

SIMONE MOUSINHO FREIRE

Células T reguladoras (T reg) e sua relação com as alterações esplênicas e com as manifestações clínicas de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*

TERESINA/PI

2010

SIMONE MOUSINHO FREIRE

Células T reguladoras (T reg) e sua relação com as alterações esplênicas e com as manifestações clínicas de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa
Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal

TERESINA/PI

2010

SIMONE MOUSINHO FREIRE

Células T reguladoras (T reg) e sua relação com as alterações esplênicas e com as manifestações clínicas de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*

Dissertação aprovada em: 29/09/2010

Banca examinadora:

Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa – CCA/UFPI

Orientador

Prof. Dr. José Ângelo Lauletta Lindoso – IMT/USP

Examinador Externo

Prof^a. Dra. Maria das Graças Prianti – CCA/UFPI

Examinadora Interna

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

DEDICO

Aos meus pais e meus irmãos pelo seu caráter, dignidade, dedicação, doação e firmeza para lutar pelos seus objetivos tornando-os exemplos de vida.

A minha filha Alana e meu esposo Edimar, por entender minha ausência em tantos momentos e saber que tudo que faço é para dar-lhes um futuro melhor.

A todos demais familiares e amigos que sempre me incentivam na busca dos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, minha força maior.

Aos cães que fizeram parte desta pesquisa sem os quais a mesma não teria sido desenvolvida.

Ao meu orientador, prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa, pela orientação.

Ao prof. Dr. José Ângelo Lauletta Lindoso, pela coorientação e pelo auxílio imprescindível na realização da citometria de fluxo.

As colegas do Setor de Patologia Animal/CCA/UFPI, Ângela, Ana Lys, Edson, Fernando, Geórgia, Nilton, Prianti, Sammya e em especial Lucilene, pelos momentos de convivência no laboratório e pelo auxílio nas horas difíceis.

A Camilla, Sandra, Edna, Anne e Viviane, do laboratório de Soroepidemiologia do Instituto de Medicina Tropical- USP, por terem me recebido de braços abertos em seu ambiente de trabalho e terem tido a paciência de ensinar técnicas até então desconhecidas por mim e pelos momentos de alegria, em especial na reunião do “almoço”.

A meus pais e irmãos pelo apoio incondicional.

Aos amores da minha vida, esposo Edimar Freire e minha filha Alana, pelo amor e compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus queridos familiares: irmãos, cunhados, sogros e sobrinhos, pelo apoio, carinho e incentivo.

Ao Sr Miguel da Gerência de Controle de Zoonoses-GEZOON pelo imenso apoio prestado nas coletas.

Aos professores e funcionários da Pós-graduação em Ciência Animal da UFPI, e aos funcionários do Setor de Patologia Animal/UFPI, especialmente ao Sr. Manoel.

A todos que, de algum modo contribuíram para realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!!

SUMÁRIO

RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 CAPÍTULO I:	
Células T reguladoras (T reg) no baço de cães com diferentes manifestações clínicas de leishmaniose visceral.....	13
ABSTRACT.....	13
2.1 INTRODUÇÃO.....	14
2.2 MATERIAL E MÉTODO.....	15
2.3 RESULTADOS.....	19
2.4 DISCUSSÃO.....	30
2.5 CONCLUSÕES.....	34
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	41
APÊNDICE	

RESUMO

FREIRE, Simone M.; MAGALHÃES, Nilton A.; FAZZANI, Camila; LINDOSO, José A.L.; GOTO, Hiro; COSTA, Francisco A. L. **Células T reguladoras (T reg) e sua relação com as alterações esplênicas e com as manifestações clínicas de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi***. *Veterinary Immunology and Immunopathology*.

