). No eixo y está representada a média e o erro padrão da razão entre a espessura do baço e o peso do animal. As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras “a” e “b”, relacionadas, respectivamente, aos grupos CNI e CA.

4.3 Avaliação laboratorial: Parâmetros hematológicos e bioquímicos

4.3.1 Parâmetros hematológicos: eritrograma e leucograma

Considerando a marcante leucopenia e principalmente a anemia características da LVH e da LVC, a análise do hemograma (leucograma e eritrograma) corresponde a um importante parâmetro no monitoramento da integridade funcional de órgãos chave na imunopatologia da doença, tal como na progressão da mesma. Na avaliação do eritrograma foi observada a existência de valores significativamente ($p<0,05$) inferiores nos grupos CA e CS em relação ao grupo CNI, em todos os parâmetros avaliados (Tabela 2).

Tabela 2: Eritrograma de cães não infectados e cães naturalmente infectados por *L. infantum*, pertencentes aos grupos assintomático e sintomático.

Eritrograma	Grupo Clínico		
	CNI	CA	CS
Eritrócitos (RBC $\times 10^6/\mu\text{L}$)	8,42 \pm 0,14	5,692 \pm 1,123 ^a	4,911 \pm 1,315 ^a
Hemoglobina (g/dL)	19,98 \pm 1,9	11,510 \pm 2,993 ^a	10,413 \pm 3,504 ^a
Hematócrito (%)	62,82 \pm 5,13	38,550 \pm 10,570 ^a	35,225 \pm 11,890 ^a
Plaquetas (Plt $\times 10^3/\text{mm}^3$)	340,57 \pm 88,44	133,40 \pm 90,127 ^a	123,5 \pm 101,956 ^a

Valores absolutos (média \pm desvio padrão) do eritrograma (global de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e plaquetas) de cães não infectados (CNI) e cães naturalmente infectados por *L. infantum*, assintomáticos (CA) ou sintomáticos (CS). As diferenças estatísticas significativas ($p<0,05$) estão representadas pela letra “a”, relacionada ao grupo CNI.

Em relação ao leucograma, a única alteração encontrada foi um número de monócitos circulantes significativamente ($p<0,05$) superior no grupo CS, em relação ao grupo CA. (Tabela 3).

Tabela 3: Leucograma de cães não infectados e naturalmente infectados por *L. infantum*, pertencentes aos grupos assintomático e sintomático.

Leucograma ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Grupo Clínico		
	CNI	CA	CS
Leucócitos Totais	10,2 \pm 2,214	8,489 \pm 5,319	8,489 \pm 2,620
Neutrófilos	5,731 \pm 0,983	4,759 \pm 1,672	5,849 \pm 3,557
Linfócitos	2,228 \pm 0,959	3,743 \pm 3,899	1,757 \pm 1,084
Monócitos	0,291 \pm 0,202	0,245 \pm 0,212	0,427 \pm 0,244 ^b
Eosinófilos	0,507 \pm 0,504	0,253 \pm 0,222	0,223 \pm 0,285

Valores absolutos (média \pm desvio padrão) do leucograma (leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos) de cães não infectados (CNI) e cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, assintomáticos (CA) ou sintomáticos (CS). As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) estão representadas pela letra “a”, relacionada ao grupo CNI.

4.3.2 Parâmetros bioquímicos

Para aferir a existência de danos funcionais no compartimento renal e hepático, assim como disfunções nas proteínas séricas foram realizadas as dosagens de ureia (mg/dL) e creatinina (mg/dL), a avaliação dos níveis séricos das enzimas: alanina amino transferase – ALT (U/L), aspartato amino transferase – AST (U/L), fosfatase alcalina – FA (U/L) e gama glutamil transferase – GGT (U/L) e a avaliação das proteínas séricas, albumina (g/dL) e globulina (g/dL), assim como da razão albumina/globulina. Nos seguintes subtópicos estão descritas as alterações encontradas na avaliação dos diferentes parâmetros bioquímicos.

4.3.2.1 Provas de função renal

A deposição de imunocomplexos antígeno/anticorpo no glomérulo renal pode levar ao desenvolvimento de insuficiências funcionais neste órgão, que podem ser avaliados através da aferição dos níveis séricos de ureia e creatinina. Na avaliação da função renal, não foi possível observar nenhuma diferença significativa ($p < 0,05$) nas dosagens destes parâmetros entre os grupos (Figura 17).

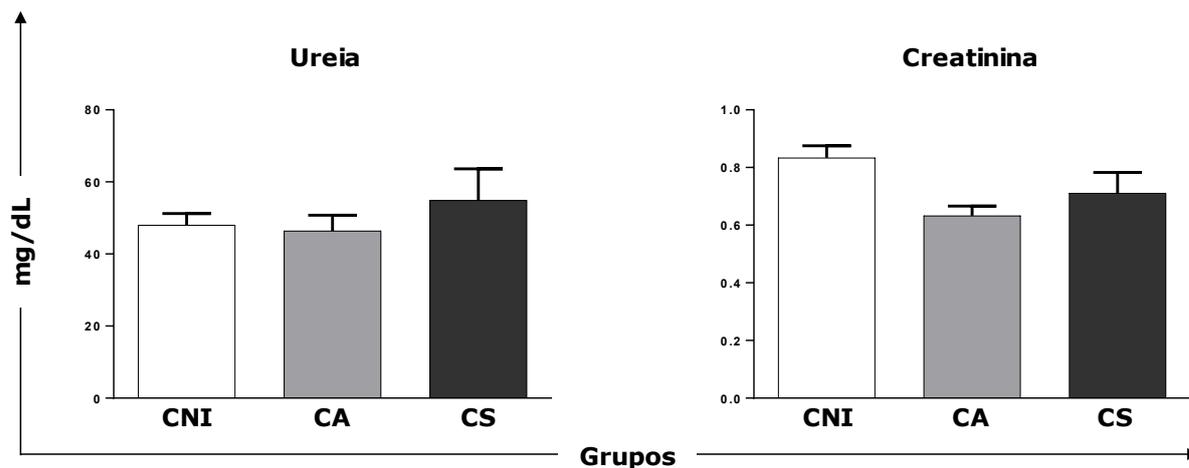


Figura 17: Avaliação da função renal através das concentrações séricas de uréia e creatinina em cães não infectados e naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. O eixo x ilustra os grupos experimentais: cães não infectados (CNI), cães assintomáticos (CA) e cães sintomáticos (CS). O eixo y representa os valores médios e desvio padrão das dosagens de uréia e creatinina, em miligrama por decilitro (mg/dL).

4.3.2.2 Provas de função hepática

O fígado, como vimos nos resultados referentes à carga parasitária, apresenta um intenso parasitismo no contexto da infecção por *L. infantum*. Este parasitismo pode levar a uma debilidade funcional, que pode ser avaliada através de marcadores, tais como, as concentrações séricas de aspartato transaminase (AST), alamina transaminase (ALT), fosfatase alcalina e gama glutamil transpeptidase (γ GT). Neste trabalho, não foi possível observar alterações significativas ($p < 0.05$) entre os grupos infectados (CA e CS) e o grupo CNI (Figura 18).

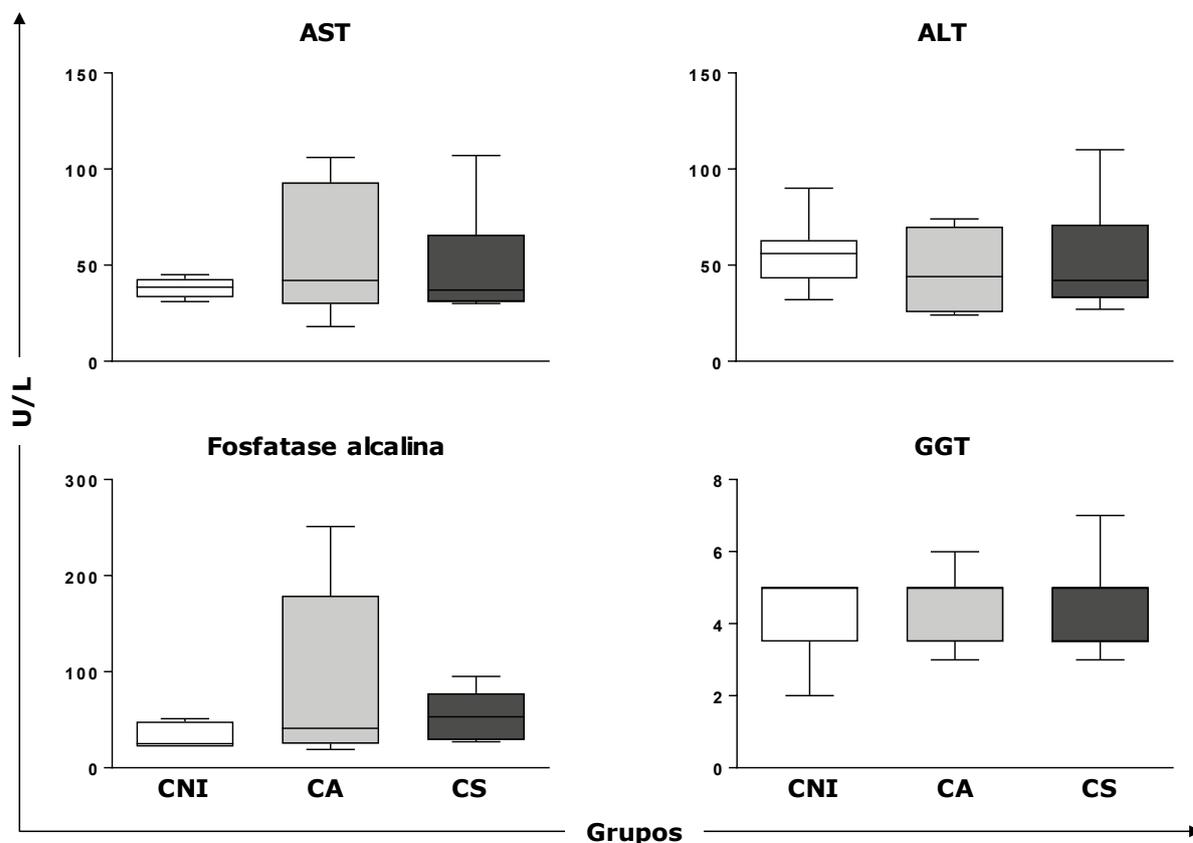


Figura 18: Avaliação da função hepática, através das concentrações séricas de aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT), fosfatase alcalina e gama glutamil transpeptidase (γ GT) em cães não infectados e naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. O eixo x ilustra os grupos experimentais: cães não infectados (CNI), cães assintomáticos (CA) e cães sintomáticos (CS) naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Através dos gráficos de box plots estão representadas as medianas, intervalos interquartis e os valores máximo e mínimo da concentração de cada um dos parâmetros de cada grupo em unidades por litro (U/L).

4.3.2.3 Proteinograma

Na figura 19 estão representados os resultados do proteinograma, correspondentes aos parâmetros avaliados: proteína total, albumina, globulina e razão albumina/globulina.

Com base nos dados obtidos neste trabalho, foi possível observar que os grupos dos cães naturalmente infectados (grupos CA e CS) apresentaram níveis significativamente ($p < 0,05$) superiores de proteínas totais e globulinas em relação ao grupo CNI. De forma contrária, os grupos CA e CS apresentaram concentrações séricas de albumina significativamente ($p < 0,05$) menores em relação ao grupo CNI. O mesmo padrão se verifica em relação à razão albumina/globulina, com valores significativamente ($p < 0,05$) menores nos grupos infectados (CA e CS) em relação ao grupo controle não infectado (CNI).

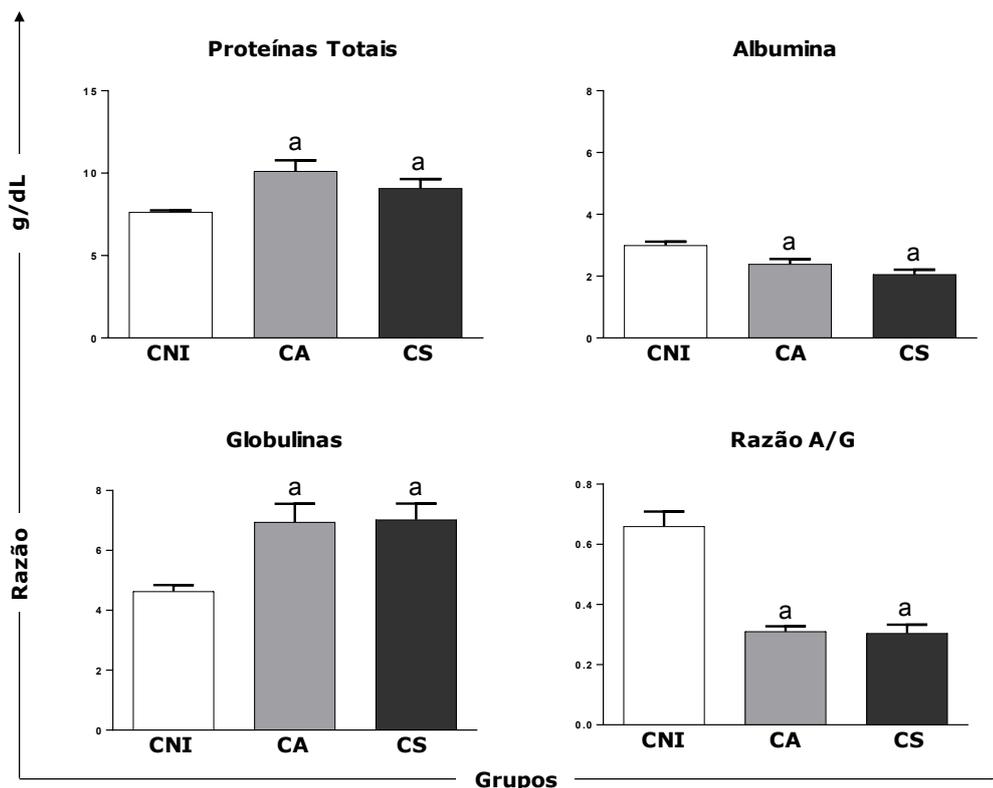


Figura 19: Avaliação do proteinograma através da concentração sérica de proteínas totais, albumina, globulinas e razão albumina/globulina em cães não infectados e naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. O eixo x ilustra os grupos experimentais: cães não infectados (CNI), cães assintomáticos (CA) e cães sintomáticos (CS). O eixo y representa os valores médios e desvio padrão das dosagens em grama por decilitro (g/dL) destes parâmetros. As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) estão representadas pela letra “a”, relacionada ao grupo CNI.

4.4 Avaliação *ex-vivo*, no compartimento esplênico, do perfil linfocitário e produção de citocinas intracelulares, bem como do perfil de macrófagos produtores de NO e ROS

4.4.1 Imunofenotipagem para caracterização do perfil de linfócitos T no compartimento esplênico

O baço é um dos órgãos mais acometidos durante a evolução clínica da LVC, sendo a resposta imune adaptativa à infecção comandada em particular por linfócitos T, nomeadamente as subpopulações CD4⁺ e CD8⁺. Em nosso estudo, foi avaliado o perfil linfocitário de cães pertencentes a formas clínicas polarizadas da doença, assintomáticos (CA) e sintomáticos (CA), além de cães controle não infectados (CNI). A percentagem de linfócitos T totais, foi avaliada pela frequência de células CD3⁺ no compartimento esplênico. Foi observado que o percentual destas células foi significativamente maior no baço de CA, em comparação a CNI. Ao ser avaliado o percentual das subpopulações de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ no baço dos cães pertencentes aos diferentes grupos clínicos, foi observado que os grupos CA e CS

apresentaram percentual significativamente ($p < 0.05$) menor de linfócitos T $CD3^+CD4^+$ em relação ao grupo CNI. Pelo contrário, ao avaliarmos a subpopulação de linfócitos T $CD3^+CD8^+$, observamos um aumento significativo ($p < 0.05$) do percentual dessa subpopulação no compartimento esplênico nos grupos CA e CS quando comparado ao grupo CNI (Figura 20).

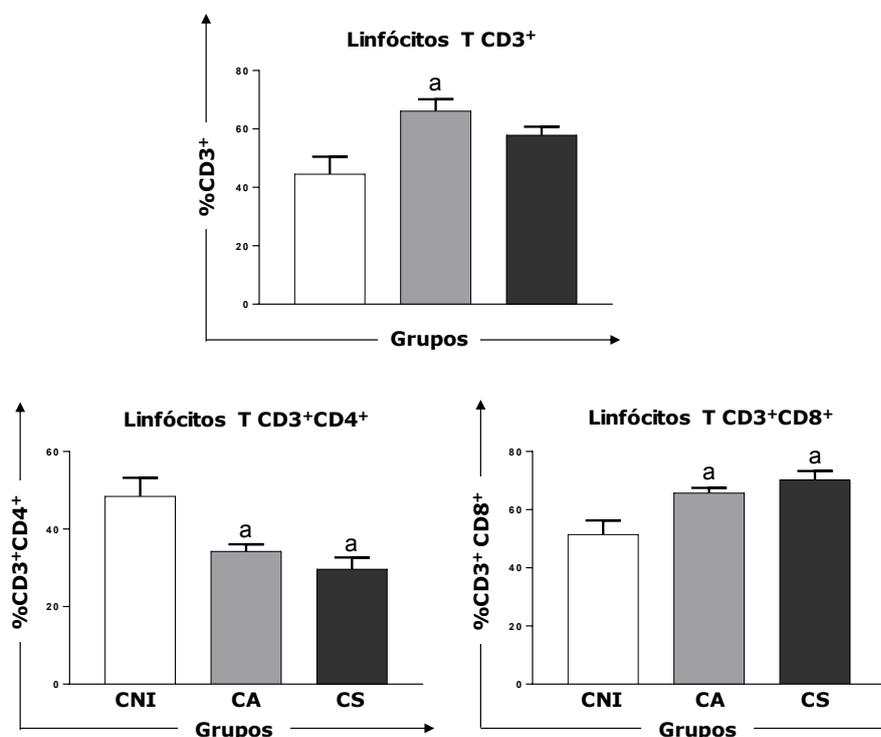


Figura 20: Percentual de linfócitos T totais ($CD3^+$) e das subpopulações $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ no baço de cães não infectados e naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. O eixo x ilustra os grupos experimentais: cães não infectados (CNI), cães assintomáticos (CA) e cães sintomáticos (CS). O eixo y representa o percentual médio e erro padrão de linfócitos T $CD3^+$, $CD4^+$ e $CD8^+$. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pela letra “a” relacionada ao grupo CNI.

4.4.2 Imunofenotipagem para caracterização do perfil de linfócitos produtores IL-4 e IFN- γ no compartimento esplênico

Com o intuito de melhor elucidar a resposta imune compartimentalizada no baço, e o papel que as subpopulações de linfócitos T podem desempenhar na resistência e susceptibilidade à LVC, avaliamos a produção intracelular de citocinas (IFN- γ e IL-4) nas subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$. Na Figura 21, podemos observar uma produção significativamente ($p < 0,05$) maior de IFN- γ por linfócitos T $CD4^+$ esplênicos no grupo CA em comparação com o grupo CS e CNI. Ao contrário, não foram verificadas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) na produção de citocinas por linfócitos T $CD8^+$. Em relação à razão entre a produção de IFN- γ e IL-4 por linfócitos T $CD8^+$, foi possível observar que esta é significativamente

($p < 0,05$) superior no grupo CA em relação ao grupo CNI (Figura 21).

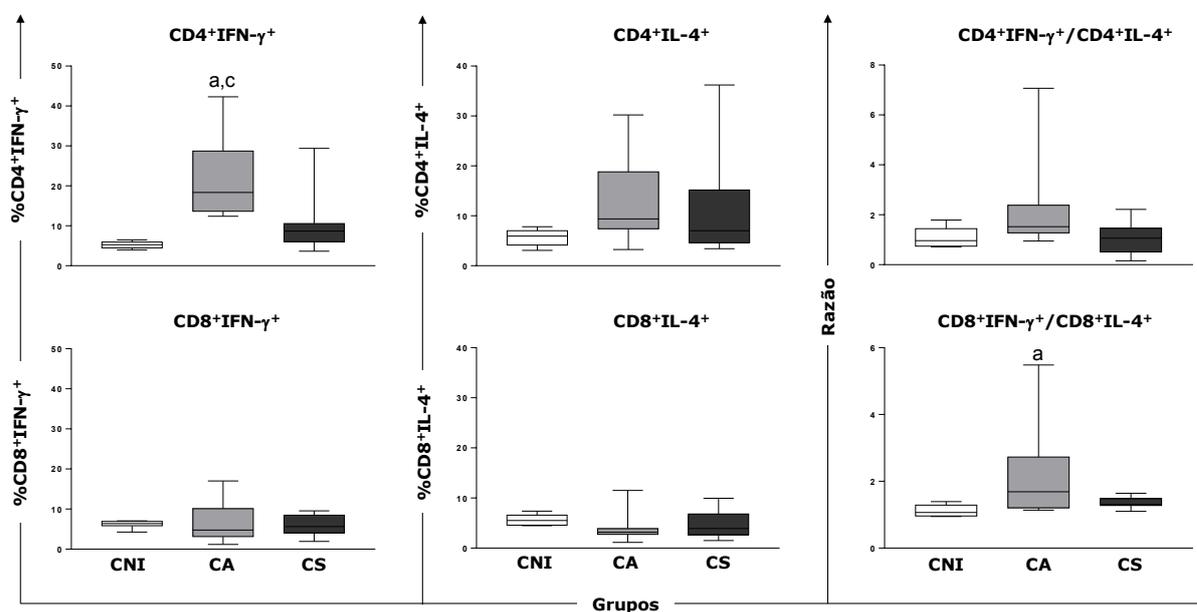


Figura 21: Perfil de linfócitos T esplênicos ($CD4^+$ e $CD8^+$), produtores de $IFN-\gamma$ e IL-4 em cães não infectados e naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. O eixo x ilustra os grupos experimentais: cães não infectados (CNI), cães assintomáticos (CA) e cães sintomáticos (CS). Através dos gráficos de box plots estão representadas as medianas, intervalos interquartis e os valores máximos e mínimos de cada grupo. Nos gráficos à esquerda e centrais da figura, o eixo y representa o percentual de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ produtores de $IFN-\gamma$ e IL-4. Nos dois gráficos da direita o eixo y representa a razão entre o percentual de linfócitos T $CD4^+$ produtores $IFN-\gamma$ e produtores de IL-4 e entre o percentual de linfócitos T $CD8^+$ produtores $IFN-\gamma$ e produtores de IL-4. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras “a” e “c”, relacionadas aos grupos CNI e CS, respectivamente.