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi*. É transmitida pela picada do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. O cão é considerado o principal reservatório da doença no meio urbano. O baço é um dos órgãos hematopoiéticos e imunocompetentes envolvidos na LV, por ser um filtro de sangue. O papel imunossupressor das células T regulatórias pode afetar desfavoravelmente o combate a LV, onde os relatos sobre a frequência e a função destas células não são conclusivos. O objetivo desse trabalho foi avaliar em baço de cães a participação de células T reg na modulação da resposta frente à infecção por leishmânia e relacionar sua presença com a intensidade das manifestações clínicas e alterações do órgão. Foram utilizados 39 animais, machos e fêmeas de idades desconhecidas. O diagnóstico de leishmaniose foi realizado por meio de exame sorológico (ELISA), parasitológico (punção de medula e *imprint* de baço). Os animais foram divididos em quatro grupos: Infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, e assintomáticos, oligossintomáticos, polissintomáticos e grupo controle (não infectados). Foram coletados sangue e fragmentos de baço. Foram preparados *imprints* do órgão em lâminas para análise citológica, em seguida fragmentos foram fixados em formol a 10% para análise histopatológica e morfométrica, e em meio RPMI 1640 para realização da citometria de fluxo. Os achados clínicos mais frequentes foram lesões de pele (76,9%) e linfadenopatia (65,38%). A análise histopatológica do baço revelou alterações como: Infiltrado inflamatório neutrofílico na cápsula, granuloma, hiperplasia de folículos e depleção de células T. Hiperplasia de folículos era mais frequente no grupo de animais assintomáticos comparado aos oligossintomáticos e polissintomáticos ($P = 0.000117$). Hipercelularidade foi maior nos assintomáticos comparado aos demais grupos ($P = 0.0000145$). Nos polissintomáticos, observou-se maior depleção de células da bainha periarteriolar com grau de intensidade variando de normal a moderadamente severo ($P = 0.000191$). Hiperplasia de células T foi maior nos assintomáticos ($P = 0.00000103$). Granuloma de intensidade média foi observado em maior quantidade no grupo de animais assintomáticos ($P = 0.000580$). Neste estudo, células TCD4⁺ foram marcadas usando-se anticorpo anti-CD4+ canino (clone YKIX302.9) e para Foxp3, anticorpo anti-mouse/rato (clone FJK-16s) e analisadas por citometria de fluxo. A quantificação de células TCD4⁺ e TCD4⁺Foxp3⁺, não revelou diferença significativa entre os grupos de cães examinados, contudo, havia uma tendência numericamente superior de TCD4⁺ em animais controles, comparado aos infectados e de células TCD4⁺ Foxp3⁺ em animais polissintomáticos. Os resultados revelam que as manifestações clínicas da leishmaniose visceral canina progredem com a intensidade das alterações no baço, assim como a quantidade de células T reg tendem a ser maior nos animais com maior quantidade de manifestações clínicas. Nos animais oligossintomáticos existe baixa quantidade de células T reg.

Palavras-chave: *Leishmania*, células T reg, baço, cão

ABSTRACT

FREIRE, Simone M.; MAGALHÃES, Nilton A.; FAZZANI, Camila; LINDOSO, José A.L.; GOTO, Hiro; COSTA, Francisco A. L. **Regulatory T cells (T reg) and its relationship with changes in spleen and clinical manifestations in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi***. Veterinary Immunology and Immunopathology.

Visceral Leishmaniasis (VL) is a zoonosis caused by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. It is transmitted by the bite of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. The dog is considered the main reservoir of disease in an urban environment. The spleen is a haematopoietic and immunocompetent organs involved in the VL, as a filter for blood. The role of immunosuppressive regulatory T cells can negatively affect the fighting VL, where the reports the frequency and function of these cells are not conclusive. The objective of this study was to evaluate in the spleen of dogs involving T reg cells in modulating the response against *Leishmania* infection and correlate their presence with the severity of clinical manifestations and organ. We used 39 animals, males and females of ages unknown. The diagnosis of leishmaniasis was performed by serology (ELISA), parasitology (puncture of bone marrow and imprint of spleen). The animals were divided into four groups: Infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* and asymptomatic, oligosymptomatic, polysymptomatic and control group (uninfected). We collected blood and fragments of spleen. Organ imprints were prepared on slides for cytological analysis, then samples were fixed in 10% formalin for histological and morphometric, and RPMI 1640 for performing flow cytometry. The most frequent clinical findings were skin lesions (76.9%) and lymphadenopathy (65.38%). Histopathologic analysis revealed changes in the spleen as inflammatory neutrophilic infiltration in the capsule, granuloma, hyperplasia of follicles and depletion of T cells. Follicle hyperplasia was more frequent in the group of animals asymptomatic compared with oligosymptomatic and polysymptomatic ($P = 0.000117$). Hypercellularity was higher for asymptomatic compared to other groups ($P = 0.0000145$). In polysymptomatic, there was a greater depletion of periarteriolar sheath cells with the intensity ranging from normal to moderate ($P = 0.000191$). Hyperplasia of T cells was higher in asymptomatic ($P = 0.00000103$). Granuloma of medium intensity was observed in greater quantity in the group of asymptomatic animals ($P = 0.000580$). In this study, TCD4⁺ cells were stained using antibody anti-canine CD4⁺ (clone YKIX302.9) and Foxp3, antibody anti-mouse (clone FJK-16s) and analyzed by flow cytometry. The quantification of TCD4⁺ and TCD4⁺ Foxp3⁺, showed no significant difference between groups of dogs examined, however, there was a tendency numerically higher TCD4⁺ cells in control animals, compared to infected and cells TCD4⁺ Foxp3⁺ in animal polysymptomatic. The results show that the clinical manifestations of canine visceral leishmaniasis in progressing with the intensity of the changes in the spleen, as well as the amount of T reg cells tend to be higher in animal with much clinical manifestations. In animals oligosymptomatics there are low number of T reg cells.

Keywords: *Leishmania*, T reg cells, spleen, dog

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Etiologia, vetores e reservatórios das Leishmanioses

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmânia*. São taxonomicamente classificados na Ordem *Kinetoplastida*, Família *Trypanosomatidae*, pertencentes aos Subgêneros *Leishmânia* e *Viannia* (REY, 2001; NEVES, 2005). Acometem principalmente órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) (SANTOS-GOMES, CAMPINO, ABRANCHES, 2000; SILVA, 2007).

As leishmânias são protozoários digenéticos, unicelulares, encontradas nas formas promastigota e paramastigota, que são formas flageladas livres do trato digestivo dos insetos vetores, e na forma amastigota, sem flagelo, encontrada no interior de células, principalmente do sistema fagocítico mononuclear (SFM) de hospedeiros vertebrados. (Figura 1 A e B) (BRASIL, 2000; REY, 2001; NEVES, 2005)

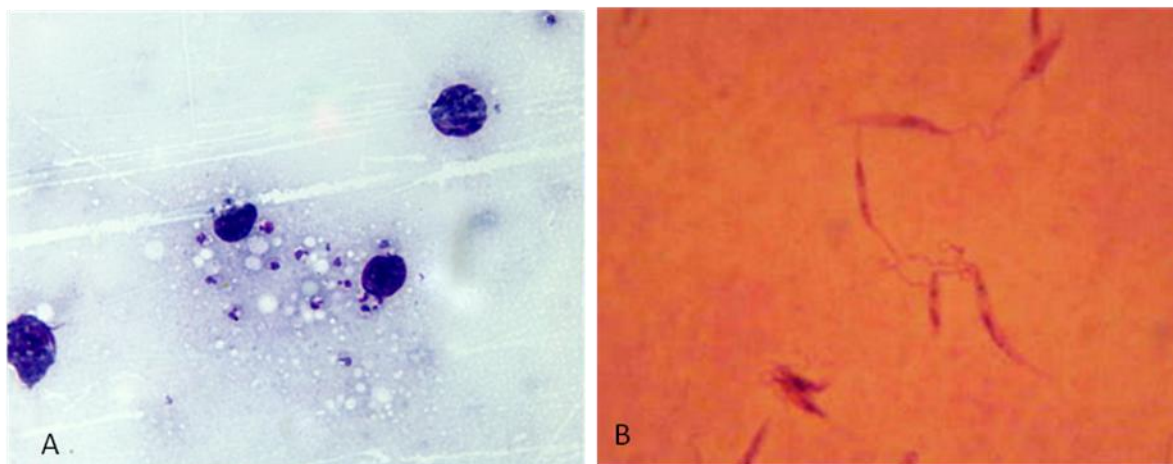


Figura 1. Formas de leishmânias observadas ao microscópio. (A) forma amastigota (B) forma promastigota.

Fontes: (A) Setor de Patologia Animal- CCA/ UFPI

A leishmaniose visceral (LV) está presente em quatro dos seis continentes e é causada pela *Leishmânia (L.) donovani* na Índia e no leste da África; *Leishmânia (L.) infantum* na China, Ásia Central e nos países mediterrâneos da Europa e África, *Leishmânia (L.) chagasi* (Sinonímia = *L. infantum*) nas Américas (LAISON e SHAW, 1987; MAURÍCIO, STOTHARD, MILES, 2000).