4.4.3 Avaliação da expressão de mRNA de citocinas e iNOS no compartimento esplênico de cães naturalmente infectados com *L. infantum*.

Além do $IFN-\gamma$ e IL-4, cuja produção intracelular foi avaliada em linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ de cães naturalmente infectados com *L. infantum*, outras citocinas são importantes para o estabelecimento de uma resposta imune protetora ou prejudicial contra a LVC. Nesse sentido, foi considerado importante avaliar a expressão de RNAm de IL-12, $IFN-\gamma$, IL-10, IL-4 e $TGF-\beta$, assim como da enzima iNOS, no compartimento esplênico dos cães de diferentes grupos clínicos. Foi concluído que o grupo CA apresentou uma expressão significativamente ($p < 0,05$) maior de IL-12, comparativamente a CNI. Foi também verificado um aumento significativo ($p < 0,05$) na expressão de iNOS no grupo CA em relação aos grupos CS e CNI. Finalmente, o grupo CS demonstrou uma expressão de IL-10 significativamente ($p < 0,05$) superior aos grupos CNI e CA (Figura 22).

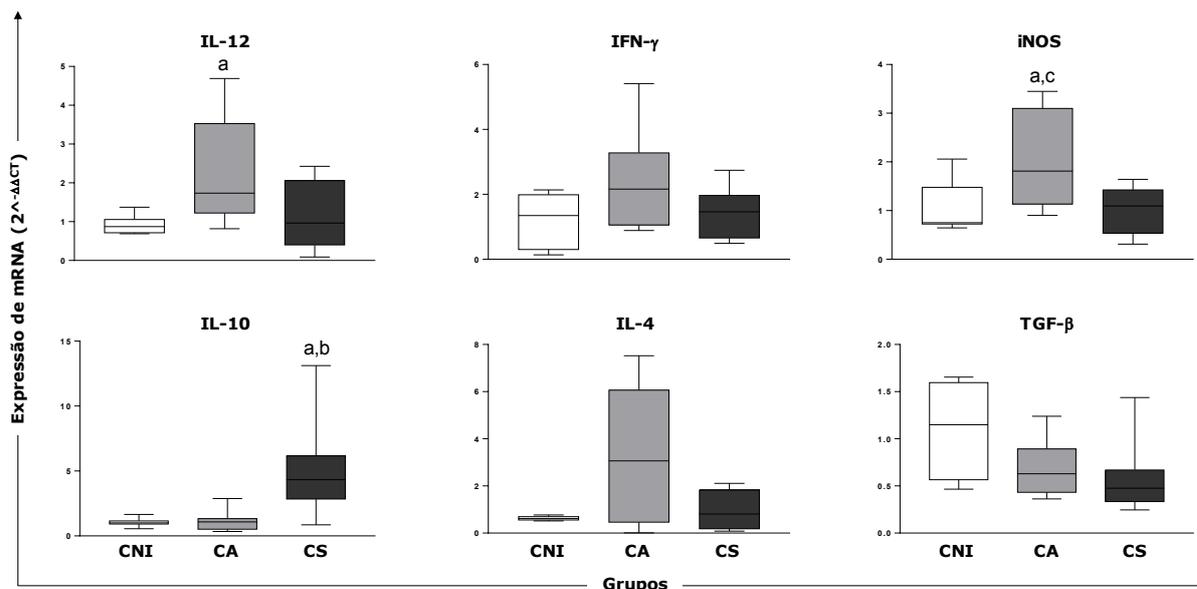


Figura 22: Expressão de mRNA de citocinas associadas à resistência e susceptibilidade no baço de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. O eixo x ilustra os grupos experimentais: cães não infectados (CNI), cães assintomáticos (CA) e cães sintomáticos (CS). Através dos gráficos de box plots estão representadas as medianas, intervalos interquartís e os valores máximos e mínimos de cada grupo relativos à expressão de mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$). As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras “a”, “b” e “c”, relacionadas aos grupos CNI, CA e CS, respectivamente.

4.4.4 Imunofenotipagem para caracterização do perfil de macrófagos produtores de NO e ROS no compartimento esplênico

Com objetivo de identificarmos possíveis fatores que estariam relacionados a resistência ou susceptibilidade à infecção por *L. infantum*, na resposta imune compartimentalizada do baço, foi empregada neste trabalho a imunofenotipagem no contexto *ex vivo* da produção dos mediadores microbicidas, NO e ROS, por macrófagos esplênicos. Em nossos resultados, foi observado um percentual de macrófagos esplênicos ($CD11b^+$) produtores de NO significativamente ($p < 0,05$) maior no grupo CA quando comparados ao grupo CS e CNI. Em relação à produção de ROS por macrófagos esplênicos, foi observado um aumento significativo da frequência de macrófagos produtores ($p < 0,05$) destes radicais livres, em cães dos grupos naturalmente infectados (CA e CS) em relação ao grupo CNI (Figura 23).

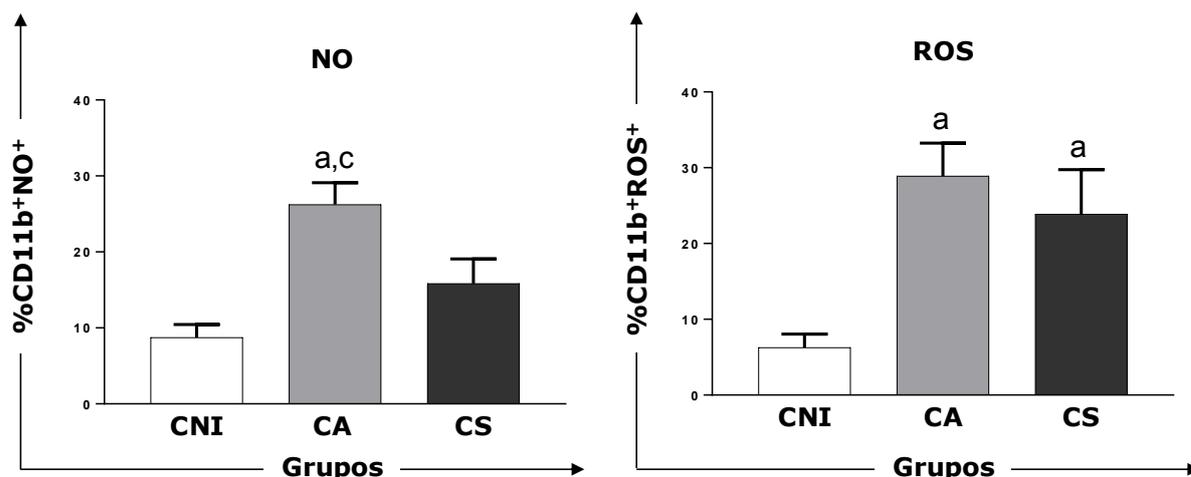


Figura 23: Perfil de macrófagos esplênicos (CD11b⁺), produtores de NO e ROS em cães não infectados e naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. O eixo x ilustra os grupos experimentais: cães não infectados (CNI), cães assintomáticos (CA) e cães sintomáticos (CS). O eixo y representa os valores médios e erro padrão do percentual de macrófagos CD11b⁺ produtores de NO (NO⁺) e ROS (ROS⁺). As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras “a” e “c”, relacionadas aos grupos CNI e CS, respectivamente.

4.5 Avaliação *ex-vivo*, no compartimento hepático, do perfil linfocitário e produção de citocinas intracelulares, bem como do perfil de macrófagos produtores de NO e ROS

4.5.1 Imunofenotipagem para caracterização do perfil de linfócitos T no compartimento hepático

Tal como o baço, o fígado é um dos órgãos chaves na imunopatologia da LVC, sendo também um dos órgãos mais parasitados e cuja afecção pode resultar em quadros clínicos mais severos. Nosso estudo buscou então avaliar o perfil linfocitário nesse órgão, sob a forma do percentual de linfócitos T totais (CD3⁺) e das subpopulações CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ no compartimento hepático em cães assintomáticos (CA), cães sintomáticos (CS) e cães não infectados (CNI). Foi possível observar um percentual significativamente ($p < 0,05$) maior de linfócitos T CD3⁺ nos cães naturalmente infectados (CA e CS) em comparação com os cães do grupo CNI. Em relação às subpopulações de linfócitos T, foi observado um percentual significativamente ($p < 0,05$) menor de linfócitos T CD4⁺ no grupo CS em relação aos grupos CA e CNI. Quanto ao percentual de linfócitos T CD8⁺ no compartimento hepático, observamos que o grupo CS apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) deste parâmetro, em relação aos grupos CNI e CA (Figura 24).

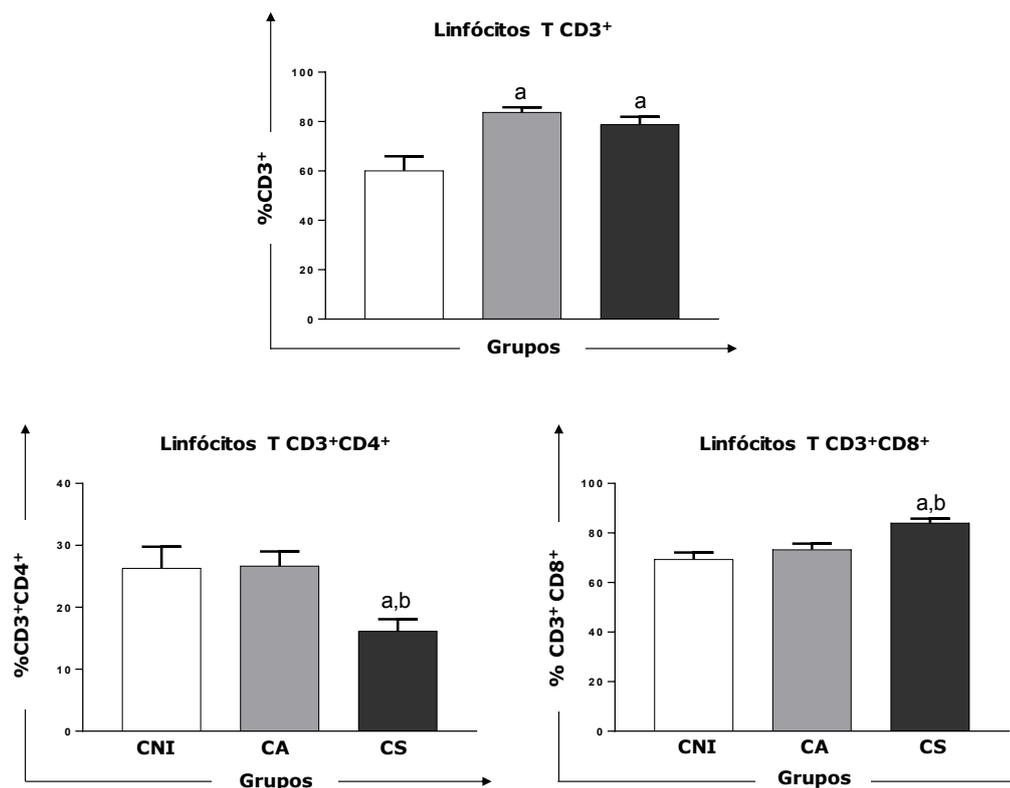


Figura 24: Percentual de linfócitos T totais (CD3⁺) e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ hepáticos em cães não infectados e naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. O eixo x ilustra os grupos experimentais: cães não infectados (CNI), cães assintomáticos (CA) e cães sintomáticos (CS). O eixo y representa o percentual médio e erro padrão de linfócitos T CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺. As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) estão representadas pela letra “a” e “b” relacionadas aos CNI e CA, respectivamente.

4.5.2 Imunofenotipagem para caracterização do perfil de linfócitos produtores IL-4 e IFN- γ no compartimento hepático

De forma a aprofundarmos o entendimento quanto à resposta imune hepática característica da infecção assintomática e sintomática, verificamos o percentual de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺, produtores de IFN- γ e IL-4 neste órgão. Desta forma, foi observado que linfócitos T CD4⁺ do compartimento hepático apresentaram uma expressão de IFN- γ significativamente maior ($p < 0,05$) em linfócitos T CD4⁺ do grupo CA em comparação com os grupos CNI e CS. Os cães infectados (grupos CA e CS) apresentaram ainda um percentual de linfócitos T CD8⁺ produtores de IL-4, significativamente ($p < 0,05$) menor comparado ao grupo CNI. Em relação à razão entre a expressão de IFN- γ e IL-4 por linfócitos T CD4⁺, esta foi significativamente ($p < 0,05$) maior no grupo CA em relação ao grupo CNI (Figura 25).

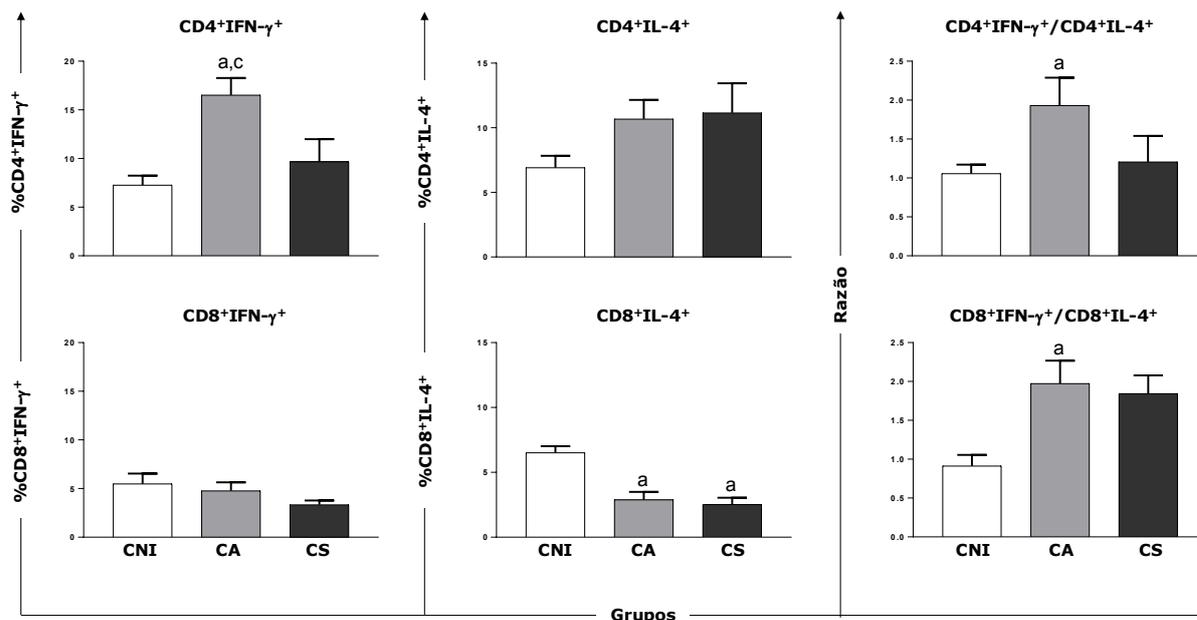


Figura 25: Perfil de linfócitos T hepáticos (CD4⁺ e CD8⁺), produtores de IFN-γ e IL-4 em cães não infectados e naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. O eixo x ilustra os grupos experimentais: cães não infectados (CNI), cães assintomáticos (CA) e cães sintomáticos (CS). Nos gráficos à esquerda e centrais da figura, o eixo y representa os valores médios e erro padrão do percentual de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IFN-γ e IL-4. Nos dois gráficos da direita o eixo y representa os valores médios e erro padrão da razão entre o percentual de linfócitos T CD4⁺ produtores IFN-γ e produtores de IL-4 e entre o percentual de linfócitos T CD8⁺ produtores IFN-γ e produtores de IL-4. As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras “a” e “c”, relacionadas aos grupos CNI e CS, respectivamente.

4.5.3 Avaliação da expressão de mRNA de citocinas e iNOS no compartimento hepático de cães naturalmente infectados com *L. infantum*

Para avaliar de forma mais abrangente o *status* imunológico do fígado de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, resolvemos verificar a expressão de RNAm de citocinas associadas à resistência e à susceptibilidade, assim como de iNOS neste órgão. Assim, foi avaliada a expressão de IL-12, IFN-γ, IL-10, IL-4 e TGF-β, assim como da enzima iNOS, no compartimento hepático de todos os cães do estudo. Concluímos então que CA apresentaram uma expressão significativamente ($p < 0,05$) maior de IL-12 e IFN-γ, comparativamente a CNI (Figura 26).

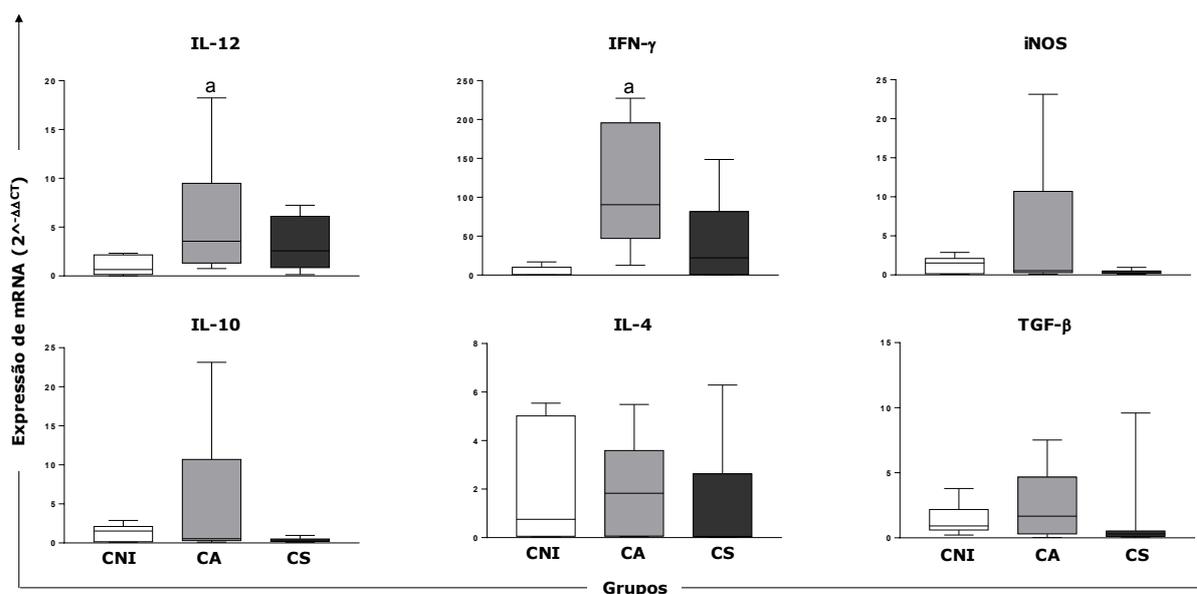


Figura 26 Expressão de mRNA de citocinas associadas à resistência e susceptibilidade no fígado de cães não infectados e cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. O eixo x ilustra os grupos experimentais: cães não infectados (CNI), cães assintomáticos (CA) e cães sintomáticos (CS). Através dos gráficos de box plots estão representadas as medianas, intervalos interquartis e os valores máximos e mínimos de cada grupo relativos à expressão de mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$). As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras “a”, relacionada ao grupo CNI

4.5.4 Imunofenotipagem para caracterização do perfil de macrófagos produtores de NO e ROS no compartimento hepático

De forma a identificarmos se o perfil de produção de citocinas estaria relacionado à produção de mediadores da atividade microbicida (NO e ROS) por macrófagos hepáticos nos cães dos grupos CNI, CA e CS, avaliamos o percentual de macrófagos hepáticos (CD11b⁺) produtores de NO e ROS. De forma esperada, foi observado que o aumento significativo ($p < 0,05$) na produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ de cães do grupo CA, é acompanhado por um aumento significativo ($p < 0,05$) na produção de NO e ROS por macrófagos hepáticos destes cães, em comparação com os grupos CS e CNI. Também no grupo CS foi observada uma produção significativamente ($p < 0,05$) maior de NO, em comparação com o CNI. Além disso, a produção de ROS é superior em macrófagos do grupo CA, em relação aos grupos CS e CNI (Figura 27).

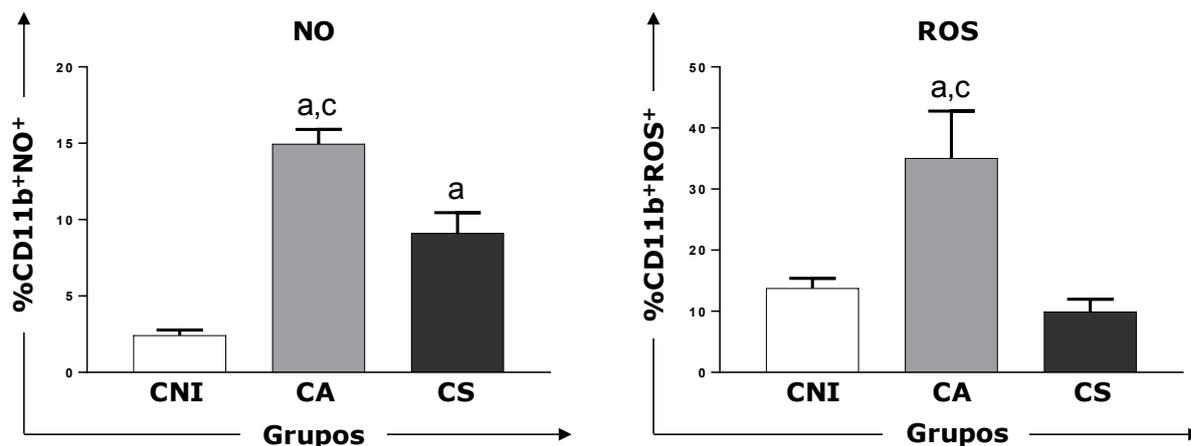


Figura 27: Perfil de macrófagos hepáticos (CD11b⁺), produtores de NO e ROS em cães não infectados e naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. O eixo x ilustra os grupos experimentais: cães não infectados (CNI), cães assintomáticos (CA) e cães sintomáticos (CS). O eixo y representa os valores médios e erro padrão do percentual de macrófagos CD11b⁺ produtores de NO (NO⁺) e ROS (ROS⁺). As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras “a” e “c”, relacionadas aos grupos CNI e CS, respectivamente.

4.6 Co-cultivo *in vitro* de células do sangue periférico

4.6.1 Evolução morfológica dos monócitos em cultura com M-CSF

De forma a avaliar as alterações morfológicas dos monócitos durante a sua transformação em macrófago, sob o efeito de M-CSF, realizamos avaliações por microscopia convencional destas células ao primeiro, terceiro e quinto dia de cultivo.

Durante os cinco dias de cultivo foi observado aumento gradativo no tamanho dos monócitos/macrófagos aderidos nas lamínulas. No primeiro dia de cultura, foi observado que estas células apresentavam características de monócitos, com menor tamanho, núcleo maior em relação ao citoplasma e presença de menor quantidade de vacúolos (Figura 28A). Entretanto, nas culturas de três dias de maturação estas células já apresentavam sensível alteração morfológica no tamanho, vacuolização do citoplasma e irregularidade nas formas (Figura 28B). No quinto dia de maturação, as alterações morfológicas anteriores persistiram, entretanto, foi observado aumento do número de células multinucleadas, além de vacuolização mais evidente do citoplasma e um tamanho mais elevado (Figura 28C).

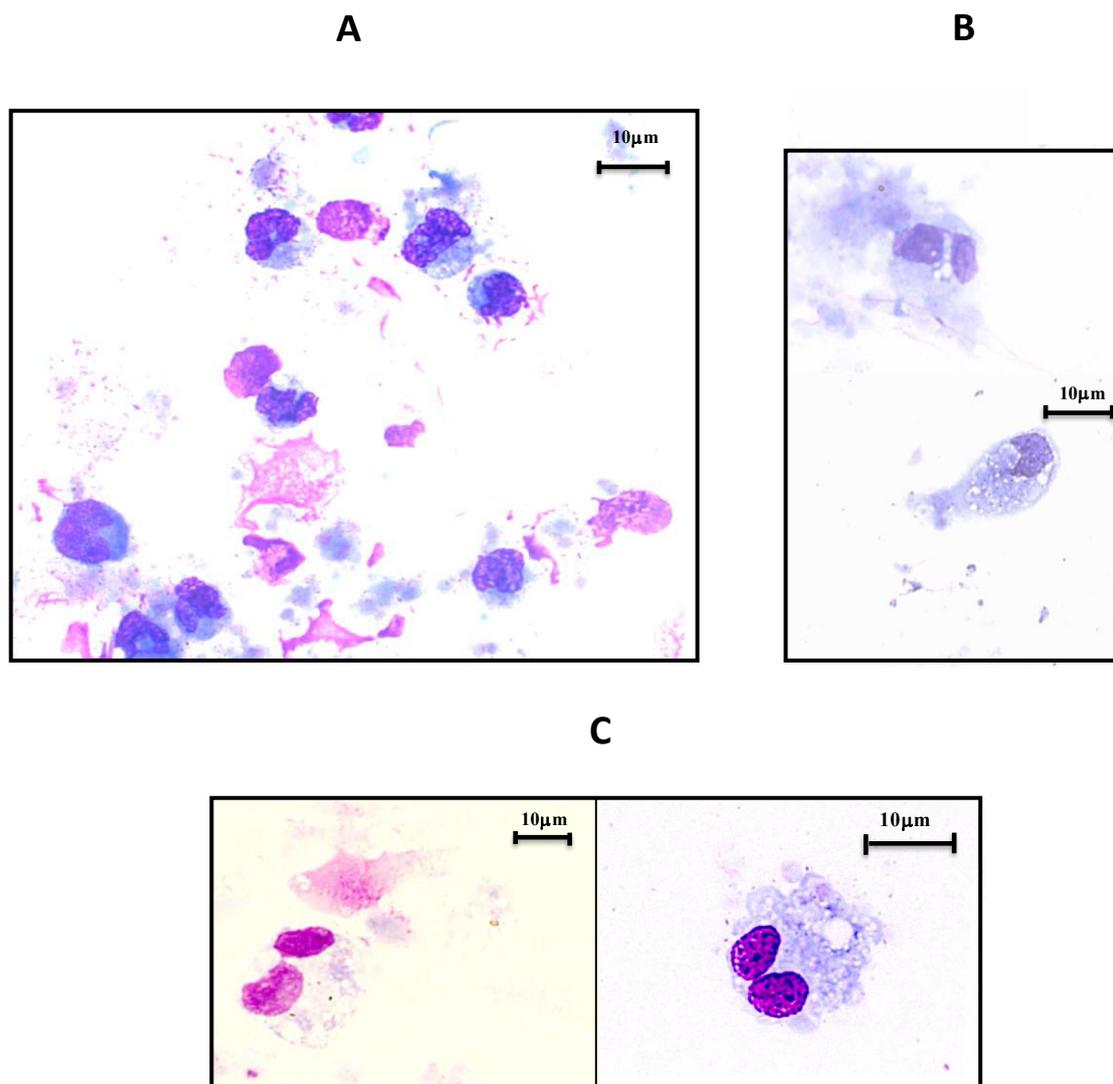


Figura 28: Fotomicrografias da diferenciação de monócitos em macrófagos em cultura. As células foram coradas com Panótico Rápido, no primeiro dia de cultura, após 3 dias de cultura e 5 dias de cultura e avaliadas por microscopia ótica (x100 imersão em óleo). (A) Cultura de monócitos, apresentando células menores com pequena quantidade e volume de vacúolos e o núcleo ocupando a maior área da célula. (B) Cultura de 3 dias com M-CSF, apresentando maior quantidade de vacúolos e alterações no formato das células, com presença de algumas células multinucleadas. (C) Cultura de 5 dias com M-CSF, diferenças marcadas na morfologia da célula, aumento de tamanho e presença de células multinucleadas.

4.5.2 Percentual de infecção de *L. infantum* GFP⁺ em macrófagos CD14⁺, derivados de monócitos do sangue periférico, co-cultivados com linfócitos T CD4⁺ e/ou CD8⁺ autólogos

Após a realização do co-cultivo celular entre macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico infectados com *L. infantum* GFP⁺, com linfócitos T CD4⁺ e/ou CD8⁺, foi avaliado o percentual de infecção por citometria de fluxo, considerando o percentual de macrófagos CD14⁺GFP⁺ (devido à presença de formas amastigotas GFP⁺ fluorescentes do parasito no interior dos macrófagos). Foram ainda realizadas fotomicrografias representativas

da presença de formas promastigotas, assim como, de formas amastigotas de *L. infantum* no interior do macrófago, por microscopia convencional (Figura 29)

Na figura 30, estão expressos os resultados desse percentual de macrófagos infectados, expressos através do “Índice de infecção” (Equação 1): razão entre o percentual de macrófagos CD14⁺GFP⁺ quando co-cultivados com subpopulações de linfócitos T - CD4⁺ e/ou T CD8⁺ e o percentual de macrófagos CD14⁺GFP⁺ na ausência de linfócitos T. Além disso, foi ainda avaliada a intensidade de infecção, através da avaliação da intensidade média de fluorescência (IMF) no canal FL-1 (GFP), para isto foi calculado o “Índice de IMF” (Equação 2): razão entre o IMF (GFP) de células CD14⁺GFP⁺ quando co-cultivados com subpopulações de linfócitos T - CD4⁺ e/ou T CD8⁺ e o IMF (FL-1) de células CD14⁺GFP⁺ na ausência de linfócitos T.

Em todos os sistemas de co-cultivo (Mφ + CD4⁺, Mφ + CD8⁺ e Mφ + CD4⁺ + CD8⁺) evidenciamos um índice de infecção significativamente ($p < 0,05$) maior no grupo CS quando comparado ao grupo CA (Figura 30A). Da mesma forma, ao avaliarmos a intensidade de infecção, utilizando o índice de IMF, foi verificado que, em todos os sistemas de co-cultivo, este parâmetro foi significativamente ($p < 0,05$) superior no grupo CS, em relação ao grupo CA. Além disso, no sistema de co-cultivo Mφ + CD4⁺ + CD8⁺, encontramos um índice de IMF significativamente ($p < 0,05$) menor no grupo CA, em relação ao grupo CNI (Figura 30B).

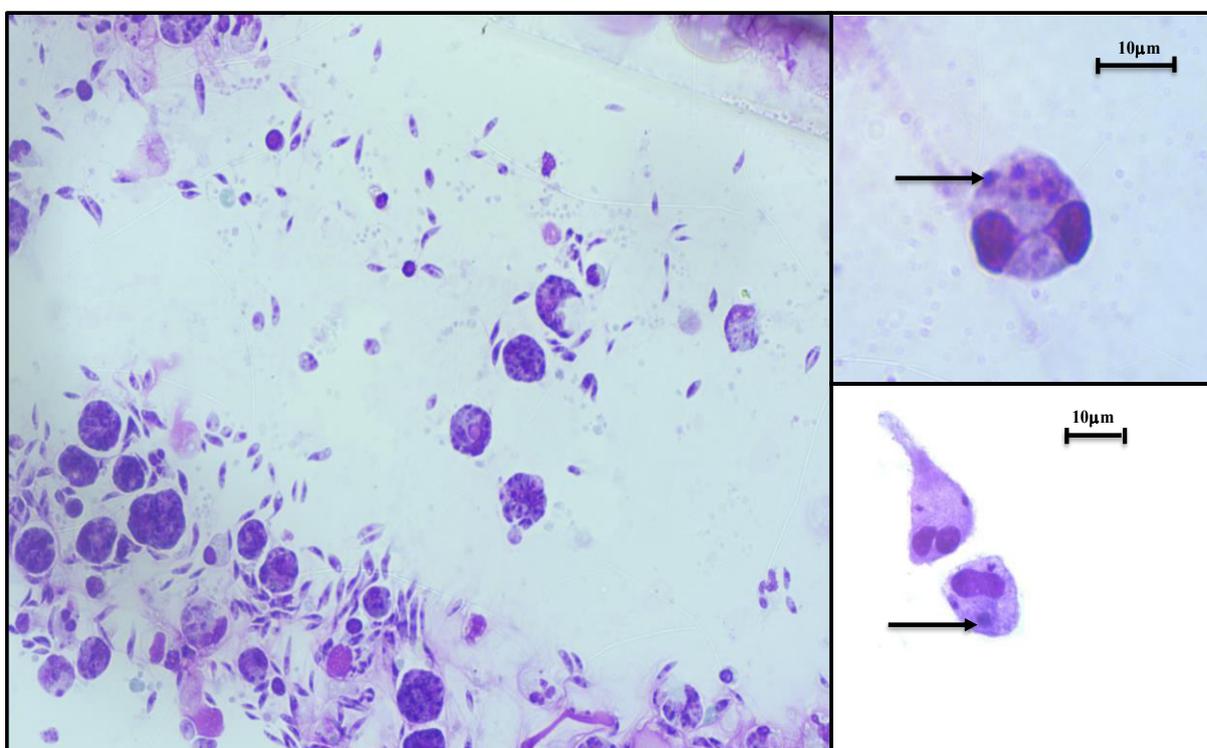
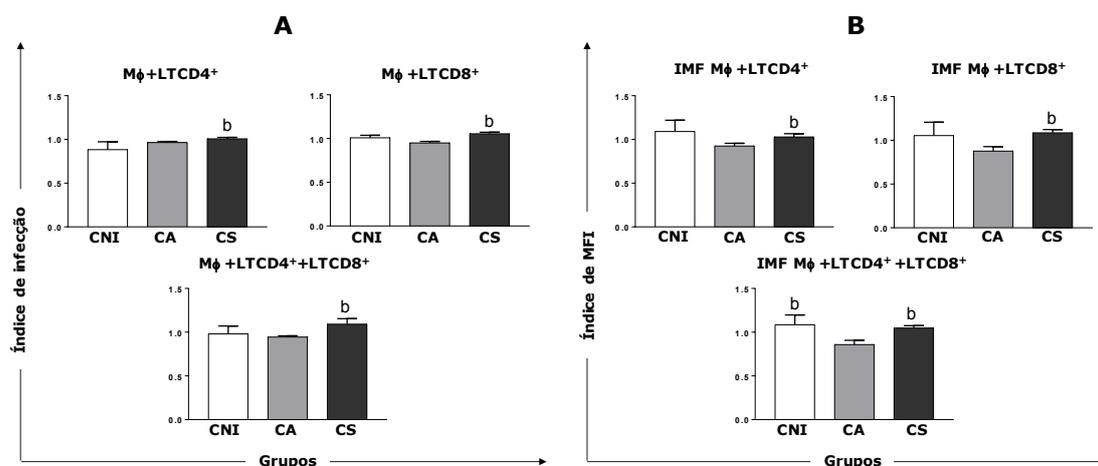


Figura 29: Fotomicrografias por microscopia convencional representativas da infecção de macrófagos derivados de monócitos circulantes infectados com *Leishmania infantum* GFP⁺. Na figura da esquerda podemos observar no aumento de 40X, com 3 horas de infecção, macrófagos e formas promastigotas de *L. infantum* GFP⁺. Nas fotomicrografias da direita, no aumento de 100X, conseguimos observar melhor as formas amastigotas indicadas nas setas) dentro dos macrófagos, após 48 horas.



Equação 1:
$$\text{Índice de infecção} = \frac{\text{Taxa de infecção do co-cultivo de M}\phi \text{ infectados+linfócitos T CD4 e/ou CD8}}{\text{Taxa de infecção do co-cultivo de M}\phi \text{ infectados}}$$

Equação 2:
$$\text{Índice de IMF} = \frac{\text{Intensidade média de fluorescência de M}\phi \text{ infectados+linfócitos TCD4 e/ou CD8}}{\text{Intensidade média de fluorescência de M}\phi \text{ infectados}}$$

Figura 30: Avaliação da infecção de macrófagos derivados de monócitos circulantes, infectados com *Leishmania infantum* GFP⁺ quando em co-cultivo com diferentes subpopulações de linfócitos T (CD4⁺ e/ou T CD8⁺). O eixo x ilustra os grupos experimentais: cães não infectados (CNI), cães assintomáticos (CA) e cães sintomáticos (CS). **(A)** Avaliação do Índice de infecção: O eixo y representa os valores médios e o erro padrão do índice de infecção (razão entre o percentual de macrófagos CD14⁺GFP⁺ quando co-cultivados com subpopulações de linfócitos T - CD4⁺ e/ou T CD8⁺ e o percentual de macrófagos CD14⁺GFP⁺ na ausência de linfócitos T - Equação 1) **(B)** Avaliação do Índice de IMF: O eixo y representa os valores médios e o erro padrão do índice de Intensidade média de fluorescência (razão entre o IMF (FL-1) de células CD14⁺GFP⁺ quando co-cultivados com subpopulações de linfócitos T - CD4⁺ e/ou T CD8⁺ e o IMF (FL-1) de células CD14⁺GFP⁺ na ausência de linfócitos T - Equação 2). As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) estão representadas pela letra “b”, relacionada ao grupo CA.

4.5.3 Avaliação de produção de citocinas intracitoplasmáticas por linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺, co-cultivados com macrófagos derivados de monócitos circulantes e *L. infantum* GFP⁺

Com o objetivo de verificar se linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ provenientes do PBMC de cães dos grupos CNI, CA e CS apresentavam variações na capacidade de produção das citocinas IFN- γ e IL-4, avaliamos por citometria de fluxo o percentual de linfócitos (CD4⁺ e CD8⁺) produzindo essas citocinas (IFN- γ e IL-4) nos sistemas de co-cultivo propostos.

Na figura 31 estão demonstrados os resultados do sistema de co-cultivo com apenas linfócitos T CD4⁺ ou T CD8⁺. Nossos resultados demonstraram um aumento significativo ($p < 0,05$) na frequência de linfócitos T CD4⁺ produzindo IFN- γ , em relação às mesmas células de cães do grupo CNI, em condições experimentais semelhantes. Quando avaliamos a produção de IL-4 em linfócitos T CD4⁺, verificamos que o percentual de linfócitos T CD4⁺ produtores

de IL-4 é significativamente ($p < 0,05$) maior no grupo CS, quando comparado aos grupos CNI e CA. Também constatamos que a razão entre a produção de IFN- γ e IL-4 por linfócitos T CD4⁺, co-cultivados com macrófagos e *L. infantum* GFP, era significativamente ($p < 0,05$) superior no grupo CA, quando comparado ao grupo CS (Figura 31).

Em relação à produção de citocinas por linfócitos T CD8⁺, foi observado um maior percentual destas células com produção de IFN- γ , nos grupos infectados (CA e CS), comparativamente ao grupo CNI (Figura 31). Também observamos que o grupo CS apresentou uma percentagem de linfócitos T CD8⁺ produtores de IL-4 significativamente ($p < 0,05$) maior em relação ao grupo CNI.

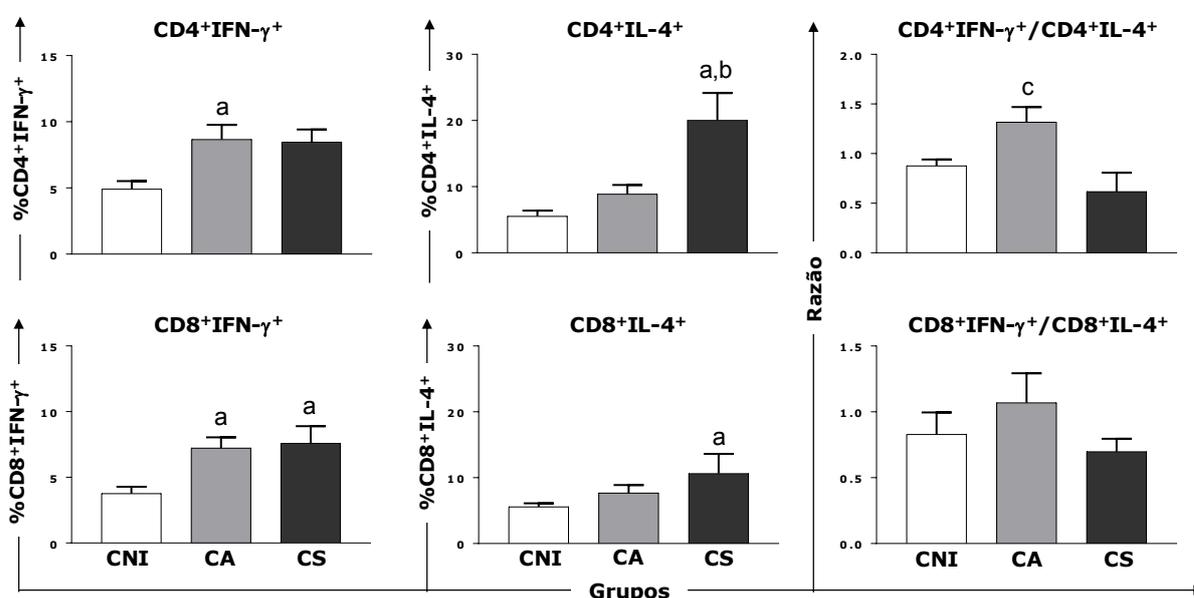


Figura 31: Perfil de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN- γ e IL-4 quando cultivados isoladamente (M ϕ + CD4⁺ e M ϕ + CD8⁺), num contexto de co-cultivo com macrófagos derivados de monócitos circulantes e *L. infantum* GFP⁺. O eixo x ilustra os grupos experimentais: cães não infectados (CNI), cães assintomáticos (CA) e cães sintomáticos (CS). O eixo y representa os valores médios e erro padrão do percentual de linfócitos T CD4⁺ ou T CD8⁺ produtores de IFN- γ ou IL-4. As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) estão representadas pela letra “a”, “b” e “c”, relacionadas aos grupos CNI, CA e CS, respectivamente.

Na figura 32 estão demonstrados os resultados do percentual de linfócitos (CD4⁺ e CD8⁺) produtores de citocinas (IFN- γ e IL-4) quando ambas subpopulações de linfócitos foram colocadas no mesmo sistema de co-cultivo, na presença de macrófagos derivados de monócitos sanguíneos infectados com *L. infantum* GFP⁺ (M ϕ + CD4⁺ + CD8⁺). Tal como nos sistemas de co-cultivo M ϕ + CD4⁺ e M ϕ + CD8⁺, podemos observar um maior percentual ($p < 0,05$) de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ no grupo CA, quando comparado ao grupo CNI e um percentual significativamente maior de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-4 no grupo CS, em relação aos grupos CNI e CA. Além disso, foi verificado um maior percentual de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ , nos cães naturalmente infectados (grupos CA e CS) em comparação

aos CNI. Já na produção de IL-4 por linfócitos T CD8, foi observado um maior percentual destas células produtoras de IL-4 no grupo CS em comparação com os grupos CNI e CA. Também observamos que a razão dos percentuais de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ e IL-4, foi significativamente ($p < 0,05$) maior no grupo CA, em relação ao grupo CS. Já em relação à razão entre a produção de IFN- γ e IL-4 por linfócitos T CD8⁺, foi verificado um aumento significativo ($p < 0,05$) no grupo CA, em relação ao grupo CNI.

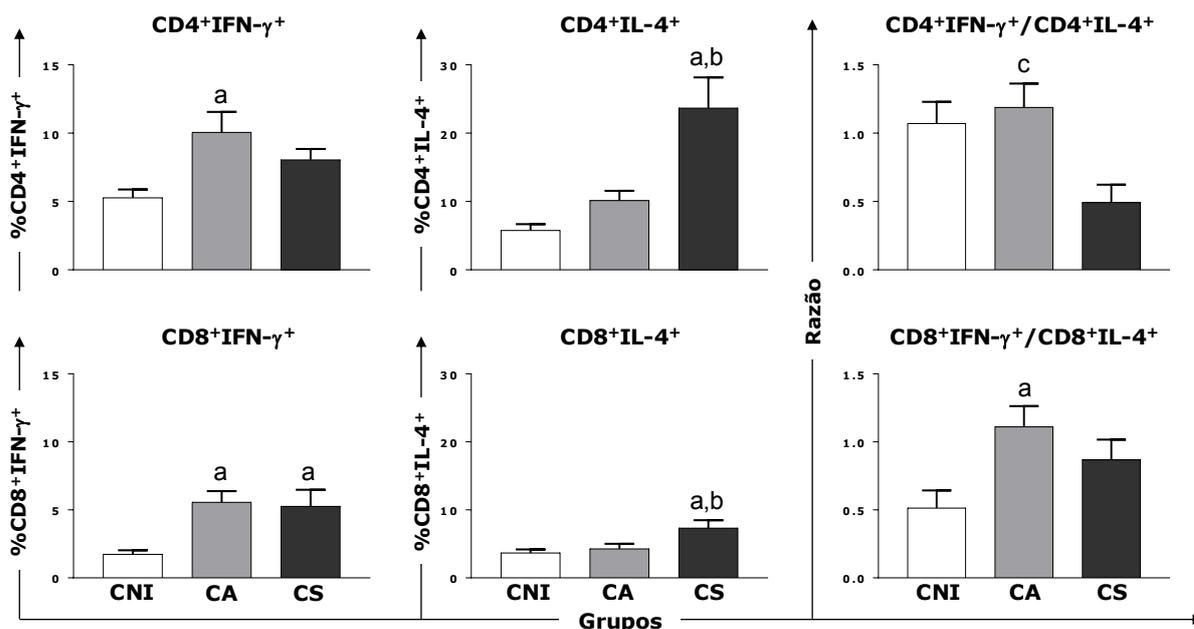


Figura 32: Perfil de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN- γ e IL-4⁺ quando cultivados em conjunto, no contexto de co-cultivo com macrófagos derivados de monócitos sanguíneos e *L. infantum* GFP (M ϕ + CD4⁺ + CD8⁺). O eixo x ilustra os grupos experimentais: cães não infectados (CNI), cães assintomáticos (CA) e cães sintomáticos (CS). O eixo y representa os valores médios e erro padrão do percentual de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IFN- γ e IL-4. As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) estão representadas pela letra “a”, “b” e “c”, relacionadas aos grupos CNI, CA e CS, respectivamente.