Na natureza todas as espécies de leishmânias existentes são transmitidas ao homem e a outros mamíferos por meio da picada de fêmeas de flebotomíneos hematófagos (Ordem *Díptera*, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*), especialmente a *Lutzomyia longipalpis* no Novo Mundo, incluindo o Brasil, e o gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo (Figura 2). Recentemente a *Lutzomyia cruzi* foi considerada como vetor em foco no estado de Mato Grosso do Sul (SANTOS et al., 1998; MISSAWA, 2006). Pode haver ainda transmissão por transfusão de sangue e compartilhamento de agulhas.

No vetor, os parasitos são extracelulares. No organismo humano e de outros animais vertebrados, são intracelulares e na maior parte das vezes, as células parasitadas são macrófagos e monócitos (MARZOCHI et al,1981).



Figura 2. *Lutzomyia sp.* Vetor de Leishmaniose no novo mundo.

Fonte: Setor de Patologia Animal- CCA/UFPI

No Brasil, os mais importantes reservatórios da LV são o cão (*Canis familiaris*) no ambiente doméstico, e a raposa (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) no ambiente silvestre (Figura 3 A e B). Os marsupiais didelfídeos (Figura 4) foram encontrados infectados no Brasil e na Colômbia (COSTA et al., 1990; COSTA, 1997; COSTA et al., 2000; BRASIL, 2006).

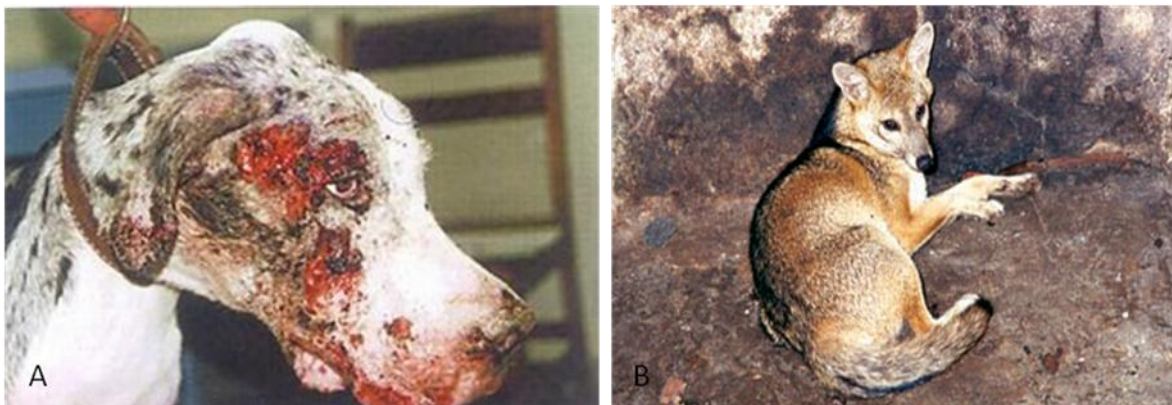


Figura 3. Reservatórios da *Leishmania (L) chagasi*. No ambiente doméstico (A) *Canis familiaris* e no ambiente silvestre (B) a raposa.

Fontes: (A) *Canis familiaris*- [http. www.bp0.blogger.com/.../6PrPeAdTYVU/s320/1819.jpg](http://www.bp0.blogger.com/.../6PrPeAdTYVU/s320/1819.jpg) e (B) raposa. BRASIL, 2006.



Figura 4. Marsupial delfídeo. Reservatório da *Leishmania (L) chagasi* no ambiente silvestre.
Fonte: BRASIL, 2006.

1.2 Aspectos epidemiológicos

As leishmanioses são endêmicas em 88 países, e atualmente têm sido relatadas também em áreas não endêmicas. É um grande problema de saúde pública, com uma prevalência mundial de 12 milhões de casos/ano e uma incidência de 1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500.000 casos de leishmaniose visceral (WHO, 2010)

No Brasil, na década de 90, noventa por cento (90%) dos casos notificados de LV ocorreram na Região Nordeste. À medida que a doença vem se expandindo para as outras

regiões, novas áreas urbanas e periurbanas vêm sendo atingidas e, no período de 2000 a 2002, a Região Nordeste já apresentava uma redução para 77% dos casos do País (BRASIL, 2006).

No Piauí no ano de 2008 foram confirmados 350 casos da doença no homem, dos quais 18 vieram a óbito (SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DO PIAUÍ, 2008). O cão tem um papel importante no ciclo infeccioso da doença, devido ao intenso parasitismo cutâneo, facilitando a infecção do vetor. Ele é o elo mais importante na manutenção do ciclo infeccioso da doença, também por fazer parte do convívio humano. (LAINSON, SHAW, 1987; DANTAS-TORRES, BRANDÃO-FILHO, 2006). Contudo, a eliminação de cães soropositivos para LV não tem contribuído para diminuição da incidência da doença. (BRAGA et al., 1998).