4.5.4 Avaliação de produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) em macrófagos derivados de monócitos sanguíneos, co-cultivados com linfócitos T (CD4⁺ e/ou CD8⁺) e *L. infantum* GFP⁺

4.5.4.1 Óxido Nítrico (NO)

Reconhecidamente, a produção de NO pelo macrófago é a forma mais eficaz de eliminação de formas amastigotas de *L. infantum*. Assim, de forma a avaliar se há uma relação entre a produção de NO por macrófagos derivados de monócitos sanguíneos e as diferentes formas clínicas da doença canina, bem como elucidar o papel das subpopulações circulantes de linfócitos nessa relação, avaliamos a produção de NO em cada um dos diferentes sistemas de

co-cultivo, nos diferentes grupos experimentais.

Nesse contexto, foi observado em todos os co-cultivos com linfócitos T, seja T CD4⁺, T CD8⁺ ou a associação, um aumento significativo ($p < 0,05$) na produção de NO pelos macrófagos CD14⁺GFP⁺ do grupo CA em relação ao grupo CNI. Além disso, nos sistemas de co-cultivo Mφ + CD4⁺ e Mφ + CD4⁺ + CD8⁺, o percentual de macrófagos produtores de NO em cães assintomáticos (grupo CA) foi superior, em relação aos cães sintomáticos (grupo CS). (Figura 33).

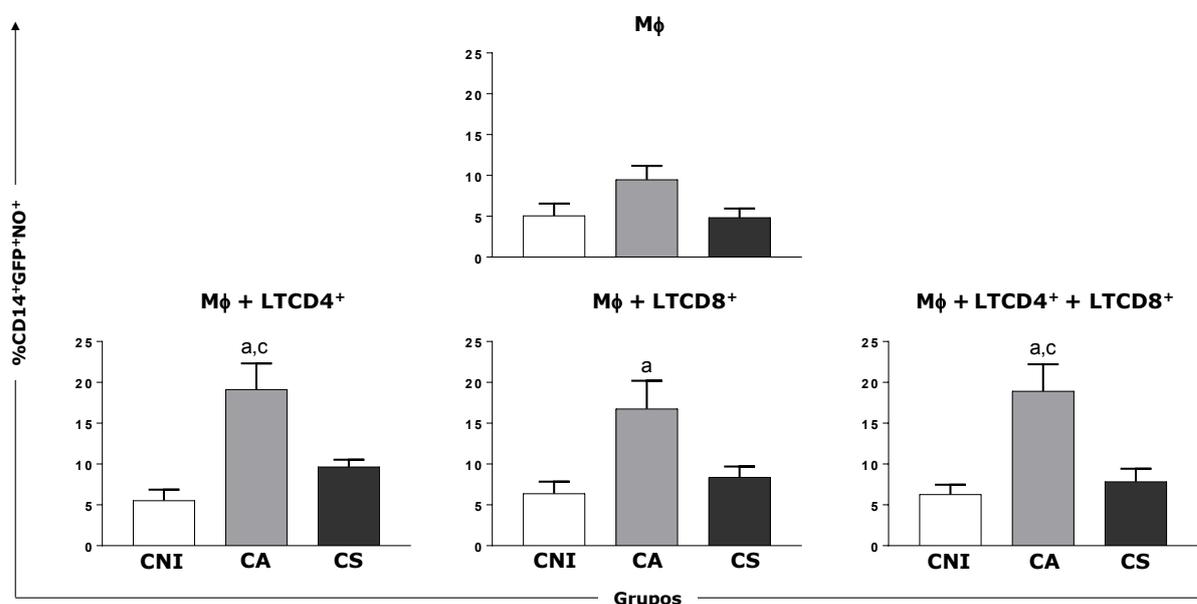


Figura 33: Perfil de macrófagos derivados de monócitos sanguíneos produtores de NO, no contexto de co-cultivo com linfócitos T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ infectados por amastigotas de *L. infantum* GFP⁺. O eixo x ilustra os grupos experimentais: cães não infectados (CNI), cães assintomáticos (CA) e cães sintomáticos (CS). O eixo y representa os valores médios e erro padrão do percentual de macrófagos infectados e produtores de NO. As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) estão representadas pela letra “a” e “c”, relacionadas aos grupos CNI e CS, respectivamente.

De forma a perceber se o grau de parasitismo nas células de cada um dos grupos clínicos está relacionado com a produção de óxido nítrico, os macrófagos derivados de monócitos infectados com *L. infantum* GFP⁺ dos grupos CNI, CA e CS foram divididos em Macrófagos Não Parasitados (MNP), Macrófagos com Baixo Parasitismo (MBP) e Macrófagos com Alto Parasitismo (MAP), e a produção de NO foi assim avaliada nos diferentes sistemas de co-cultivo.

Na ausência de linfócitos, no grupo CA e CS, foi encontrado um maior percentual de macrófagos produzindo NO em MAP, do que em MBP e MNP. Foi ainda verificado que MAP dos grupos CA e CS, apresentaram maior potencial para a produção de NO, comparativamente às mesmas células do grupo CNI.

Em todos os sistemas de co-cultivo, foi possível observar que a produção de NO nos MAP do grupo CA foi maior ($p < 0,05$) em comparação ao grupo CNI. Enquanto isso, especificamente no sistema de co-cultivo $M\phi + CD4^+ + CD8^+$, foi verificada a existência de um maior percentual de MAP produtores de NO no grupo CA, comparativamente ao grupo CS. Além disso, dentro dos grupos clínicos, também existiram diferenças na produção de NO por macrófagos com diferentes níveis de parasitismo. Desta forma, nos três tipos de co-cultivo, MAP do grupo CA, apresentam uma maior produção de NO, em comparação com os MBP e MNP. Em relação ao grupo CS, quando em co-cultivo com linfócitos T $CD4^+$ ou linfócitos T $CD8^+$, um maior percentual de MAP apresentam produção de NO em comparação com os MNP (Figura 34).

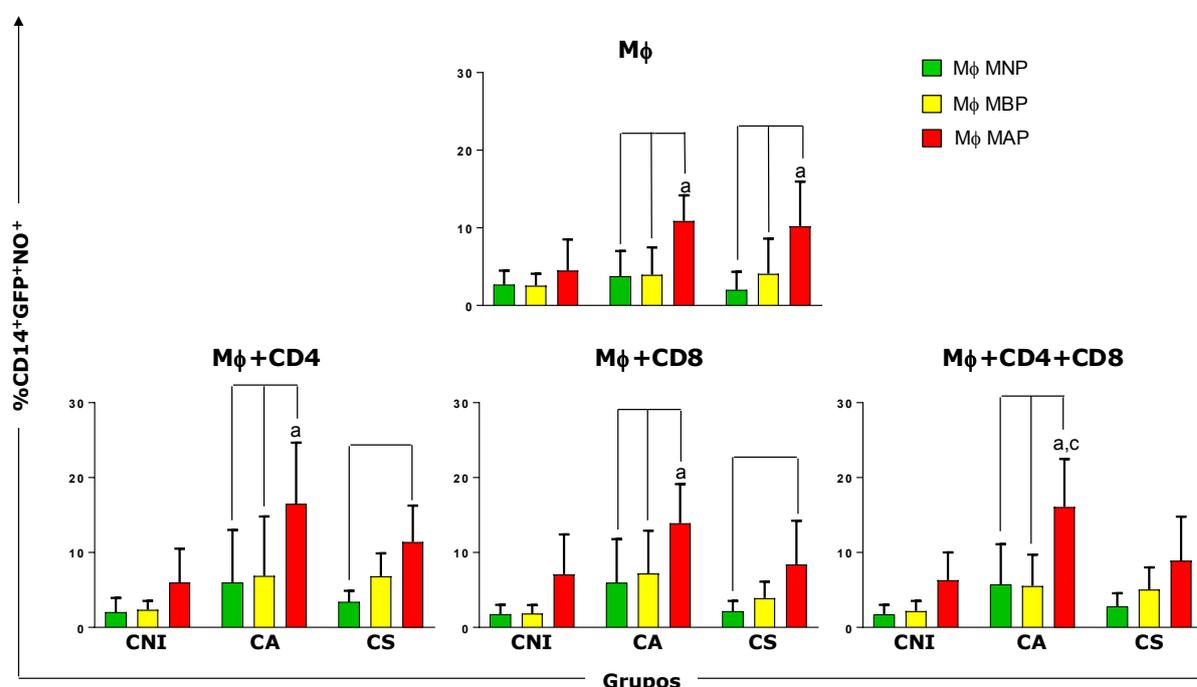


Figura 34: Perfil de macrófagos derivados de monócitos sanguíneos produtores de NO, no contexto de co-cultivo com linfócitos T $CD4^+$ e/ou T $CD8^+$ infectados por amastigotas de *L. infantum* GFP⁺, de acordo com o nível de parasitismo. Nas barras verdes encontramos o percentual de macrófagos não parasitados (MNP) produtores de NO, nas barras amarelas encontramos o percentual de macrófagos com baixo parasitismo (MBP) produtores de NO e nas barras vermelhas o percentual de macrófagos altamente parasitados (MAP) produtores de NO. O eixo x ilustra os grupos experimentais: cães não infectados (CNI), cães assintomáticos (CA) e cães sintomáticos (CS). O eixo y representa os valores médios e erro padrão do percentual de macrófagos infectados e produtores de NO. As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre macrófagos com o mesmo nível de parasitismo estão representadas pelas letras "a", e "c", correspondentes aos grupos CNI e CS, respectivamente. As diferenças entre a produção de NO por macrófagos com diferentes níveis de parasitismo, dentro do mesmo grupo clínico, estão representadas pelos traços.

4.5.4.2 Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Outro mecanismo encontrado pelo macrófago para eliminação de formas amastigotas de *L. infantum* intracelulares é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Nesse

sentido, empregamos o co-cultivo de macrófagos derivados de monócitos sanguíneos, com linfócitos T CD4⁺ e/ou T CD8⁺, conjuntamente com promastigotas de *L. infantum* GFP⁺, com o intuito de melhor entendermos a capacidade dos macrófagos para produzir ROS frente ao parasito *in vitro*, assessorado por subpopulações de linfócitos T, em cães resistentes (CA) ou susceptíveis a LVC (CS).

Nossos resultados demonstraram um aumento significativo ($p < 0,05$) na produção de ROS pelos macrófagos infectados CD14⁺GFP⁺, quando foram co-cultivados com linfócitos T CD4⁺ no grupo CA em comparação com o grupo CS. Nos restantes sistemas de co-cultivo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Figura 35).

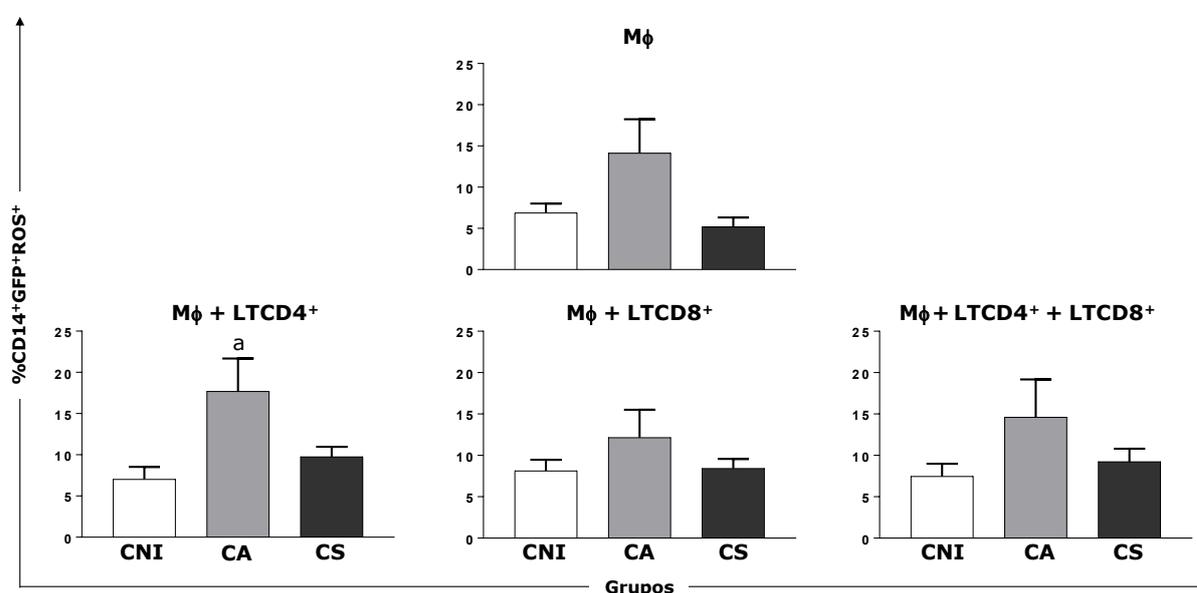


Figura 35: Perfil de macrófagos derivados de monócitos sanguíneos produtores de ROS, no contexto de co-cultivo com linfócitos T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ e *L. infantum* GFP⁺. O eixo x ilustra os grupos experimentais: cães não infectados (CNI), cães assintomáticos (CA) e cães sintomáticos (CS). O eixo y representa os valores médios e erro padrão do percentual de macrófagos infectados produtores de ROS. A diferença estatística significativa ($p < 0,05$) está representada pela letra “a”, relacionada ao grupo CNI.

Tal como acontece com a produção de NO, a infecção pelo parasito de *L. infantum* também tem a capacidade de interferir com a produção de ROS nos macrófagos após a infecção. Desta forma, foi avaliada a capacidade de resposta de macrófagos derivados de monócitos dos cães de diferentes formas clínicas, com diferentes níveis de parasitismo (MNP, MBP e MAP), no que tange à produção de ROS, quando em co-cultivo com linfócitos T CD4⁺ e/ou CD8⁺. No sistema de co-cultivo sem linfócitos T, foi observado um aumento na frequência de MAP produtores de NO em CA, comparativamente a CS. Já no sistema de co-cultivo Mφ+CD4⁺ foi constatada a existência de um maior percentual ($p < 0,05$) de macrófagos produtores de ROS nos

MAP do grupo CA, em comparação com os grupos CS e CNI. Em ambos os sistemas de cultivo anteriores foi verificada a existência de um maior percentual de MAP do grupo CA ($p<0,05$) produzindo ROS comparado aos MNP e MBP (Figura 36).

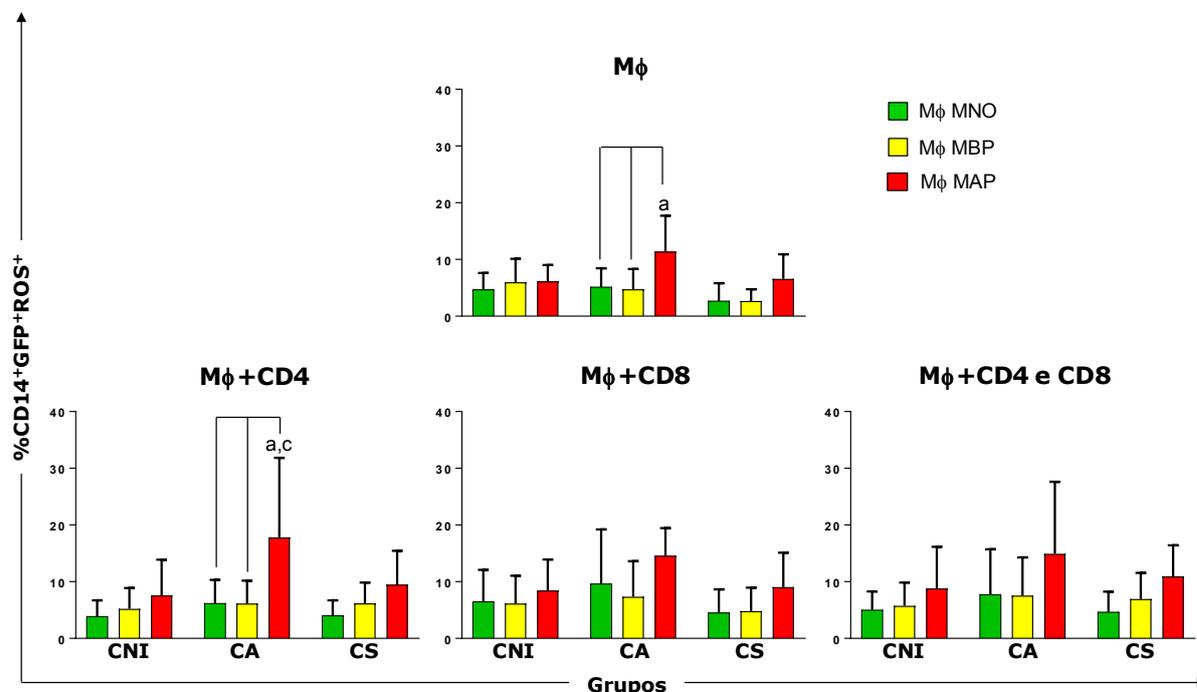


Figura 36: Perfil de macrófagos derivados de monócitos sanguíneos produtores de ROS, no contexto de co-cultivo com linfócitos T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ infectados por amastigotas de *L. infantum* GFP⁺, de acordo com o nível de parasitismo. Nas barras verdes encontramos o percentual de macrófagos não parasitados (MNP) produtores de ROS, nas barras amarelas encontramos o percentual de macrófagos com baixo parasitismo (MBP) produtores de ROS e nas barras vermelhas o percentual de macrófagos com alto parasitismo (MAP) produtores de ROS. O eixo x ilustra os grupos experimentais: cães não infectados (CNI), cães assintomáticos (CA) e cães sintomáticos (CS). O eixo y representa os valores médios e erro padrão do percentual de macrófagos infectados e produtores de ROS. As diferenças estatísticas significativas ($p<0,05$) estão representadas pela letra “a”, e “c”, relacionadas aos macrófagos com semelhantes níveis de parasitismo dos grupos, CNI e CS, respectivamente. As diferenças entre a produção de ROS por macrófagos com diferentes níveis de parasitismo, dentro do mesmo grupo clínico, estão representadas pelos traços.

4.6 Correlações entre a carga parasitária, esplenomegalia, parâmetros imunológicos esplênicos e hepáticos e relativos ao co-cultivo de células mononucleares do sangue periférico

Apesar das avaliações realizadas até agora terem permitido avaliar a relação de parâmetros parasitológicos, esplenomegalia e de variados parâmetros imunológicos com a presença ou ausência de sinais clínicos característicos de LVC, foi considerado importante entender também quais as correlações entre esses mesmos parâmetros nos compartimentos estudados e entre as metodologias realizadas, de forma a melhor esclarecer quais os fatores determinantes para o desenvolvimento de uma resposta imune associada à resistência ou

susceptibilidade perante a infecção natural por *L. infantum*.

No compartimento esplênico de cães infectados por *L. infantum* foi encontrada correlação positiva, com diferença significativa ($p < 0,05$), da carga parasitária com o grau de esplenomegalia e a expressão de RNAm de IL-10 (Quadro 6). Foram também encontradas correlações negativas, com diferença significativa ($p < 0,05$), entre o parasitismo no baço, com o percentual de linfócitos T CD4⁺ e o percentual de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ (Quadro 6). Além disso, foi encontrada uma correlação negativa, com diferença significativa ($p < 0,05$), do grau de esplenomegalia com o percentual de linfócitos T CD4⁺, produtores de IFN- γ e uma correlação positiva, com diferença significativa ($p < 0,05$), do grau de esplenomegalia com a expressão de RNAm de IL-10 (Quadro 6). Finalmente, neste compartimento, foi ainda encontrada uma correlação positiva, com diferença significativa ($p < 0,05$), entre a expressão de RNAm de IL-12, com o percentual de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ , assim como, correlações positivas, com diferença significativa ($p < 0,05$), do percentual de macrófagos produtores de NO, com o percentual de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ , a expressão de IL-12 e a expressão de iNOS (Quadro 6).

Quadro 6: Correlações entre carga parasitária, esplenomegalia e parâmetros imunológicos no compartimento esplênico

Parâmetros Baço	p ($<0,05$)	r de Pearson ou Spearman
%CD4 ⁺ vs Carga parasitária	0,0429	-0,5346
%CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ vs Carga parasitária	0,0029	-0,6601
%CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ vs Esplenomegalia	0,0347	-0,53
mRNA IL-10 vs Carga parasitária	0,0077	0,5912
mRNA IL-10 vs Esplenomegalia	0,0152	0,5849
mRNA IL-10 vs %CD4 ⁺ IFN- γ ⁺	0,0327	-0,5046
mRNA IL-12 vs %CD4 ⁺ IFN- γ ⁺	0,0216	0,5588
%M ϕ NO vs %CD4 ⁺ IFN- γ ⁺	0,0229	0,5186
%M ϕ NO vs IL-12	0,0104	0,6031
%M ϕ NO vs iNOS	0,0264	0,5527

Já no compartimento hepático de cães naturalmente infectados (CA e CS), foram encontradas correlações negativas, com diferença significativa ($p < 0,05$), entre a carga parasitária e o percentual de linfócitos T CD3⁺, linfócitos T CD4⁺, percentual de linfócitos T

CD4⁺ produtores de IFN- γ e frequência de macrófagos hepáticos produtores de NO (Quadro 6). Foram ainda encontradas correlações positivas, com diferença significativa ($p < 0,05$), entre o percentual de macrófagos hepáticos produtores de NO e o percentual de linfócitos T CD4⁺, a expressão de RNAm de IFN- γ e de iNOS (Quadro 7). Foi ainda encontrada uma correlação positiva, com diferença significativa ($p < 0,05$), entre a expressão de IFN- γ e de IL-12 (Quadro 7).

Quadro 7: Correlações entre carga parasitária e parâmetros imunológicos no compartimento hepático

Parâmetros	$p (<0,05)$	r de Pearson ou Spearman
%CD3 ⁺ vs Carga parasitária	0,0327	-0,5047
%CD4 ⁺ vs Carga parasitária	0,0102	-0,5737
%CD4 ⁺ IFN- γ^+ vs Carga parasitária	0,0382	-0,5447
RNAm IFN- γ vs RNAm IL-12	0,0418	0,484
%M ϕ NO vs %CD4 ⁺	0,0316	0,5441
%M ϕ NO vs mRNA IFN- γ	0,0412	0,5195
%M ϕ NO vs RNAm iNOS	0,0088	0,5978
%M ϕ NO vs Carga Parasitária	0,0066	-0,6435

Em relação às correlações encontradas após o co-cultivo celular de leucócitos circulantes, no sistema de co-cultivo M ϕ +CD4⁺, foi observada uma correlação negativa, com diferença significativa ($p < 0,05$), entre o índice de infecção e o percentual de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ . Foi ainda encontrada uma correlação positiva, com diferença significativa ($p < 0,05$), entre o percentual de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ e a frequência de macrófagos produtores de NO (Quadro 8). Já em relação ao co-cultivo M ϕ +CD4⁺+CD8⁺, foram encontradas correlações negativas, com diferença significativa ($p < 0,05$), entre o índice de infecção, a soma do percentual de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN- γ (%CD4⁺IFN- γ^+ + CD8⁺IFN- γ^+) e o percentual de macrófagos produtores de NO (Quadro 8). Além disso, foi encontrada ainda uma correlação positiva, com diferença significativa ($p < 0,05$), entre a soma do percentual de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN- γ (%CD4⁺IFN- γ^+ + CD8⁺IFN- γ^+) e o percentual de macrófagos produtores de NO (Quadro 8).

Quadro 8: Correlações entre índice de infecção e parâmetros imunológicos no contexto de co-cultivo de leucócitos circulantes

Parâmetros	<i>p</i> (<0,05)	<i>r</i> de Pearson ou Spearman
%MφNO vs %CD4 ⁺ IFN-γ ⁺	0,0104	0,681
%MφNO vs (%CD4 ⁺ IFN-γ ⁺ + %CD8 ⁺ IFN-γ ⁺)	0,05	0,5503
CD4 ⁺ IFN-γ ⁺ vs Ind. Infecção Mφ ⁺ CD4 ⁺	0,0209	-0,589
(%CD4 ⁺ IFN-γ ⁺ + %CD8 ⁺ IFN-γ ⁺) vs Ind. infecção CD4 ⁺ CD8 ⁺	0,016	-0,6508
NO Mφ ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ vs Ind. Infecção CD4 ⁺ CD8 ⁺	0,0385	-0,5571

Finalmente, foi considerado importante avaliar a existência de correlações entre parâmetros parasitológicos e imunológicos de baço, fígado e co-cultivo. Assim, foi observada uma correlação positiva, com diferença significativa ($p < 0,05$), entre as cargas parasitárias esplênicas e hepáticas (Quadro 9). Além disso, foi constatada a existência de uma correlação positiva, com diferença significativa ($p < 0,05$), entre a carga parasitária hepática e o índice de infecção no sistema de co-cultivo Mφ⁺CD4⁺+CD8⁺ (Quadro 9). Também encontramos uma correlação positiva, com diferença significativa ($p < 0,05$), entre as frequências de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN-γ no baço e no co-cultivo Mφ⁺CD4⁺CD8⁺ (Quadro 9). Finalmente, foi observada uma correlação positiva, com diferença significativa ($p < 0,05$), entre o percentual de macrófagos produtores de NO no sistema de co-cultivo Mφ⁺CD4⁺CD8⁺ e a frequência de macrófagos produtores de NO no baço e fígado (Quadro 9).

Quadro 9: Correlações entre parâmetros imunológicos e parasitológicos das metodologias *in vitro* e *in vivo*

Parâmetros	<i>p</i> (<0,05)	<i>r</i> de Pearson ou Spearman
Carga parasitária hepática vs Carga parasitária esplênica	<0,0001	0,9383
CD4 ⁺ IFN-γ ⁺ CD8 ⁺ Co-cultivo vs CD4 ⁺ IFN-γ ⁺ Baço	0,0334	0,5699
MφNO + CD4 ⁺ CD8 ⁺ Co-cultivo vs MφNO Baço	0,0045	0,6699
MφNO + CD4 ⁺ CD8 ⁺ Co-cultivo vs MφNO Fígado	0,0369	0,5419
Ind. Infecção Mφ ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ vs Carga hepática	0,0152	0,5941

5 DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral humana (LVH) se evidencia como uma das principais doenças infecto-parasitárias, sendo reportados 3500 casos anuais no Brasil e entre 50 a 90 mil casos no mundo anualmente, números que se acredita estarem subestimados devido à existência de subnotificações (WHO, 2017, Alvar et al., 2012).

O cão é considerado desde a década de 50 o principal reservatório doméstico de *L. infantum*, devido à sua grande proximidade com a espécie humana, ao fato de apresentar intenso parasitismo cutâneo e à grande frequência de cães infectados assintomáticos em áreas endêmicas (muitos não detectados pelos testes sorológicos), capazes de representarem o papel de reservatório, transmitindo o parasito para o inseto vetor (Gramiccia & Gradoni, 2005, Esch & Petersen, 2013). A leishmaniose visceral canina (LVC) se caracteriza por seu alcance multissistêmico, destacando-se o baço e o fígado como dois dos órgãos alvos do parasito mais afetados, com intenso parasitismo, resultando em múltiplas alterações morfológicas, tanto micro como macroscópicas (Giunchetti et al., 2008, Santana et al., 2008 Melo et al., 2009, Reis et al., 2014).

O macrófago é a célula mais frequentemente parasitada pelas formas amastigotas de *L. infantum*, sendo ainda a célula que atua mais diretamente na sua destruição, mediada pela produção intracelular de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (Channon et al., 1984, Carneiro et al., 2016).

Diante da importância do cão, tanto no seu papel de reservatório do parasito para a transmissão e infecção humana, como na perspectiva da medicina veterinária é importante o desenvolvimento de estudos que permitam colmatar a escassez de conhecimento sobre os fatores imunológicos determinantes para o estabelecimento de uma infecção assintomática ou sintomática por *Leishmania infantum*, no compartimento esplênico e hepático em cães naturalmente infectados. Além disso, é também importante o desenvolvimento e validação de metodologias *in vitro*, que permitam simular de forma o mais fidedigna possível a resposta imune compartimentalizada da LVC, evitando os procedimentos invasivos que impliquem na avaliação direta nas células esplênicas e hepáticas.

Sendo assim, neste estudo foi avaliada a relação das formas clínicas (assintomática e sintomática) da LVC, com a esplenomegalia, a carga parasitária e a expressão de parâmetros imunológicos no compartimento esplênico, hepático e num sistema de co-cultivo *in vitro*, utilizando células derivadas de leucócitos circulantes, em cães naturalmente infectados com *L. infantum*.

Para cumprir com este objetivo, foram utilizados 27 cães, distribuídos por um grupo de cães não infectados (CNI - composto por cães saudáveis), um grupo de cães naturalmente

infectados assintomáticos (CA - sem sinais clínicos da doença) e um grupo de cães naturalmente infectados sintomáticos (CS - apresentando sinais clínicos característicos da doença). Como critério de inclusão nos grupos infectados foi utilizado a positividade nos testes sorológicos preconizados pelo Ministério da Saúde (ELISA® e DPP® produzidos pela Bio-Manguinhos). De forma a complementar os testes sorológicos, realizamos avaliações parasitológicas, tal como a mielocultura em meio NNN/LIT, para isolamento e identificação de formas promastigotas do parasito. Nesse sentido, foi possível proceder ao isolamento de formas promastigotas na mielocultura da totalidade dos cães infectados, assintomáticos e sintomáticos. Estes resultados corroboram com as observações de Reis et al., (2006) que demonstraram uma alta frequência de isolamento na mielocultura de cães infectados por *L. infantum*.

Além do isolamento de formas promastigotas de *L. infantum* em mielocultura, avaliamos ainda, a carga parasitária no compartimento esplênico e hepático de cães do grupo CA e CS, utilizando a técnica de PCR em tempo real. Foi observado que a carga parasitária no baço e no fígado de cães do grupo CA, é inferior à carga do grupo CS. Estes resultados foram confirmados utilizando o método de LDU (*Leishman Donovan Units*), a partir de esfregaços por aposição de baço e fígado corados com Panótico Rápido InstantProv e posterior contagem do número de formas amastigotas por 1000 células nucleadas, ao microscópio ótico. Os resultados da LDU revelaram uma menor carga parasitária no compartimento esplênico do grupo CA, por comparação ao grupo CS. Além disso, verificamos também uma correlação fortemente positiva entre a carga parasitária do baço e do fígado, avaliada por PCR em tempo real. Outros autores já demonstraram a existência de maior carga parasitária esplênica e hepática no grupo CS em relação ao grupo CA, (Reis et al., 2006a; Giunchetti et al., 2008; dos Santos et al., 2011; Reis et al., 2014; Nascimento et al., 2015). de Michelin et al., (2011) também encontraram uma correlação positiva entre as cargas parasitárias destes dois órgãos em cães naturalmente infectados.

Juntamente com uma alta carga parasitária esplênica é comum ocorrência de alterações morfológicas na arquitetura do baço (Santana et al., 2008, Tasca et al., 2009, Cavalcanti et al., 2015). Assim, alterações microvasculares, resultam na desorganização estrutural da arquitetura esplênica, resultando a nível macroscópico num aumento de tamanho do órgão (Engwerda et al., 2002, Alexandre-Pires et al., 2006, Santana et al., 2008, Cavalcanti et al., 2015). A esplenomegalia é descrita na literatura como um sinal clínico importante na LVC, podendo estar presente em 20% a 100% dos cães sintomáticos (Ciaramella et al., 1997; Almeida et al., 2005, Reis et al. 2009; Solano-Gallego et al. 2011). O maior grau de esplenomegalia observado em cães do grupo CS, vem colmatar o déficit de estudos existentes na literatura relacionando, esta

alteração esplênica ao quadro clínico de cães infectados por *L. infantum*. No entanto, existem trabalhos demonstrando um aumento da espessura do baço em cães e humanos, mesmo apresentando uma resposta imune associada com a resistência a doença (Oliva et al., 1995; Roatt et al., 2017). Além da relação com a forma clínica, também foi possível observar neste trabalho uma correlação fortemente positiva entre o grau de esplenomegalia e a carga parasitária esplênica. A presença de uma correlação positiva entre o grau de esplenomegalia e a carga parasitária no sangue de pacientes infectados por *L. infantum*, já foi descrita na literatura (Bhattacharya et al., 2016). Roatt et al., (2017) verificaram, após vacinação terapêutica com LBMPL (vacina composta por antígenos de *L. braziliensis* associada ao adjuvante monofosforil lípido A) em cães naturalmente infectados, uma diminuição na carga parasitária na pele e medula óssea, em conjunto com a diminuição do grau de esplenomegalia, indicando uma relação entre estes dois parâmetros.

Tanto nos cães naturalmente infectados, como nos cães não infectados, foram avaliadas as principais alterações hematológicas e bioquímicas séricas. Estes parâmetros são importantes para o estabelecimento do prognóstico da doença (Reis et al. 2006b; Reis et al. 2009; Solano-Gallego et al. 2011; Freitas et al. 2012; Kaszak et al., 2015). A medula óssea é responsável pela formação de eritrócitos, plaquetas e leucócitos que são posteriormente liberados na corrente sanguínea. Este órgão é um dos mais parasitados no contexto da LVC, o que pode resultar numa perturbação da homeostasia do processo hematopoiético (Reis et al., 2006a; Trópia de Abreu et al. 2011). Consequentemente, este trabalho buscou avaliar potenciais alterações patológicas na concentração das principais populações de células sanguíneas da série branca e vermelha, de acordo com a presença de sinais clínicos característicos da doença. A presença de alterações eritrocíticas, na forma de anemia normocítica e normocrômica associada a trombocitopenia, em cães do grupo CS infectados por *L. infantum* já foi descrita na literatura (Keenan et al., 1984, Koutinas et al., 1999, Reis et al., 2006, Nicolato et al., 2013). Por outro lado, a existência de alterações nos parâmetros eritrocíticos e trombocíticos no grupo CA é controversa. Existem trabalhos que defendem que a infecção subclínica não conduz a alterações no hemograma (Reis et al., 2006a, Coura-vital et al., 2011, Nicolato et al., 2013). Outros trabalhos, corroborando com os nossos resultados, demonstram a existência de alterações eritrocíticas prévias ao aparecimento de sinais clínicos (De Almeida et al., 2014, Abbehusen, 2017). As alterações do leucograma no contexto da leishmaniose visceral são de difícil interpretação, já que, podem estar associados a disfunções medulares, ou à migração leucocitária para outros órgãos em resposta à infecção, gerando o processo inflamatório crônico característico da LV. Ribeiro et al., (2013) e Freitas et al., (2012) não encontraram quaisquer alterações no leucograma de cães

dos grupos CNI, CA e CS. Embora a maioria dos trabalhos refiram a existência de monocitopenia em cães com presença de sinais clínicos (Reis et al., 2006, Nicolato et al., 2013, De Almeida et al., 2014), existem outros trabalhos que, corroborando com os nossos resultados, encontraram monocitose no grupo de cães infectados sintomáticos (Mattos Jr. et al., 2004, Soares et al., 2005). Esta monocitose no grupo CS, pode ser explicada por uma disfunção na migração de monócitos para os órgãos infectados pelo parasito, em resposta a uma carga parasitária intensa. Desta forma, Murray et al. (2017) verificaram uma diminuição da expressão de CCL5 e no recrutamento de monócitos, no fígado de animais infectados após deleção de IFN- γ , indicando que existe um recrutamento de monócitos para o fígado dependente, pelo menos em parte de IFN- γ . Isto pode explicar o aumento de monócitos circulantes encontrado em CS, cuja produção de IFN- γ por linfócitos T esplênicos e hepáticos é menor do que no grupo CA.

Em relação ao proteinograma, a composição do perfil eletroforético das proteínas plasmáticas na LVC sofre alteração, tanto nas concentrações séricas de albuminas, globulina e na razão albumina e globulina séricas (A/G). O aumento das concentrações séricas de globulinas em cães com LVC, se deve frequentemente a um aumento nas frações β e γ , enquanto a diminuição de albumina pode indicar alterações funcionais hepáticas, entre outros fatores (Amusategui et al. 2003; Reis et al. 2006). As alterações na concentração de proteínas séricas, são frequentemente associadas à severidade da doença. De forma surpreendente, não foram encontradas, neste estudo, diferenças significativas em função da presença de sinais clínicos. Corroborando com nossos resultados, Ribeiro et al., (2013) observaram que os cães sintomáticos, bem como os assintomáticos, apresentam alterações semelhantes nos níveis de proteínas séricas e na razão A/G em comparação com cães não infectados.

O baço e o fígado são dois dos órgãos alvos do parasito mais acometidos durante a evolução clínica da LVC, sendo locais de eleição para o alojamento e multiplicação das formas parasitárias, no estabelecimento de uma resposta adaptativa durante a LVC (Reis et al., 2006a, Giunchetti et al., 2008). No decurso da infecção por *L. infantum*, o baço sofre alterações estruturais micro e macroscópicas e a ativação das células imunes presentes neste órgão está intimamente ligada ao perfil de resistência ou susceptibilidade à doença, assim como com a evolução do quadro clínico dos cães infectados (Santana et al., 2008, Reis et al., 2014, Cavalcanti et al., 2015).

A relação entre a infecção hepática por *L. infantum* e o desenvolvimento de alterações estruturais neste órgão já foi estudada por alguns autores (Meleney, 1925, Andrade & Andrade,

1966, Tafuri et al., 1996). Giunchetti et al., (2008) estabeleceram a relação entre as alterações histológicas hepáticas decorrentes da LVC e a presença de infecção parasitária intensa neste órgão. Desta forma, já existem relatos descritos na literatura sobre as alterações histológicas e a evolução da carga parasitária hepática durante a infecção por *L. infantum* na LVC. No entanto, existem ainda várias questões em aberto relativas à associação entre a resposta imune no fígado, a carga parasitária e o *status* clínico de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

Os linfócitos T (CD3⁺), nomeadamente as suas subpopulações CD4⁺ e CD8⁺, são determinantes para o desenvolvimento de uma resposta imune que conduza à resistência ou susceptibilidade perante a infecção por *L. infantum*, através das suas expansões periféricas, da produção de citocinas como o IFN- γ , a IL-4 e a IL-10 e da migração para os principais sítios acometidos, iniciando o processo inflamatório. Perante isto, foi considerado importante avaliar o percentual destas células e sua capacidade funcional nos compartimentos hepáticos e esplênicos, dos cães com diferentes formas clínicas de LVC.

A predominância de linfócitos T CD3⁺ no baço de cães infectados observada neste trabalho não encontrou paralelo com outros estudos existentes na literatura, que não encontraram diferenças entre os grupos, ou verificaram um maior percentual de linfócitos T CD3⁺ em cães não infectados (Reis et al., 2014, Moreira et al., 2017). Em relação ao compartimento hepático, corroborando com nossos resultados, Moreira et al., (2017), observaram um percentual elevado de linfócitos T CD3⁺ no fígado de cães infectados, em comparação com cães não infectados.

A maior frequência de linfócitos T CD8⁺ observada no baço de cães infectados foi corroborada por Guerra et al., (2009), que encontraram percentuais mais elevados destas células no baço de cães com parasitismo moderado, em comparação com CNI, enquanto Reis et al. (2014) observaram um maior percentual de linfócitos T CD8⁺ no compartimento esplênico do grupo CA em relação ao grupo CNI. Isto nos indica que a infecção por *L. infantum* promove o recrutamento de linfócitos T CD8⁺ para o baço de cães infectados. Já em relação ao fígado, de forma diferente ao observado neste trabalho, Sanchez et al., (2004), encontraram um percentual maior de linfócitos T CD8⁺ no fígado de cães assintomáticos, em relação a cães sintomáticos. Embora nossos resultados se encontrem em desacordo com a maioria dos dados presentes na literatura, que apontam para um maior percentual de linfócitos T CD8⁺ no compartimento hepático de cães assintomáticos, é importante ressaltar que os linfócitos T CD8⁺ apresentam uma exaustão mais intensa e mais precoce do que os linfócitos T CD4⁺ (Esch et al., 2013, Wherry & Kurachi, 2015). Nesse sentido, devido a este estado de exaustão pré-clínico que os linfócitos T CD8⁺ apresentam, é natural que uma maior presença destas células não esteja

associada diretamente ao estabelecimento de um quadro assintomático e de controle do parasitismo.

Em relação ao percentual de linfócitos T CD4⁺ no compartimento esplênico foi observado que os cães infectados apresentam um menor percentual destas células em relação ao grupo CNI. No entanto, é importante destacar que a diferença para o grupo CA foi menor ($p=0,02$) do que para o grupo CS ($p=0,0013$). Além disso, foi encontrada uma correlação negativa entre o percentual de linfócitos T CD4⁺ esplênicos e a carga parasitária neste órgão. Os resultados de da Silva et al., (2018) corroboram com nossos resultados, onde verificaram a existência de um percentual maior de linfócitos T CD4⁺ em baços com arquitetura organizada, do que em baços com arquitetura desorganizada. Como foi citado anteriormente, a esplenomegalia é consequência direta da desorganização estrutural do compartimento esplênico e está intimamente relacionada com a carga parasitária esplênica, bem como a susceptibilidade na LVC (Oliva et al., 1995, Roatt et al., 2017, da Silva et al., 2018). Corroborando com a menor frequência de linfócitos T CD4⁺ encontrada no fígado do grupo CS, Sanchez et al., (2004) observaram um menor percentual de linfócitos T CD4⁺ no fígado de cães sintomáticos em comparação aos que apresentavam infecção subclínica.

Após avaliar o percentual dos linfócitos T totais e de cada uma das suas subpopulações, procedemos a avaliação do percentual destas células produzindo IFN- γ e IL-4 no baço e fígado de cães pertencentes aos grupos CNI, CA e CS. Com base em dados recolhidos a partir da infecção de modelos experimentais, o estabelecimento de uma resposta imune que conduza à resistência contra a infecção por *Leishmania*, implica a produção de IL-12 por células apresentadoras de antígeno (APC) e a produção de IFN- γ por linfócitos T (Scott et al., 1989; Heinzel et al., 1995).

Os linfócitos T CD4⁺ desempenham um papel fundamental na geração de uma resposta imune associada à resistência em várias infecções parasitárias (Sacks, 2014). Em resposta à produção de IL-12, estas células são capazes de se proliferar e produzir IFN- γ , citocina determinante para o desenvolvimento de uma resposta imune com perfil resistente à LV (Taylor & Murray, 1997; Polley et al., 2005, Zhu et al., 2010). De forma surpreendente, a maioria dos autores não encontraram diferenças entre a expressão de RNAm de IFN- γ no baço de cães com forma assintomática ou sintomática de LVC, ou verificou uma maior expressão desta citocina em cães sintomáticos (Lage et al., 2007, Correa et al., 2007, Sanches et al., 2014). Corroborando com a relação observada entre a produção elevada de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ no baço e fígado, a infecção assintomática e um baixo parasitismo esplênico, Nascimento et al., (2015)

verificaram que cães com menor carga parasitária esplênica expressam mais IFN- γ neste órgão do que cães com maior carga parasitária. Além disso, Paun et al., (2011) verificaram que o fator regulatório de interferon 5 (IRF-5) é determinante para o estabelecimento de uma resposta imune associada à resistência no fígado, após infecção com *L. donovani*. Os mesmos autores observaram que, a deleção desta proteína em camundongos, resulta numa diminuição significativa no percentual de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ , associada a uma maior carga parasitária hepática. Da mesma forma, Gomes-Pereira et al., (2004) observaram uma menor carga parasitária no fígado coincidente com um aumento nos níveis de IFN- γ nesse órgão numa linhagem de camundongos resistentes à infecção por *L. infantum*. Murray, (1987) observou que o tratamento de camundongos infectados com *L. donovani*, com uma infusão contínua de IFN- γ , contribuiu para a redução da carga parasitária hepática. Murray et al., (2001) concluíram que o controle da infecção hepática é dependente de IL-12 e IFN- γ . Correa et al., (2007) concluíram que cães assintomáticos apresentavam uma maior expressão de IFN- γ , em comparação a cães sintomáticos.