No Estado do Piauí, no ano de 2007, foram registrados 1027 casos de cães positivos para LV (BRASIL, 2007; GEZOON, 2007).

1.3 Ciclo Biológico

O ciclo biológico da *Leishmania* envolve o flebotomíneo e o hospedeiro (humano ou animal). A infecção do vetor ocorre quando a fêmea do flebotomíneo ingere macrófagos parasitados durante o repasto sangüíneo. No trato digestivo anterior do inseto, o macrófago se rompe liberando formas amastigotas, essas se diferenciam em promastigotas, que se dividem por divisão binária. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, permanecendo aderidas ao epitélio pelo flagelo, e se diferenciam em formas promastigotas metacíclicas (formas infectantes) (SANTOS-GOMES, CAMPINO, ABRANCHES, 2000; TAFURI et al., 2001; FEITOSA, 2006).

A transmissão do parasito ocorre durante novo repasto sangüíneo da fêmea infectante; ao picar o hospedeiro, liberam as formas promastigotas metacíclicas. No hospedeiro, estas formas são fagocitadas por macrófagos, diferenciam-se em amastigotas, e multiplicam-se intensamente, no vacúolo parasitóforo. Os macrófagos, repletos de formas amastigotas, rompem-se liberando essas formas, que serão, num processo contínuo, fagocitadas por novos macrófagos. Ocorre então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário (LAINSON, SHAW, 1987; NEVES, 2005) (Figura 5).

1.4 Formas clínicas de leishmanioses

As leishmanioses apresentam-se sob três formas clínicas: cutânea (incluindo uma forma cutânea difusa), cutâneo-mucosa e visceral. No primeiro caso as lesões produzidas restringem-se, na maior parte das vezes, apenas à pele. As formas cutâneo-mucosas são caracterizadas por lesões ulcerativas e destrutivas das mucosas. A forma visceral caracteriza-se pelo parasitismo intenso e disseminado das células do sistema fagocítico mononuclear (REY, 2001).

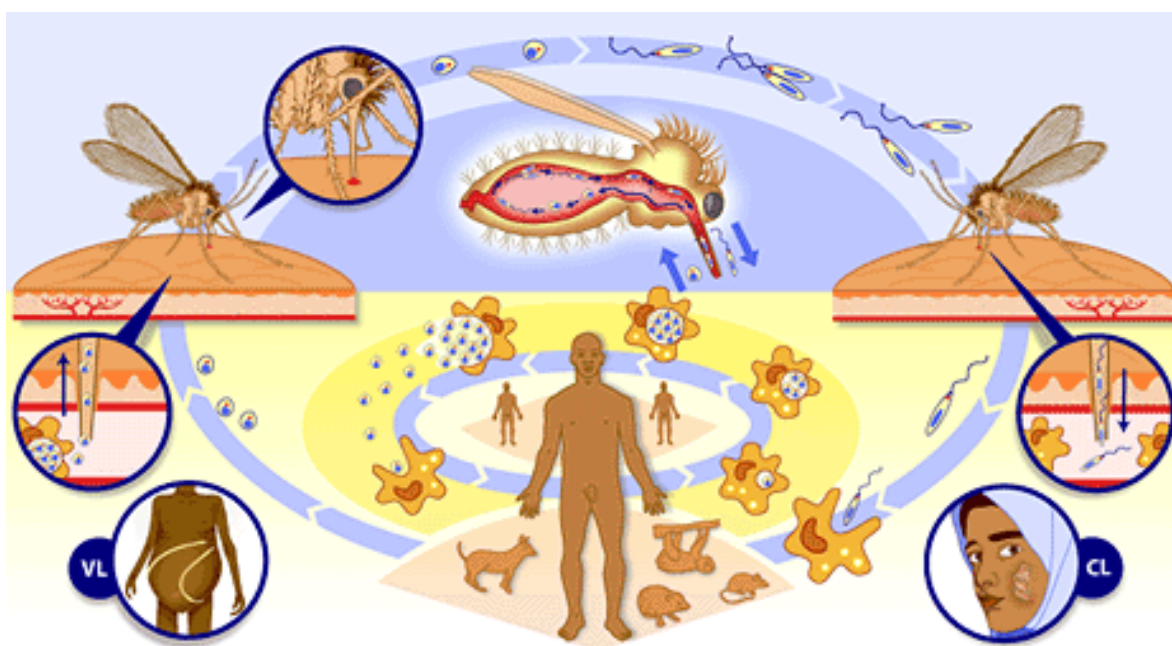


Figura 5. Ciclo evolutivo e formas de transmissão das leishmanioses.