Este é o primeiro trabalho a avaliar especificamente a produção de IFN- γ , por linfócitos T CD4⁺ no baço e fígado de cães infectados por *L. infantum*, corroborando com os estudos nessa área em outros modelos e demonstrando a importância da presença de linfócitos T CD4⁺ capacitados para a produção de IFN- γ , no estabelecimento de mecanismos imunológicos capazes de atuarem no combate do parasito de *L. infantum*, direcionando o sistema imune para uma resposta condizente com a resistência na LVC.

Quanto às disparidades entre os resultados, existentes na literatura, referentes à expressão de RNAm de IFN- γ no baço de cães infectados por *L. infantum*, é importante destacar que a expressão de RNAm de determinada citocina nem sempre está correlacionada com a codificação da proteína correspondente (Amsen et al., 2009, Villarino et al., 2011). Desta forma, consideramos a citometria de fluxo como uma técnica mais confiável para avaliar a capacidade de células do sistema imune em produzir IFN- γ , uma vez que é capaz de detectar diretamente a sua produção, pela célula de interesse.

Os linfócitos T CD8⁺ são reconhecidos como componentes centrais da imunidade adaptativa devido à sua capacidade citotóxica, à capacidade de produção de citocinas, como o IFN- γ e IL-10, e quimiocinas (Woodland & Dutton, 2003, Stager & Rafati, 2012). Quando estas células sofrem uma estimulação prolongada por antígenos patogênicos, reduzem sua capacidade efetora e proliferativa, se caracterizando por um perfil de exaustão (Joshi et al., 2009; Mueller & Achmed 2009). A aparente incapacidade de linfócitos T CD8⁺ esplênicos e

hepáticos, de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, para a produção de IFN- γ é corroborada pelas observações de Esch et al., (2013) que concluíram que linfócitos T CD8⁺ em cães naturalmente infectados por *L. infantum* apresentam uma incapacidade de proliferação e produção de citocinas, independente do quadro clínico.

Como já vimos anteriormente, para produção de IFN- γ por linfócitos T, é necessária a produção de IL-12 por células apresentadores de antígeno, condição essencial para direcionar a resposta imune para um perfil de resistência à LVC (Heinzel et al., 1989). Bacellar et al., (2000) observaram que a neutralização de IL-12 em CMSP estimulados com SLA, resultou numa diminuição na proliferação linfocitária e da concentração de IFN- γ no sobrenadante de cultura. Já adição de IL-12 a CMSP de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, estimuladas com SLA, resultou num aumento na expressão de IFN- γ (Dos santos et al., 2004). Barbosa et al., (2011) observaram maior expressão de IL-12 em linfonodos de cães do grupo CA, comparativamente ao grupo CS. Cavalcanti et al., (2015) concluíram que cães com alto parasitismo esplênico apresentavam menor expressão de IL-12, em comparação com os cães de baixo parasitismo. Estes trabalhos corroboram com nossos achados, reforçando assim o papel da IL-12 na estimulação da produção de IFN- γ por linfócitos T e estabelecendo ainda uma relação entre a expressão de IL-12 e um perfil clínico de resistência perante a LVC.

Ao contrário da IL-12, a expressão de IL-10 está intimamente ligada ao desenvolvimento de uma resposta imune que promove a susceptibilidade a várias espécies de *Leishmania* (Vouldoukis et al., 1997, Kane & Mosser, 2001, Nysten et al., 2007, Alves et al., 2009). Na leishmaniose visceral experimental o bloqueio desta citocina, resulta no desenvolvimento de uma resposta imune associada com a resistência (Murphy et al., 2001, Murray et al., 2003). Esta citocina encontra-se em níveis elevados no sangue total de pacientes com leishmaniose visceral ativa, sendo que a sua expressão diminui de forma significativa após a cura (Singh et al., 2012). Além disso, a neutralização desta citocina já demonstrou resultar num aumento na expressão de IFN- γ e da eliminação de formas amastigotas de *Leishmania donovani* (Gautam et al., 2011). A IL-10 é também capaz de prejudicar a capacidade leishmanicida de macrófagos humanos (Vouldoukis et al., 1997). Já na LVC, a maioria dos trabalhos não encontrou uma relação entre a expressão de IL-10 esplênica e a severidade clínica da doença (Quinnell et al. 2001, Santos-Gomes et al. 2002, Manna et al. 2006, Correa et al. 2007). No entanto, Alves et al., (2009) encontraram um aumento na expressão de IL-10 em linfonodos de cães sintomáticos, comparativamente aos de cães saudáveis. Rosário et al., (2018) observaram concentrações superiores de IL-10 no soro de cães sintomáticos. Já Lage et al.,

(2007) constataram uma maior expressão de IL-10 no compartimento esplênico de cães com alto parasitismo neste órgão, em comparação com cães menos parasitados. Estes trabalhos corroboram nossos resultados, revelando uma predominância da expressão de IL-10 em cães com quadro clínico mais severo e uma relação íntima entre esta citocina e a permanência e replicação parasitária no baço. Foi também concluído que a expressão esplênica de IL-10 e a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ neste órgão, se encontram em polos opostos no espectro de fatores determinantes de susceptibilidade e resistência, na infecção natural canina por *L. infantum*.

Observamos até aqui que o grupo CA apresenta maior produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ e maior expressão de IL-12 no baço e fígado. Com intuito de esclarecer ainda mais os mecanismos relacionados a resistência ou susceptibilidade na LVC, foi também avaliada a produção de NO e ROS nos macrófagos esplênicos e hepáticos de cães com diferentes formas clínicas. Em ambos os compartimentos estudados, foi observada uma tendência para uma maior expressão de iNOS, associada a maior produção de NO por macrófagos do grupo CA. Macrófagos hepáticos de cães do grupo CA demonstraram ainda, maior potencial para a produção de ROS, comparativamente aos de CS. É sabido que macrófagos hepáticos são fundamentais no estabelecimento de uma resposta imune eficaz contra infecções por parasitos do gênero *Leishmania* no fígado, sendo que, quando as suas funções efetoras estão prejudicadas, ocorre uma maior susceptibilidade do órgão à infecção (Tomioka et al., 2000). Já foi observado que a resistência à LV no fígado está associada a uma maior produção de NO e ROS por macrófagos hepáticos (Bankoti & Stager, 2012). No entanto, enquanto ambos são necessários para conter a infecção nas fases iniciais, com o decorrer da mesma o NO se torna preponderante em relação ao ROS (Murray & Nathan, 1999). É já conhecido que macrófagos caninos são capazes de produzir NO e ROS em resposta a estimulação com IFN- γ e LPS, ou após infecção por espécies visceralizantes de *Leishmania*, sendo esta característica fundamental para o controle da infecção (Vouldoukis et al., 1996, Pinelli et al., 2000, Gantt et al., 2001, Holzmuller et al., 2005, 2006; Murray et al., 2006, Zafra et al., 2009). Em relação à resposta imune compartimentalizada na LVC, já foi observado que a infecção natural canina assintomática se encontra associada a maiores expressões de iNOS no baço e fígado (Nascimento et al., 2015).

Este foi o primeiro trabalho a avaliar a produção intracelular de NO e ROS no compartimento esplênico e hepático de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Os nossos resultados permitem concluir que a presença de uma maior produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺, baixa expressão de RNAm de IL-10 e alta expressão de IL-12, estão associados a maior

produção de NO por macrófagos esplênicos. Já no compartimento hepático, o IL-10 não se apresentou como fator contribuinte para o estabelecimento de uma resposta imune associada à resistência. No entanto, a produção de ROS por macrófagos hepáticos, parece estar associada a um quadro clínico mais favorável. Estes parâmetros imunológicos hepáticos e esplênicos estão intimamente relacionados com o estabelecimento da infecção pelo parasito de *L. infantum*, assim como, com a história natural de desenvolvimento da doença e o aparecimento de seus sinais e sintomas clínicos.

Grande parte dos trabalhos que pretendem avaliar a resposta imune de cães com LVC, são baseados na avaliação imunológica de leucócitos circulantes ou diretamente nos órgãos afetados (Giunchetti et al., 2008, Esch et al., 2013, Reis et al., 2014, Roatt et al., 2017).

As avaliações utilizando leucócitos circulantes, embora apresentem resultados interessantes, são normalmente realizadas após estímulos, como o antígeno solúvel de *Leishmania*, que não são totalmente representativos do curso natural da infecção. Nateghi Rostami et al., (2010), num ensaio de co-cultivo semelhante ao realizado neste trabalho, após estimulação com antígeno solúvel de *Leishmania* e com promastigotas vivos de *L. major*, concluíram que quando o estímulo é realizado com parasitos vivos, existe uma maior produção de citocinas relevantes para o curso da resposta imune contra a infecção. Isto nos indica que a utilização de formas promastigotas, como estímulo para a ativação de células do sistema imune de cães infectados por *L. infantum*, apresenta vantagens em relação a outros estímulos. Desta forma, é proposto que os resultados decorrentes desta metodologia, podem ser extrapolados de forma mais fidedigna para o curso natural da infecção nos diversos compartimentos afetados.

Nesse sentido, de forma a verificar se existem variações nos níveis de parasitismo de macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico de CNI, CA e CS, em diferentes condições de co-cultivo ($M\phi+CD4^+$, $M\phi+CD8^+$ e $M\phi+CD4^++CD8^+$), avaliamos a variação da taxa de infecção (TI) e da intensidade da infecção, entre as culturas contendo exclusivamente macrófagos infectados e as culturas de macrófagos infectados em condições de co-cultivo com subpopulações de linfócitos T ($CD4^+$ e /ou $CD8^+$).

Foi demonstrado que em cães do grupo CA a presença de subpopulações de linfócitos T em cultivo com macrófagos resultou em uma maior redução da taxa e intensidade de infecção, comparativamente ao grupo CS. Desta forma, pode ser estabelecido um paralelismo entre estes resultados e a predominância de linfócitos T $CD3^+$ e linfócitos T $CD4^+$, no baço e fígado do grupo CA, assim como a associação destas populações celulares a baixa carga parasitária em ambos os órgãos, reforçando assim a importância dos linfócitos T na eliminação parasitária após infecção por *L. infantum*. Holzmuller et al., (2005) observaram um aumento de capacidade

leishmanicida em macrófagos derivados de monócitos de cães vacinados com antígenos de *L. infantum*, em comparação com cães não vacinados, quando cultivados com linfócitos autólogos.

A importância dos linfócitos T CD4⁺ para a resistência à infecção, no contexto da LV é reconhecida (Rosas et al., 2006, Esch et al., 2013, Matralis et al., 2016). Esch et al., (2013) observaram que linfócitos T CD4⁺ das CMSP de cães assintomáticos apresentavam um perfil de ativação com maior capacidade de proliferação, maior produção de IFN- γ , menor produção de IL-10, promovendo assim uma menor carga parasitária. A diminuição da taxa e da intensidade da infecção no grupo CA, nos sistemas de co-cultivo M ϕ +CD4⁺ e M ϕ +CD4⁺+CD8⁺ pode ser explicado pelo aumento da produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD4⁺ deste grupo clínico. No entanto, no sistema de co-cultivo M ϕ +CD8⁺ não existiram diferenças na produção de IFN- γ por esta subpopulação de linfócitos T entre os grupos infectados. Desta forma, outros fatores, que não a produção de IFN- γ , parecem ser responsáveis pelo menor índice de infecção observada no grupo CA neste sistema de co-cultivo. Assim, a maior capacidade leishmanicida dos macrófagos de cães do grupo CA, quando em cultivo com linfócitos T CD8⁺ pode estar relacionada à capacidade citotóxica própria destas células, que já foi associada à eliminação de outros patógenos intracelulares (Wizel et al., 1998, Smith et al., 1999). Gautam et al., (2014) observaram um aumento do parasitismo em culturas de esplenócitos após remoção dos linfócitos T CD8⁺, sugerindo um papel destas células na eliminação parasitária. Kaushal et al., (2014) verificaram a existência de um aumento na expressão de granzima b nas CMSP de pacientes com LV após o tratamento, em comparação com pacientes não tratados. São necessários mais estudos para esclarecer o papel da função citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ na proteção contra a LVC. A maior redução da intensidade de infecção no sistema M ϕ +CD4⁺+CD8⁺, comparativamente aos restantes sistemas de co-cultivo, pode ser explicada pela reconhecida capacidade dos linfócitos T CD4⁺, na reversão parcial da exaustão de linfócitos T CD8⁺ (Matloubian et al., 1994).

Afim de avaliarmos o papel da produção de IFN- γ e IL-4 por linfócitos T no desenvolvimento de uma resposta imune que conduza a uma ativação dos macrófagos para um melhor desempenho na produção de NO e ROS e, conseqüentemente, à capacidade de macrófagos de cães do grupo CA e CS resistirem à infecção por parasitos vivos, foi avaliado o percentual de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ produtores destas citocinas nos três sistemas de co-cultivo (M ϕ +CD4⁺, M ϕ +CD8⁺ e M ϕ +CD4⁺+CD8⁺).

Foi observada uma predominância de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ em cultivos de cães do grupo CA, enquanto que os cultivos de cães com doença aparente, se

caracterizavam por uma maior frequência de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-4. Isso se traduziu numa maior produção de NO por macrófagos de CA, nos cultivos em que a subpopulação T CD4⁺ se encontrava presente. Reconhecidamente, a expressão de IFN- γ é essencial para o desenvolvimento de resistência frente à evolução da LV (Pinelli et al., 1995, Murray et al., 2003). Rosas et al., (2006) também demonstraram que a presença de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ contribui para o desenvolvimento de resistência contra a infecção por *L. donovani*. Num trabalho que avaliou o percentual de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ no sangue de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, Matralis et al., (2016) observaram que o grupo CA apresentava um maior percentual destas células do que o grupo CS.

Muitos autores demonstraram que o NO está intimamente ligado a atividade leishmanicida em macrófagos de cães infectados por *L. infantum* (Panaro et al., 1998, 2001; Pinelli et al., 2000). Holzmuller et al., (2005) observaram uma relação entre o aumento da produção de IFN- γ por linfócitos autólogos e o aumento da produção de NO por macrófagos derivados de monócitos de cães infectados após imunização, em condições experimentais semelhantes a este trabalho. Liew et al., (1990) observaram que após infecção com *L. major* a ativação clássica dos macrófagos é mediada pela produção de IFN- γ por células Th1, estimulando primeiramente a expressão de iNOS, que catalisa a *L-arginina* para gerar óxido nítrico. Já Prajeet et al., (2011) observaram que após a infecção de macrófagos murinos com *L. infantum* e cultivo com células NK, a ativação dos macrófagos era dependente de IFN- γ e iNOS. Na infecção canina, Roatt et al. (2017), observaram que após o tratamento com LBMPL a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ é maior do que a dos cães não tratados

Partindo desta metodologia *in vitro*, este trabalho confirma os dados existentes na literatura, majoritariamente em trabalhos realizados em CMSP de cães infectados, que indicam a importância da ativação de linfócitos T CD4⁺ para a produção de IFN- γ e a sua relação na ativação dos macrófagos para a produção de NO, culminando no estabelecimento de uma infecção assintomática em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. A correlação positiva entre a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ e a expressão de NO por macrófagos derivados de monócitos circulantes, nos indica também o poder desta citocina, como ativadora de células macrófágicas para a produção deste mediador fundamental no combate contra o parasito.

Diferentes trabalhos na literatura relacionam a citocina IL-4 com a susceptibilidade à infecção por várias espécies de *Leishmania* (Afonso & Scott, 1993; Satoskar et al., 1995; Kopf et al., 1996; Mohrs et al., 1999). Vouldoukis et al., (1997) concluíram que a infecção de

macrófagos derivados de monócitos humanos com *L. infantum* apresentam menor produção de NO na presença de IL-4. Além disso, monócitos murinos e humanos ativados *in vitro* com LPS, na presença de IL-4, apresentam um aumento na produção da citocina imunomoduladora IL-10 e diminuição na produção de IL-12, reconhecidamente essencial para a ativação de linfócitos T para a produção de IFN- γ (Kambayashi et al. 1996, Cao et al., 2005). Em concordância com estes resultados, Kropf et al., 1996 concluíram que, na presença de IL-4, macrófagos murinos infectados com *L. major* apresentaram uma maior atividade de arginase, que quando inibida levou a uma redução do tamanho da lesão e da carga parasitária, sugerindo assim que a presença de IL-4 conduz à menor expressão de NO, assim como uma maior carga parasitária. A relação entre a níveis elevados de IL-4 e a susceptibilidade na infecção natural canina por *L. infantum* já foi observada (Pinheiro et al., 2005, Roatt et al., 2017)

Nossa abordagem *in vitro* confirma os resultados presentes na literatura, que apontam para um efeito deletério do IL-4, na ativação de macrófagos e produção de NO. Tendo em conta a maior produção de IL-4 por linfócitos T CD4⁺ de cães sintomáticos e a presença de maior parasitismo nos macrófagos destes animais, é sugerido ainda que esta citocina favorece a sobrevivência e replicação das formas amastigotas no interior de macrófagos.

A ausência de diferença entre o percentual de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ de CA e CS, pode explicar a ausência de diferenças entre a produção de NO por macrófagos infectados de CA e CS, no sistema de co-cultivo M ϕ +CD8⁺. Nesse sentido, foi observado por Stern et al (1988) que linfócitos T CD4⁺ esplênicos apresentam um maior potencial para expressão de IFN- γ em comparação com linfócitos T CD8⁺. Em relação à ausência de diferença estatística entre a produção de IFN- γ por linfócitos T CD8⁺ nos grupos CA e CS, foi observado por Joshi et al., (2009), no modelo murino, que a infecção por *L. donovani* prejudica a resposta imune antígeno-específica, associada a uma diminuição na produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD8⁺. Esch et al., (2013) observaram, em cães infectados por *L. infantum*, que a exaustão de linfócitos T CD8⁺ ocorre previamente ao aparecimento de sinais clínicos, verificando a ausência de diferenças significativas entre a produção de IFN- γ por linfócitos T CD8⁺ de CA e CS. Matralis et al., (2016) verificaram a existência de percentuais significativamente superiores de linfócitos T CD8⁺ produtores de IL-4 no soro de CS, comparativamente a CA, após estimulação com ASL. Roatt et al. (2017), observaram que após o tratamento com LBMPL a produção de IL-4 por linfócitos T CD8⁺ diminuiu em relação aos cães não tratados, indicando uma associação entre um menor percentual destas células e um perfil de resistência à doença.

Os resultados do nosso estudo, referentes ao sistema de co-cultivo, reforçam a

importância de IFN- γ como citocina fundamental para a produção de NO por macrófagos infectados, além da importância da produção de IL-4 como inibidor da produção de NO.

Além de avaliar a produção de NO em macrófagos derivados de monócitos apenas de acordo com a forma clínica de LVC, também foi considerado importante abordar como macrófagos provenientes de cães aparentemente resistentes ou susceptíveis à doença eram capazes de reagir a situações de baixo ou alto parasitismo. Macrófagos com alto parasitismo (MAP) do grupo CA, apresentaram maior produção de NO, do que macrófagos do grupo CS nas mesmas condições de parasitismo, em todas as condições de cultivo. Esta diferença não foi observada entre macrófagos com baixo parasitismo (MBP), dos diferentes grupos clínicos. Isto nos permite concluir que, neste modelo *in vitro*, a ativação dos macrófagos para a produção de NO acima dos níveis basais, em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, acontece apenas a partir de um determinado limiar de infecção parasitária e de forma mais intensa em cães assintomáticos. Desta forma, nestas condições de alto parasitismo, os macrófagos do grupo CA são capazes de uma produção de NO superior, aos macrófagos do grupo CS. É importante ressaltar, que este é o primeiro estudo que avalia a produção intracelular de NO em macrófagos infectados por *L. infantum*, de acordo com a intensidade de parasitismo. No entanto, podemos especular que até um determinado nível de parasitismo, o parasito de *Leishmania infantum* é capaz de evitar a produção de IL-12 pelos macrófagos, diminuindo a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ e induzindo os macrófagos a diminuir a sua produção de NO. Quando o parasitismo aumenta, apenas os macrófagos de CA são capazes de esboçar uma reação, sob a forma de um aumento pronunciado da capacidade de produção de NO. O direcionamento que vimos anteriormente dos linfócitos T do grupo CA para maior produção de IFN- γ e menor produção de IL-4, em comparação às células do grupo CS, nos permite explicar a ativação mais eficiente dos macrófagos para produção de NO nos cães com quadro clínico mais favorável.

Quanto à produção de ROS por macrófagos derivados de monócitos circulantes, esta foi observada em todos os sistemas de co-cultivo, no entanto, apenas existiram diferenças significativas no sistema de co-cultivo M ϕ +CD4⁺, com um maior percentual de macrófagos produtores de ROS em CA, em comparação com CS. Gantt et al., (2001) concluíram que macrófagos derivados de monócitos circulantes humanos foram capazes de produzir ROS em resposta a infecção por *L. infantum*. Já Cassatella et al., (1990) observaram que a estimulação com LPS e IFN- γ favorece um aumento na produção de ROS em macrófagos derivados de monócitos humanos. No sistema de co-cultivo M ϕ +CD4⁺, verificamos que a produção de IFN- γ em CA, foi superior à de CS, o que não foi observado no sistema M ϕ +CD8⁺. Este achado nos

ajuda a explicar a maior produção de ROS pelos macrófagos de CA em co-cultivo com linfócitos T CD4⁺, em comparação com os macrófagos de CS e a razão pela qual estas diferenças não foram observadas no sistema de co-cultivo Mφ+CD8⁺.

Ao avaliar as diferenças entre a produção de ROS em macrófagos com baixo ou alto parasitismo pertencentes aos cães dos diferentes grupos clínicos, verificamos que apenas no sistema de co-cultivo Mφ+CD4⁺, o percentual de macrófagos com alto parasitismo produtores de ROS foi superior aos menos parasitados. Além disso, existiram diferenças entre o percentual de macrófagos altamente parasitados produtores de ROS de CA, em relação a CS e CNI. Estes resultados reforçam o papel fundamental que observamos anteriormente dos linfócitos T CD4⁺ na ativação de macrófagos para a produção de ROS no grupo CA, em relação aos grupos CNI e CS. Sugerimos então, que a maior capacidade de produção de IFN-γ, em detrimento da produção de IL-4, determina a capacidade destas células de ativar o macrófago para uma maior produção de ROS em situações de parasitismo elevado.

A investigação das particularidades da resposta imunológica *in vitro*, utilizando células derivadas do sangue periférico, deve tentar apresentar o máximo de similaridades com a infecção natural. No caso da infecção por *L. infantum*, a utilização de formas promastigotas, em detrimento de outros estímulos, para induzir a ativação das células do sistema imune, permite todo um processo de internalização e apresentação de antígeno, que encontra paralelos com a infecção natural. De forma a avaliar se o mecanismo de co-cultivo celular é capaz de desencadear uma resposta imune, de alguma forma semelhante à observada nos compartimentos esplênicos e hepáticos, foi avaliada a existência de possíveis correlações entre os parâmetros imunológicos nas metodologias *in vitro* e *ex vivo*. O nosso trabalho observou que existiu uma correlação positiva entre produção de IFN-γ por linfócitos T CD4⁺ derivados do sangue em sistema de co-cultivo e a produção de IFN-γ por linfócitos T CD4⁺ esplênicos. Além disso, a produção de NO por macrófagos derivados de monócitos em sistema de co-cultivo estava positivamente correlacionada com a produção de NO por macrófagos hepáticos e esplênicos. Isto nos indica a existência de pontos de contato entre parâmetros imunológicos associados à resistência e susceptibilidade a doença no compartimento esplênico, hepático e no sistema de co-cultivo celular.

Tendo em conta as necessidades cada vez maiores de desenvolver técnicas menos invasivas para o estudo da resposta imune no cão, consideramos importante a exploração das potencialidades da técnica de co-cultivo, podendo ser considerada como possível alternativa em substituição de avaliações que envolvam o estudo direto do compartimento esplênico e

hepático, em fato, pela elevada correlação existente entre os achados do sistema de co-cultivo e da resposta imunológica compartimentalizada, encontradas no baço e fígado. Finalmente, tendo em conta a existência de um padrão específico na produção de IFN- γ , IL-4 e NO, por linfócitos T CD4⁺ e macrófagos, respetivamente, de cães resistentes e susceptíveis, consideramos que estes parâmetros, avaliados por esta metodologia, podem funcionar como biomarcadores em estudos terapêuticos ou vacinais, indicando se a droga ou vacina foi capaz de promover o estabelecimento de uma resposta imune associada com a resistência à infecção por *L. infantum*.

6 CONCLUSÃO

O conjunto dos resultados deste trabalho, que buscou avaliar a resposta imune compartimentalizada na leishmaniose visceral canina, nos permitiu demonstrar de forma inédita a grande importância da produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ na ativação de macrófagos para produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, no compartimento esplênico e hepático de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Este padrão imunológico, é considerado favorável para o estabelecimento de uma resposta imune associada à eliminação parasitária e uma apresentação clínica menos severa. Após este trabalho, aumenta assim consideravelmente o conhecimento existente sobre a resposta imune compartimentalizada associada aos extremos clínicos observados na LVC.

Adicionalmente a resposta imune observada no contexto de co-cultivo celular, apresentou alguma capacidade preditiva em relação às respostas imunes hepáticas e esplênicas dos cães infectados, nomeadamente, em relação à produção de NO e IFN- γ por macrófagos e linfócitos T CD4⁺, respectivamente. Sendo assim, sugerimos que esta técnica *in vitro* pode ser utilizada como alternativa mais fidedigna a estudos envolvendo uma avaliação direta da resposta imune esplênica e hepática na leishmaniose visceral canina. Parâmetros imunológicos recolhidos a partir de co-cultivo celular, apresentam o potencial para funcionar como indicadores de sucesso em estudos vacinais ou terapêuticos, podendo também, ser utilizados como biomarcadores de resistência e susceptibilidade em futuros estudos que pretendam avaliar a história natural da LVC.

A partir da realização deste trabalho foi possível obter resultados referentes aos fatores imunológicos hepáticos e esplênicos, que conduzem a resistência perante a LVC, sob a forma de uma infecção com baixa carga parasitária e ausência de sinais clínicos característicos da doença. Além disso, utilizando o co-cultivo de células do sangue periférico, após infecção com promastigotas vivos de *Leishmania infantum*, foi possível observar uma resposta imune que demonstrou paralelismos com as observações realizadas nos compartimentos hepático e esplênico. Neste sentido, a continuidade desse trabalho tem como principais perspectivas futuras avaliar:

- O tipo de fibras colágenas e a população celular envolvidas na formação e suporte do granuloma hepático característico das *Leishmaniose Visceral Canina*, por microscopia confocal;
- A expressão, por RNAseq, de RNAm codificante de proteínas associadas com a resistência e susceptibilidade no baço e fígado de animais naturalmente infectados e que possam ser usados como alvos para retardar ou evitar a deterioração funcional nestes órgãos;
- A concentração das citocinas IL-2, IL-10, TNF- α , TGF- β pela técnica de ELISA no sobrenadante de cultura dos diferentes sistemas de co-cultivos;
- A concentração de granzima B e perforina, pela técnica de ELISA no sobrenadante de cultura dos co-cultivos que incluíram linfócitos T CD8⁺;

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBEHUSEN, M. M. C. et al. Clinical and immunopathological findings during long term follow-up in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 15914, Nov 21 2017
- ADLER S, THEODOR O: Investigation on Mediterranean Kala Azar. I. Introduction and epidemiology. **Proc Roy Soc, London**, 108: p. 447–453, 1931
- AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect Immun**, v. 61, n. 7, p. 2952-9, Jul 1993.
- ALEXANDRE-PIRES, G. et al. Leishmaniosis--a report about the microvascular and cellular architecture of the infected spleen in *Canis familiaris*. **Microsc Res Tech**, v. 69, n. 4, p. 227-35, Apr 2006
- ALMEIDA, M. A. et al. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Vet Parasitol**, v. 127, n. 3-4, p. 227-32, Feb 28 2005
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ALVAREZ, MARÍA NOEL et al. “Intraphagosomal Peroxynitrite as a Macrophage-Derived Cytotoxin against Internalized *Trypanosoma Cruzi*: Consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity.” *The Journal of Biological Chemistry* 286.8 2011
- ALVES, C. F. et al. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 128, n. 4, p. 349-58, Apr 15 2009
- AMSEN, D.; DE VISSER, K. E.; TOWN, T. Approaches to Determine Expression of Inflammatory Cytokines. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 511, p. 107-142, 2009
- AMUSATEGUI, I. et al. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **Eur J Epidemiol**, v. 18, n. 2, p. 147-56, 2003.
- ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G. [Some new aspects of the kala-azar pathology. (Morphologic study of 13 autopsy cases)]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 8, n. 6, p. 259-66, Nov-Dec 1966
- ASSREUY, J. et al. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. **Eur J Immunol**, v. 24, n. 3, p. 672-6, Mar 1994.
- BACELLAR, O. et al. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 12, n. 8, p. 1228-31, Aug 2000
- BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol**, v. 24, n. 7, p. 324-30, Jul 2008.
- BANETH G, SHAW SE. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol**; 106:315–324 2002
- BANKOTI, R.; STAGER, S. Differential Regulation of the Immune Response in the Spleen and Liver of Mice Infected with *Leishmania donovani*. **J Trop Med**, v. 2012,
- BARBOSA, M. A. et al. Cytokine gene expression in the tissues of dogs infected by *Leishmania infantum*. **J Comp Pathol**, v. 145, n. 4, p. 336-44, Nov 2011
- BEATTIE, L. et al. A transcriptomic network identified in uninfected macrophages responding

- to inflammation controls intracellular pathogen survival. **Cell Host Microbe**, v. 14, n. 3, p. 357-68, Sep 11, 2013.
- BHATTACHARYA, P. et al. Induction of IL-10 and TGF β from CD4+CD25+FoxP3+ T Cells Correlates with Parasite Load in Indian Kala-azar Patients Infected with *Leishmania donovani*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004422, 2016
- BLAVIER, A. et al. Atypical forms of canine leishmaniosis. **Vet J**, v. 162, n. 2, p. 108-20, Sep 2001.
- BLOS, M. et al. Organ-specific and stage-dependent control of *Leishmania major* infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase. **Eur J Immunol**, v. 33, n. 5, p. 1224-34, May 2003
- BLOUGH, N. V.; ZAFIRIOU, O. C. Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxonitrite in alkaline aqueous solution. **Inorganic Chemistry**, v. 24, n. 22, p. 3502-3504, 1985/10/01 1985
- BOSE, M. et al. Protection against peroxynitrite by pseudoperoxidase from *Leishmania major*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 10, p. 1819-1828, 2012
- BUNN, P. T. et al. Tissue requirements for establishing long-term CD4+ T cell-mediated immunity following *Leishmania donovani* infection. **J Immunol**, v. 192, n. 8, p. 3709-18, Apr 15 2014.
- CAO, S. et al. The protooncogene c-Maf is an essential transcription factor for IL-10 gene expression in macrophages. **J Immunol**, v. 174, n. 6, p. 3484-92, Mar 15 2005
- CARDOSO, L. et al. Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Regua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). **Acta Trop**, v. 91, n. 2, p. 95-100, Jul 2004
- CARNEIRO, P. P. et al. The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0148084, 2016.
- CAVALCANTI, A. S. et al. Parasite Load Induces Progressive Spleen Architecture Breakage and Impairs Cytokine mRNA Expression in *Leishmania infantum*-Naturally Infected Dogs. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0123009, 2015
- CASSATELLA, M. A. et al. Molecular basis of interferon-gamma and lipopolysaccharide enhancement of phagocyte respiratory burst capability. Studies on the gene expression of several NADPH oxidase components. **J Biol Chem**, v. 265, n. 33, p. 20241-6, Nov 25 1990.
- CERVIA, J. S.; ROSEN, H.; MURRAY, H. W. Effector role of blood monocytes in experimental visceral leishmaniasis. **Infect Immun**, v. 61, n. 4, p. 1330-3, Apr 1993
- CHAGAS, E. et al. Leishmaniose visceral americana. II - Estudo epidemiológico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 33,138^206, 1936
- CHANNON, J. Y.; ROBERTS, M. B.; BLACKWELL, J. M. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. **Immunology**, v. 53, n. 2, p. 345-55, 1984.
- CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet Rec**, v. 141, n. 21, p. 539-43, Nov 22, 1997
- CORREA, A. P. et al. Evaluation of transformation growth factor beta1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by

- Leishmania (Leishmania) chagasi. **Vet Parasitol**, v. 143, n. 3-4, p. 267-74, Feb 28 2007
- COSTA, S. D. S. et al. Use of In Vivo and In Vitro Systems to Select Leishmania amazonensis Expressing Green Fluorescent Protein. **The Korean Journal of Parasitology**. 2001, v. 49, n. 4, p. 357-364
- COTTERELL, S. E.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Leishmania donovani infection initiates T cell-independent chemokine responses, which are subsequently amplified in a T cell-dependent manner. **Eur J Immunol**, v. 29, n. 1, p. 203-14, Jan 1999
- COURA-VITAL, W. et al. Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural Leishmania infantum infection. **Vet J**, v. 190, n. 2, p. e43-7, Nov 2011.
- COURA-VITAL, W. et al. Risk factors for seroconversion by Leishmania infantum in a cohort of dogs from an endemic area of Brazil. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71833, 2013a
- CUNHA A.M.; CHAGAS E. Nova espécie de protozoário do gênero Leishmania patogênico para o homem. *Leishmania chagasi* n.sp. Nota prévia. **Hospital (Rio J)** 1937; 11:3-9.
- DA SILVA, A. V. A. et al. Morphophysiological changes in the splenic extracellular matrix of Leishmania infantum-naturally infected dogs is associated with alterations in lymphoid niches and the CD4+ T cell frequency in spleens. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 4, p. e0006445, Apr 2018.
- DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M. E. F. d; BRANDÃO-FILHO, S. P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1-2, p. 54-60, 2006.
- DE ALMEIDA LEAL, G. G. et al. Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by Leishmania infantum. **Vet Parasitol**, v. 205, n. 3-4, p. 472-82, Oct 15 2014.
- DE CARVALHO, F. L. N. et al. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: a comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. **Epidemiology and Infection**, v. 146, n. 5, p. 571-576, 2018
- DE F MICHELIN, A.; PERRI, S. H. V.; DE LIMA, V. M. F. Evaluation of TNF- α , IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of L. (L.) chagasi naturally infected dogs.
- DE TREZ, C. et al. Myd88-dependent in vivo maturation of splenic dendritic cells induced by Leishmania donovani and other Leishmania species. **Infect Immun**, v. 72, n. 2, p. 824-32, Feb 2004
- DEANE, L.; DEANE M.; ALENCAR J. Control of Phlebotomus longipalpis by DDT house spraying endemic foci of kala-azar in Ceará. **Revista brasileira de malariologia e doenças tropicais. Publicações avulsas** 7 1 131-41, 1955
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.
- DOS SANTOS, L. R. et al. Recombinant single-chain canine interleukin 12 induces interferon gamma mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of dogs with visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 98, n. 1-2, p. 43-8, Mar 2004
- DOS SANTOS, F. R. et al. Qualitative and quantitative immunohistochemical evaluation of iNOS expression in the spleen of dogs naturally infected with Leishmania chagasi. **Parasitol Res**, v. 108, n. 6, p. 1397-403, Jun 2011.
- ENGWERDA, C. R.; ATO, M.; KAYE, P. M. Macrophages, pathology and parasite persistence

- in experimental visceral leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 11, p. 524–530, 2004.
- ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. **Immunology Today**, v. 21, n. 2, p. 73–78, 2000.
- ENGWERDA, C. R. et al. A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. **Am J Pathol**, v. 161, n. 2, p. 429-37, Aug 2002
- ENGWERDA, C. R. et al. Neutralization of IL-12 demonstrates the existence of discrete organ-specific phases in the control of *Leishmania donovani*. **Eur J Immunol**, v. 28, n. 2, p. 669-80, Feb 1998.
- ESCH, K. J. et al. Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. **J Immunol**, v. 191, n. 11, p. 5542-50, Dec 2013
- ESCH K.J.; PETERSEN C.A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoan diseases of companion animals. **Clin Microbiol Rev**. 26:58–85, 2013
- FANG, F. C. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 12, p. 2818-2825, 1997
- FORGET, G. et al. Role of host phosphotyrosine phosphatase SHP-1 in the development of murine leishmaniasis. **Eur J Immunol**, v. 31, n. 11, p. 3185-96, Nov 2001
- FREITAS, J. C. et al. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 1, p. 24-9, Feb 2012.
- GANTT, K. R. et al. Oxidative Responses of Human and Murine Macrophages During Phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 2, p. 893, 2001
- GAUTAM, S. et al. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 204, n. 7, p. 1134-7, Oct 2011
- GAUTAM, S. et al. CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 209, n. 2, p. 290-9, Jan 15 2014
- GIUNCHETTI, R. C. et al. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. **Res Vet Sci**, v. 84, n. 2, p. 269-77, Apr 2008
- GOMES-PEREIRA, S. et al. Hepatic cellular immune responses in mice with “cure” and “non-cure” phenotype to *Leishmania infantum* infection: importance of CD8+ T cells and TGF- β production. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 59-68, 2004
- GONZALEZ, J. L. et al. Structural and ultrastructural hepatic changes in experimental canine leishmaniasis. **Histol Histopathol**, v. 3, n. 4, p. 323-9, Oct 1988.
- GORAK, P. M. A.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. **European Journal of Immunology**, v. 28, n. 2, p. 687–695, 1998.
- GRADONI, L. Canine *Leishmania* vaccines: Still a long way to go. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1–2, p. 94–100, 2015.
- GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11–12, p. 1169–1180, 2005.

- GREEN, S. J. et al. Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. **J Immunol**, v. 145, n. 12, p. 4290-7, Dec 1990
- GUERRA, L. L. et al. Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. **Parasitol Res**, v. 104, n. 3, p. 611-22, Feb 2009
- GUTIERREZ, Y.; MAKSEM, J. A.; REINER, N. E. Pathologic changes in murine leishmaniasis (*Leishmania donovani*) with special reference to the dynamics of granuloma formation in the liver. **The American journal of pathology**, v. 114, n. 2, p. 222-30, 1984.
- H Aidaris, C. G.; BONVENTRE, P. F. Elimination of *Leishmania donovani* amastigotes by activated macrophages. **Infect Immun**, v. 33, n. 3, p. 918-26, Sep 1981
- HANDMAN, E. Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 229-243, 2001.
- HEINZEL, F. P. et al. Endogenous IL-12 is required for control of Th2 cytokine responses capable of exacerbating leishmaniasis in normally resistant mice. **J Immunol**, v. 155, n. 2, p. 730-9, Jul 15 1995.
- HOLZMULLER, P. et al. Lymphocytes of dogs immunised 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**, v. 106, n. 3-4, p. 247-57, Jul 2005
- HOLZMULLER, P.; BRAS-GONCALVES, R.; LEMESRE, J. L. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. **Parasitology**, v. 132 Suppl, p. S19-32, 200
- HORTA, M. F. et al. Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012
- JIN, H. T. et al. Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 33, p. 14733-8, Aug 17, 2010.
- JIN, H. T.; AHMED, R.; OKAZAKI, T. Role of PD-1 in regulating T-cell immunity. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 350, p. 17-37, 2011
- JOSHI, T. et al. B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8(+) T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 5, p. e1000431, May 2009
- KAECH, S. M.; CUI, W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 11, p. 749-61, Nov 2012
- KAMBAYASHI, T.; JACOB, C. O.; STRASSMANN, G. IL-4 and IL-13 modulate IL-10 release in endotoxin-stimulated murine peritoneal mononuclear phagocytes. **Cell Immunol**, v. 171, n. 1, p. 153-8, Jul 10 1996. ISSN 0008-8749 (Print)
- KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **J Immunol**, v. 166, n. 2, p. 1141-7, Jan 15 2001
- KASZAK, I.; PLANELLAS, M.; DWORECKA-KASZAK, B. Canine leishmaniosis - an emerging disease. **Ann Parasitol**, v. 61, n. 2, p. 69-76, 2015.
- KAUSHAL, H. et al. Role of CD8(+) T cells in protection against *Leishmania donovani* infection in healed Visceral Leishmaniasis individuals. **BMC Infectious Diseases**, London, v.

14, p. 653, 2014

KEENAN, C. M. et al. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. **Vet Pathol**, v. 21, n. 1, p. 74-9, Jan 1984

KOPF, M. et al. IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*. **J Exp Med**, v. 184, n. 3, p. 1127-36, Sep 1 1996

KOUTINAS, A. F. et al. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 35, n. 5, p. 376-83, Sep-Oct 1999.

LAGE, R. S. et al. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 115, n. 1-2, p. 135-45, Jan 2007

LAINSON, R.; RANGEL, B. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LECLERCQ, V. et al. The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice: a tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. **J Immunol**, v. 157, n. 10, p. 4537-45, Nov 1996

LEVICK, M. P. et al. Identification and characterisation of a functional peroxidoxin from *Leishmania major*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 96, n. 1-2, p. 125-37, Oct 1998

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **J Immunol**, v. 145, n. 12, p. 4306-10, Dec 1990

LIEW, F. Y. et al. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **Eur J Immunol**, v. 21, n. 12, p. 3009-14, Dec 1991.

LIMA, I. S. et al. Severe Clinical Presentation of Visceral Leishmaniasis in Naturally Infected Dogs with Disruption of the Splenic White Pulp. **PLOS ONE**, v. 9, n. 2, p. e87742, 2014

LINARES, E. et al. Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo revealed by protein nitration and hydroxylation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, n. 11, p. 1234-1242, 2001

MAIA, C.; CAMPINO, L. Cytokine and phenotypic cell profiles of leishmania infantum infection in the dog. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, 2012.

MANCIANTI, F. et al. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 82, n. 4, p. 566-7, 1988

MANNA, L. et al. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Vet Parasitol**, v. 142, n. 3-4, p. 271-80, Dec 20 2006

MAPA. Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008, Ministério da Agricultura, P.e.A., ed. (Brasília, Diário Oficial da União), p. 24, 2008.

MATLOUBIAN, M.; CONCEPCION, R. J.; AHMED, R. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. **J Virol**, v. 68, n. 12, p. 8056-63, Dec 1994

MATRALIS, D. et al. Detection of intracellular IFN-gamma and IL-4 cytokines in CD4+ and CD8+ T cells in the peripheral blood of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*.

Parasite Immunol, v. 38, n. 8, p. 510-5, Aug 2016

MATTOS JR., D. G. et al. Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, p. 119-122, 2004

MCEL RATH, M. J.; MURRAY, H. W.; COHN, Z. A. The dynamics of granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. **The Journal of experimental medicine**, v. 167, n. 6, p. 1927-37, 1988.

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 8, p. 606-616, 2005.

MELONEY, H. E. The Histopathology of Kala-Azar in the Hamster, Monkey, and Man. **The American Journal of Pathology**, v. 1, n. 2, p. 147-168.11, 1925

MELO, F. A. et al. Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Int J Exp Pathol**, v. 90, n. 5, p. 538-48, Oct 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção leishmania-HIV. Brasília: Ministério da Saúde: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2015.

MOHRS, M. et al. Differences between IL-4- and IL-4 receptor alpha-deficient mice in chronic leishmaniasis reveal a protective role for IL-13 receptor signaling. **J Immunol**, v. 162, n. 12, p. 7302-8, Jun 15 1999

MOMEN, H. et al. Molecular evidence for the importation of Old World *Leishmania* into the Americas. **Biol Res**, v. 26, n. 1-2, p. 249-55, 1993.

MOMO, C. et al. Morphological changes in the bone marrow of the dogs with visceral leishmaniasis. **Vet Med Int**, v. 2014, p. 150582, 2014.