FONTE: BRASIL, 2006

Inicialmente a infecção leishmaniótica no cão não apresenta sinais clínicos, mas posteriormente pode progredir para a forma plenamente manifesta da doença, a menos que a replicação das amastigotas seja cessada pelo mecanismo imunológico (LITTLE, 2006). Assim, produz um amplo espectro de manifestação, variando de formas assintomáticas, oligossintomática até a forma clássica (POZIO et al., 1981). A infecção isoladamente não significa necessariamente doença ativa (MORENO, ALVAR, 2002).

As manifestações clínicas da LV no cão são inespecíficas, caracterizando-se por febre irregular por longos períodos, anemia, perda progressiva de peso e caquexia em seu estágio final. Após a infecção muitos cães apresentam doença crônica progressiva com alopecia, esfoliação cutânea, úlceras na pele, linfadenopatia, emagrecimento, alterações hematológicas e bioquímicas, como anemia, trombocitopenia, leucocitose, hiperproteinemia, hiperglobulinemia,

com inversão do índice albumina/globulina, aumento sérico da atividade das enzimas hepáticas e elevação da uréia e creatinina (CIARAMELLA et al., 1997; FERRER, 1999; LIMA et al., 2004; LANGONI et al., 2005; LINHARES et al., 2005; FEITOSA, 2006; KRAUSPENHAR et al., 2007). Muitos cães são assintomáticos (POZIO et al., 1981) e outros apresentam sintomas que são comuns a outras doenças, o que dificulta o reconhecimento da enfermidade em áreas endêmicas (FERRER, 1999).

Os sinais clínicos, quando presentes, manifestam-se por linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, alopecia, onicogrifose, despigmentação da pele do focinho, conjuntivite, nódulos ou ulcerações (mais freqüentes nos bordos das orelhas), hemorragias intestinais, paralisia de membros posteriores, ceratite com cegueira e caquexia (FEITOSA, 2006).

O reconhecimento das manifestações clínicas dos reservatórios é importante para adoção de medidas de controle da doença. Contudo, Cerca de 60-80% dos cães que têm contato com o parasito, não apresentam manifestações clínicas da enfermidade, tornando-se difícil o diagnóstico clínico (BERRAHAL et al., 1996; CABRAL et al., 1998; SOLANO-GALLEGO et al., 2001).

1.5 Aspectos anátomo-histopatológicos da leishmaniose visceral

A LV atinge com maior intensidade órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM): fígado, baço, medula óssea e linfonodos. O baço aumenta consideravelmente de volume devido a hipertrofia e hiperplasia das células do SFM, com alto grau de parasitismo e com grande diferenciação plasmocitária (MARZOCHI et al., 1981). As alterações patológicas apresentam graus variados de intensidade e o aspecto macroscópico das lesões está relacionado com a evolução da doença. Sendo assim, a fibrose da cápsula, acompanhada por periesplenite e hiperplasia da polpa branca, normalmente ocorre nos casos sintomáticos e de evolução crônica, nos quais o baço apresenta uma consistência firme, cápsula espessa e rugosa, parênquima granular grosseiro. Em outros casos, o órgão está aumentado de volume, cápsula tensa, deixando transparecer a hiperplasia da polpa branca (pontos brancacentos difusamente distribuídos e identificados na superfície de corte do órgão) (KRAUSPENHAR et al., 2007).

As lesões histopatológicas clássicas da LV são mais observadas em órgãos do sistema fagocitário mononuclear como fígado, baço, linfonodos e medula óssea, mas outros órgãos como rins, trato gastrintestinal e pele, também, são acometidos (COUTINHO, 2005). Na maioria dos

órgãos, os macrófagos parasitados podem ser encontrados tanto de forma difusa quanto podem constituir granulomas e, às vezes, podem estar associados a grandes quantidades de plasmócitos (RIDLEY, 1987). No fígado, são observadas inflamações granulomatosas, hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer, as quais podem estar intensamente parasitadas. (XAVIER et al., 2006). Krauspenhar et al (2007) observaram reação linfohistioplasmocitária marcante e imunomarcção positiva para leishmânia. Na medula óssea, os histiócitos parasitados vão gradativamente substituindo o tecido hematopoiético (REY, 2001).