MOREIRA, P.; HENRIQUE LEAL BERTOLO, P.; VASCONCELOS, R. **CD56 and CD3 expression in the liver and spleen of dogs with visceral leishmaniasis. Clinical and Diagnostic Pathology** Volume 1(2): 1-4, 2017

MUELLER, S. N.; AHMED, R. High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 21, p. 8623-8, May 26 2009

MURPHY, M. L. et al. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. **Eur J Immunol**, v. 31, n. 10, p. 2848-56, Oct 2001

MURRAY, H. W. et al. Experimental visceral leishmaniasis: production of interleukin 2 and interferon-gamma, tissue immune reaction, and response to treatment with interleukin 2 and interferon-gamma. **J Immunol**, v. 138, n. 7, p. 2290-7, Apr 1987

MURRAY, H. W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **Int J Exp Pathol**, v. 82, n. 5, p. 249-67, Oct 2001

MURRAY, H. W.; NATHAN, C. F. Macrophage Microbicidal Mechanisms In Vivo: Reactive Nitrogen versus Oxygen Intermediates in the Killing of Intracellular Visceral *Leishmania donovani*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 4, p. 741-746, 1999.

MURRAY, H. W.; XIANG, Z.; MA, X. Responses to *Leishmania donovani* in mice deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. **Am J Trop Med Hyg**, v. 74, n. 6, p. 1013-5, Jun 2006

MURRAY, H. W. et al. Gamma Interferon-Regulated Chemokines in *Leishmania donovani* infection in the Liver. **Infection and Immunity**, v. 85, n. 1, 2017

- NASCIMENTO, M. S. et al. Naturally Leishmania infantum-infected dogs display an overall impairment of chemokine and chemokine receptor expression during visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 153, n. 3-4, p. 202-8, Jun 2013.
- NASCIMENTO, M. S. et al. Impairment of Interleukin-17A Expression in Canine Visceral Leishmaniasis is Correlated with Reduced Interferon-gamma and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression. **J Comp Pathol**, v. 153, n. 4, p. 197-205, Nov 2015. ISSN 0021-9975.
- NATEGHI ROSTAMI, M. et al. Differential in vitro CD4+/CD8+ T-cell response to live vs. killed Leishmania major. **Parasite Immunology**, v. 32, n. 2, p. 101-110, 2010/02/01 2010
- NICOLLE, C; COMTE, C. Origine canine du Kala-azar. **Bull Soc Pathol Exot.**, v.1, p. 299-301, 1908.
- NIETO, A. et al. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus Syrian hamster model. **Vet Res**, v. 42, p. 39, Feb 2011
- NOLI, C.; AUXILIA, S. T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. **Veterinary dermatology**, v. 16, n. 4, p. 213–32, ago. 2005.
- NÜSSE, O. Biochemistry of the Phagosome: The Challenge to Study a Transient Organelle. **The Scientific World Journal**, v. 11, p. 2364–2381, 2011.
- NYLÉN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 9, p. 378–384, 2007.
- NYLEN, S. et al. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **J Exp Med**, v. 204, n. 4, p. 805-17, Apr 16, 2007.
- OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion Mechanisms by Which Leishmania Parasites Can Escape the Host Immune Response: A Signaling Point of View Subversion Mechanisms by Which Leishmania Parasites Can Escape the Host Immune Response: a Signaling Point of View. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 2, p. 293–305, 2005.
- OZA, S. L. et al. Trypanothione biosynthesis in Leishmania major. **Mol Biochem Parasitol**, v. 139, n. 1, p. 107-16, Jan 2005.
- PALTRINIERI, S. et al. Serum concentrations of the derivatives of reactive oxygen metabolites (d-ROMs) in dogs with leishmaniasis. **Vet J**, v. 186, n. 3, p. 393-5, Dec 2010.
- PANARO, M. A. et al. Evaluation of nitric oxide production by Leishmania infantum-infected dog macrophages. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 20, n. 1, p. 147-58, Feb 1998
- PANARO, M. A. et al. Nitric oxide production by Leishmania-infected macrophages and modulation by prostaglandin E2. **Clin Exp Med**, v. 1, n. 3, p. 137-43, Sep 2001
- PARAMCHUK, W. J. et al. Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from Leishmania chagasi: role in pathogenesis. **Mol Biochem Parasitol**, v. 90, n. 1, p. 203-21, Dec 1997.
- PATEL, A. P.; DEACON, A.; GETTI, G. Development and validation of four Leishmania species constitutively expressing GFP protein. A model for drug discovery and disease pathogenesis studies. **Parasitology**, v. 141, n. 4, p. 501-10, Apr 2014
- PAUN, A. et al. Critical Role of IRF-5 in the Development of T helper 1 responses to Leishmania donovani infection. **PLOS Pathogens**, v. 7, n. 1, p. e1001246, 2011
- PINELLI, E. et al. Leishmania infantum-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **Eur**

J Immunol, v. 25, n. 6, p. 1594-600, Jun 1995

PINELLI, E. et al. Infection of a canine macrophage cell line with leishmania infantum: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. **Vet Parasitol**, v. 92, n. 3, p. 181-9, Oct 1, 2000.

DA COSTA PINHEIRO, P. H. et al. Recombinant Cysteine Proteinase from Leishmania (Leishmania) chagasi Implicated in Human and Dog T-Cell Responses. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 6, p. 3787-3789 2005

POLLEY, R.; ZUBAIRI, S.; KAYE, P. M. The fate of heterologous CD4+ T cells during Leishmania donovani infection. **Eur J Immunol**, v. 35, n. 2, p. 498-504, Feb 2005.

QUINNELL, R. J. et al. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 183, n. 9, p. 1421-4, May 1 2001

RALLIS, T. et al. Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (Leishmania infantum): a clinicopathological study of 26 cases. **J Comp Pathol**, v. 132, n. 2-3, p. 145-52, 2005.

REIS, A. B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci*, v. 81, n. 1, p. 68-75, Aug 2006a

REIS, A. B. et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by Leishmania chagasi. *Clin Exp Immunol*, v. 146, n. 2, p. 303-11, Nov 2006b

REIS, A. B. 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**, v. 112, n. 3-4, p. 102-16, Aug 15 2006c

REIS, A. B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, v. 128, n. 1-3, p. 87-95, Mar 15, 2009

REIS, A. B. et al. Cellular immunophenotypic profile in the splenic compartment during canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, v. 157, n. 3-4, p. 190-6, Feb 2014.

RIBEIRO, R. R. et al. Relationship between clinical and pathological signs and severity of canine leishmaniasis. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 22, n. 3, p. 373-8, Jul-Sep 2013

ROATT, B. M. et al. A Vaccine Therapy for Canine Visceral Leishmaniasis Promoted Significant Improvement of Clinical and Immune Status with Reduction in Parasite Burden. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 217, 2017.

RODRIGUES, V. et al. Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. *Parasit Vectors*, v. 9, p. 118, Mar 2016.

ROMA, E. H. et al. Impact of reactive oxygen species (ROS) on the control of parasite loads and inflammation in Leishmania amazonensis infection. *Parasit Vectors*, v. 9, p. 193, Apr 2016

ROSÁRIO, C. J. R. M. D. et al. Quantificação da IL-10 e do INF- γ em cães com ou sem sinais clínicos de infecção com Leishmania (Leishmania) chagasi. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 129-132, 2018

ROSAS, L. E. et al. Cutting edge: STAT1 and T-bet play distinct roles in determining outcome of visceral leishmaniasis caused by Leishmania donovani. **J Immunol**, v. 177, n. 1, p. 22-5, Jul 1 2006

ROSS R. Note on the Bodies Recently Described by Leishman and Donovan. **Bmj**, v. 2, n.

2237, p. 1261–1262, 1903.

RUBIN, R., STRAYER D. Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine. Sixth Edition. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2012.

SACKS, D. L. Vaccines against tropical parasitic diseases: A persisting answer to a persisting problem. *Nature immunology*, v. 15, n. 5, p. 403-405, 2014.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu Rev. Microbiol.**, v. 55, p. 453–483, 2001.

SALOMÃO, N. E. O. Avaliação in vitro do potencial leishmanicida de derivados de aldiminas e adutos de Hantzsch. 2016. 117 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2016.

SANCHEZ, M. A. et al. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg*, v. 70, n. 6, p. 618-24, Jun 2004.

SANTANA, C. C. et al. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. **Parasite Immunol**, v. 30, n. 10, p. 515-24, Oct 2008

SANTOS-GOMES, G. M. et al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 88, n. 1-2, p. 21-30, Sep 6 2002

SARAIVA, M.; O’GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 3, p. 170–181, 2010.

SATOSKAR, A.; BLUETHMANN, H.; ALEXANDER, J. Disruption of the murine interleukin-4 gene inhibits disease progression during *Leishmania mexicana* infection but does not increase control of *Leishmania donovani* infection. **Infect Immun**, v. 63, n. 12, p. 4894-9, Dec 1995

SCHIETINGER A., GREENBERG P.D. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. **Trends Immunol.** ;35(2):51–60, 2014.

SCOTT, P. The role of TH1 and TH2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 68, n. 3, p. 369-372, 1989

SINGH, O. P. et al. Reassessment of immune correlates in human visceral leishmaniasis as defined by cytokine release in whole blood. *Clin Vaccine Immunol*, v. 19, n. 6, p. 961-6, Jun 2012

SISTO, M. et al. Inducible nitric oxide synthase expression in *Leishmania*-infected dog macrophages. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 24, n. 4, p. 247-54, Oct 2001.

SLAPPENDEL, R. J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. **Vet Q**, v. 10, n. 1, p. 1-16, Jan 1988

SLAPPENDEL RJ, TESKE E. The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimonite (Glucantime) in dogs with leishmaniasis—A randomized clinical trial. **Vet Q**. 19:10–13, 1997

SMITH, S. M. et al. Characterization of human *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin-reactive CD8+ T cells. **Infect Immun**, v. 67, n. 10, p. 5223-30, Oct 1999

SOARES, M. J. V. et al. Renal involvement in visceral leishmaniasis dogs. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, p. 579-593, 2005

- SOLANO-GALLEGOS, L. et al. The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Vet Parasitol**, v. 90, n. 1-2, p. 37-45, Jun 10 2000.
- SOLANO-GALLEGOS, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. **Vet Parasitol**, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, Oct 28, 2009
- SOLANO-GALLEGOS, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. **Parasit Vectors**, v. 4, p. 86, May 20 2011
- SOUSA-FRANCO, J. et al. Infection-induced respiratory burst in BALB/c macrophages kills *Leishmania guyanensis* amastigotes through apoptosis: possible involvement in resistance to cutaneous leishmaniasis. **Microbes Infect**, v. 8, n. 2, p. 390-400, Feb 2006
- STAGER, S.; RAFATI, S. CD8(+) T cells in leishmania infections: friends or foes? **Front Immunol**, v. 3, p. 5, 2012
- STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 138–147, 2007.
- Stauber L. Leishmaniasis in the hamster. In “Some Physiological Aspects and Consequences of Parasitism,” (W. H. Cole, ed.), Rutgers University Press, New Brunswick, New Jersey, 76–90, 1955
- STERN, J. J. et al. Role of L3T4+ and LyT-2+ cells in experimental visceral leishmaniasis. **J Immunol**, v. 140, n. 11, p. 3971-7, Jun 1 1988.
- STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G.; JAFFE, C. L. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Research**, v. 38, n. 4, p. 547–564, 2007.
- SVENSSON, M. et al. Invariant NKT cells are essential for the regulation of hepatic CXCL10 gene expression during *Leishmania donovani* infection. **Infect Immun**, v. 73, n. 11, p. 7541-7, Nov 2005
- TAFURI, W. L. et al. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, p. 81-89, 1996
- TAFURI, W. L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **J Immunol Methods**, v. 292, n. 1-2, p. 17-23, Sep 2004.
- TAKEMOTO, N. et al. Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8+ T cell differentiation. **J Immunol**, v. 177, n. 11, p. 7515-9, Dec 1, 2006.
- TASCA, Karen Ingrid et al. Exames parasitológicos, imunoistoquímicos e histopatológicos para detecção de *Leishmania chagasi* em tecidos esplênicos de cães com leishmaniose visceral. **Rev. Bras. Parasitol. Vet. (Online)**, Jaboticabal, v. 18, n. 1, p. 27-33, Mar. 2009
- TAYLOR, A. P.; MURRAY, H. W. Intracellular antimicrobial activity in the absence of interferon-gamma: effect of interleukin-12 in experimental visceral leishmaniasis in interferon-gamma gene-disrupted mice. **J Exp Med**, v. 185, n. 7, p. 1231-9, Apr 7 1997
- THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 279, n. 6, p. L1005-28, Dec 2000.
- TOMIOKA, M.; IINUMA, H.; OKINAGA, K. Impaired Kupffer cell function and effect of

- immunotherapy in obstructive jaundice. **J Surg Res**, v. 92, n. 2, p. 276-82, Aug 2000
- TROPIA DE ABREU, R. et al. Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with leishmania (*Leishmania*) chagasi. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e18873, May 10, 2011
- TSAGOZIS, P.; KARAGOUNI, E.; DOTSIKA, E. Function of CD8+ T lymphocytes in a self-curing mouse model of visceral leishmaniasis. **Parasitology international**, v. 54, n. 2, p. 139–46, 2005.
- TUON, F. F.; AMATO NETO, V.; SABBAGA AMATO, V. Leishmania: Origin, evolution and future since the Precambrian. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 158–166, 2008.
- USUI, Y. et al. The role of the ICOS/B7RP-1 T cell costimulatory pathway in murine experimental autoimmune uveoretinitis. **Eur J Immunol**, v. 36, n. 11, p. 3071-81, Nov 2006.
- VIANA, K. F. Metodologia para ensaios de candidatos vacinais contra leishmaniose visceral canina pelo co-cultivo de linfócitos e macrófagos infectados com *Leishmania chagasi*. 87f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2012.
- VIANA, K. F. et al. Analysis using canine peripheral blood for establishing in vitro conditions for monocyte differentiation into macrophages for *Leishmania chagasi* infection and T-cell subset purification. **Vet Parasitol**, v. 198, n. 1-2, p. 62-71, Nov 15 2013
- VIANA, K. F. et al. Setting the proportion of CD4+ and CD8+ T-cells co-cultured with canine macrophages infected with *Leishmania chagasi*. **Vet Parasitol**, v. 211, n. 3-4, p. 124-32, Jul 30 2015
- VIANA, K. F. et al. Application of rapid in vitro co-culture system of macrophages and T-cell subsets to assess the immunogenicity of dogs vaccinated with live attenuated *Leishmania donovani* centrin deleted parasites (*LdCen*^{-/-}). **Parasit Vectors**, v. 9, p. 250, Apr 30, 2016
- VILLARINO, A. V. et al. Posttranscriptional silencing of effector cytokine mRNA underlies the anergic phenotype of self-reactive T cells. **Immunity**, v. 34, n. 1, p. 50-60, Jan 28 2011
- VOULDOUKIS, I. et al. Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 40, n. 1, p. 253-6, Jan 1996.
- VOULDOUKIS, I. et al. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. **Eur J Immunol**, v. 27, n. 4, p. 860-5, Apr 1997
- WEI, X. Altered immune responses and susceptibility to *Leishmania major* and *Staphylococcus aureus* infection in IL-18-deficient mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 163, n. 5, p. 2821–2828, 1999.
- WHERRY EJ. T cell exhaustion. **Nat Immunol**,12(6):492–9, 2011.
- WHERRY, E. J.; KURACHI, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 8, p. 486-99, Aug 2015
- WHO. Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. **Weekly epidemiological record**, v. 38, p. 557 - 572, 2017.
- WILSON, M. E. et al. Local suppression of IFN-gamma in hepatic granulomas correlates with tissue-specific replication of *Leishmania chagasi*. **J Immunol**, v. 156, n. 6, p. 2231-9, Mar 15

1996.

WIZEL, B. et al. Human infection with *Trypanosoma cruzi* induces parasite antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses. **J Clin Invest**, v. 102, n. 5, p. 1062-71, Sep 1 1998

WOODLAND, D. L.; DUTTON, R. W. Heterogeneity of CD4(+) and CD8(+) T cells. **Curr Opin Immunol**, v. 15, n. 3, p. 336-42, Jun 2003

YASUR-LANDAU, D. et al. Allopurinol Resistance in *Leishmania infantum* from Dogs with Disease Relapse. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 1, p. e0004341, Jan 2016.

ZAFRA, R. et al. High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 123, n. 3-4, p. 353-9, Jun 15, 2008.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. Differentiation of effector CD4 T cell populations. **Annu Rev Immunol.**, v. 28, n. 1, p. 445-489, 2010.

9 ANEXOS

9.1 Anexo 1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICBS-I, Sala 29
38400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3568-1388 Fax: (31) 3568-1378
Email: ceua@ufop.edu.br



OFÍCIO CEUA N°. 109/2016, de 23 de junho de 2016

Ilustríssimo(a) Senhor(a)
Professor(a) Doutor(a) Alexandre Barbosa Reis
NUPEB/UFOP

Senhor(a) Pesquisador(a),

Estamos enviando o certificado de aprovação do protocolo n°. 2015/33, intitulado "*Habilidade versus inabilidade microbicida de macrófagos e suas correlações com a hepatoesplenomegalia, formas clínicas e carga parasitária na leishmaniose visceral canina.*".

2. Atendendo ao art. 6º, IX, da Resolução Normativa CONCEA nº 1, de 09.07.2010, solicitamos que encaminhe a CEUA/UFOP o relatório final do projeto, após executá-lo, conforme modelo do site da CEUA.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª Lenice Kappes Becker
Coordenadora da CEUA/UFOP.

9.2 Anexo 2



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas
Laboratório de Imunopatologia
NUPEB/UFOP



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas
Laboratório de Imunopatologia
NUPEB/UFOP



ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Informação aos proprietários de cães naturalmente infectados

Você está sendo solicitado a ceder seu cão para que dele possam ser coletados materiais biológicos destinados à pesquisa científica. O objetivo desta pesquisa é entender as diferenças na capacidade de destruição dos parasitas nos cães que apresentam, ou não sintomas da doença. Os cães participantes neste trabalho devem ser necessariamente positivos para a LVC, de acordo com os testes exigidos pelo Ministério da Saúde. Por isto, o cão que está sendo requerido deverá obrigatoriamente ser recolhido para eutanásia de acordo com a exigência da lei.

Então, antes da eutanásia do cão, solicitamos ao proprietário(a) do cão que nos ceda o animal para coleta de amostras biológicas.

Ninguém poderá obrigá-lo a aceitar esta solicitação, mas contamos com seu apoio para que possamos obter materiais do cão antes de sua eutanásia. Esta pesquisa será muito importante para aperfeiçoarmos o diagnóstico da doença e para termos melhores condições no seu controle.

Estamos à sua disposição para esclarecer qualquer pergunta ou dúvida que o(a) senhor(a) tenha a respeito deste trabalho. O seu nome não aparecerá em nenhum momento durante esta pesquisa garantindo assim sua privacidade. Caso em qualquer momento exista alguma objeção da sua parte à participação do seu cão no experimento, os dados do mesmo serão retidos imediatamente.

Esta pesquisa está sendo realizada por profissionais do Laboratório de Imunopatologia da Universidade Federal de Ouro Preto, MG.

Se você estiver de acordo em contribuir com esta pesquisa cedendo o seu cão, assinie ou marque com sua digital no espaço abaixo. Desde já agradecemos pela sua participação.

Nomes completo do proprietária (maior de idade): _____

Assinatura do proprietário (maior de idade): _____

RG _____ CPF _____

Endereço do proprietária: _____

(a preencher pelo pesquisador)

Microchip _____ Características _____

Governador Valadares, ____/____/2017

Caso tenha alguma dúvida contactar:

LIMP (Laboratório de Imunopatologia): Universidade Federal de Ouro Preto
Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - Ouro Preto - MG -
CEP 35400
NUPEB - Edifício Scale - 3º Andar
Telefone: (31) 3559-1664

CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais): Universidade Federal de Ouro Preto
Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - Ouro Preto - MG -
CEP 35400-000
ICEB II - PROPP - Sala 29
Telefone: (31) 3556-1368



NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
NUPEB - ICEB II - sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto
Campus Universitário/Morro do Cruzeiro | CEP 35.403-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Tel: 55 (31) 3559-1666 | E-mail: nupeb@ufop.br | www.nupeg.ufop.br



NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
NUPEB - ICEB II - sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto
Campus Universitário/Morro do Cruzeiro | CEP 35.403-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Tel: 55 (31) 3559-1666 | E-mail: nupeb@ufop.br | www.nupeg.ufop.br

9.3 Anexo 3



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas
Laboratório de Imunopatologia



Ficha de Identificação e Controle de Cães Projeto de Doutorado do aluno João Vieira

Ficha de Classificação Clínica - Identificação

Nome: Negão	Baia: 2	
n°: 39		
Raça: SRD		
Peso: 20kg		
Idade: Incerta		
Pelagem: Curta		
Cor da Pelagem: Preta		
Peculiaridades: Ceratite e Conjuntivite		
Sexo: <input checked="" type="checkbox"/> Macho <input type="checkbox"/> Fêmea		
Porte: <input type="checkbox"/> Pequeno <input checked="" type="checkbox"/> Médio <input type="checkbox"/> Grande		
Procedência: Governador Valadares		
Diagnóstico: Sorológico DPP/ELISA <input checked="" type="checkbox"/>	Parasitológico: <input checked="" type="checkbox"/>	
Vacina para LVC: <input type="checkbox"/> Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não	Tratamento para LVC: <input type="checkbox"/> Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não	

9.4 Anexo 4

Quadro 10: Sinais clínicos presentes nos cães do grupo sintomático.

Cão	Sinais Clínicos
C16	alopecia, dor articular, linfadenopatia generalizada, perda de peso
C26	alopecia, dor articular, úlceras
C29	alopecia, apatia, dor articular, linfadenopatia generalizada, perda de peso
C31	alopecia, apatia, diarreia, emaciação, epistaxes, febre, linfadenopatia generalizada, queratoconjuntivite, úlceras
C39	alopecia, dor articular, emaciação, febre, queratoconjuntivite, úlceras
C209	apatia, diarreia, emaciação, febre, linfadenopatia generalizada, vômito,
C229	apatia, convulsões, diarreia, dor articular, emaciação, linfadenopatia generalizada, queratoconjuntivite, vômito
C267	apatia, diarreia, dor articular severa, emaciação, linfadenopatia generalizada, perda de apetite, úlceras
C353	alopecia, linfadenopatia, perda de peso, úlceras