Os linfonodos podem conter lesões hipertróficas nas regiões corticais e medulares com amastigotas dentro de macrófagos medulares (LIMA et al., 2004). Na medula óssea, como em outros órgãos linfóides, é característica a hipertrofia e a hiperplasia das células (TAFURI et al., 2001; KRAUSPENHAR et al., 2007).

Nos rins, a deposição de imunocomplexos nos glomérulos pode acarretar em glomerulonefrite membranoproliferativa e nefrite intersticial com comprometimento da função renal (LOPEZ et al., 1996), muitas vezes sendo a principal causa da morte de cães com leishmaniose. Mas, a nefropatia pode ser causada pelo infiltrado de células T CD4+ detectadas na região glomerular e intersticial dos rins de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* (COSTA et al., 2000; COSTA et al., 2010). A insuficiência renal pode estar presente em cães sem os sinais clínicos sistêmicos de leishmaniose (CIARAMELLA et al., 1997).

No pulmão observa-se pneumonia intersticial, multifocal, caracterizada por espessamento dos septos alveolares por macrófagos, linfócitos, plasmócitos e células intersticiais com inclusões lipídicas e congestão de capilares septais e edema discreto (SLAPPENDEL, 1988; KOUTINAS et al., 1999; TORRENT et al., 2005). Outros trabalhos mostram a presença de fibrose, exsudato bronquiolar e ainda descamação do epitélio, com perda de cílios, presença de hemossiderina e hiperplasia de células caliciformes. (MAGALHÃES, 2009)

O baço é um órgão de especial importância na LV canina, uma vez que é um dos primeiros a ser ativado na interação parasito hospedeiro, culminando com a indução da resposta imunológica. Dependendo do tipo de resposta, as lesões variam quanto à intensidade, determinando as alterações morfológicas nesse órgão (ABBAS, 1997). De um modo geral observa-se esplenomegalia acentuada decorrente da reatividade do sistema fagocítico mononuclear e da congestão dos sinusóides. Microscopicamente sobressai o espessamento da cápsula, hipotrofia da polpa branca ou intensa hipertrofia e hiperplasia do sistema fagocítico mononuclear com muitos macrófagos densamente parasitados por amastigotas. Verificam-se

diminuição dos linfócitos dos folículos linfóides, redução dos linfócitos T e infiltração de plasmócitos e macrófagos, estes densamente parasitados por amastigotas. Eventualmente há focos de amiloidose na polpa branca ou nos sinusóides (DUARTE, 2000, REY, 2002). Pode haver ainda reação inflamatória crônica e difusa, com macrófagos organizados em granulomas e repletos de amastigotas (XAVIER et al., 2006)

1.6 Aspectos imunológicos da leishmaniose

Ao penetrar no hospedeiro vertebrado, a leishmânia ativa o sistema imune, o qual passa a reagir contra a infecção por meio das respostas imune inata envolvendo fagócitos, células “natural killer” (NK), sistema complemento e fatores de crescimento. São esses elementos que formam a primeira barreira à infecção, dificultando a sua instalação e que, ao mesmo tempo, constituem elementos que auxiliam a evasão do parasito da resposta protetora do hospedeiro (GOTO, 2004). A resposta adaptativa caracteriza-se pela produção de citocinas e anticorpos (CASTELLANO, 2005) cuja abordagem mais aprofundada será descrita a seguir.

As formas promastigotas são fagocitadas pelos neutrófilos, que são as primeiras células a migrarem para o local da infecção (WOODMAN et al, 1998) e podem ser destruídas pela ação de produtos do metabolismo oxidativo, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), atividade enzimática e produção de óxido nítrico (PEARSON, STEIGBIGEL, 1981; MURRAY et al, 1983). Óxido nítrico produzidos por macrófagos ativados por interferon-gama ($IFN-\gamma$) ou pelo fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$) estão relacionados com resistência à infecção. A atividade leishmanicida do macrófago está também na dependência da produção do fator de crescimento de transformação beta ($TGF-\beta$). Essa citocina está relacionada à inativação de macrófagos, favorecendo a replicação do parasita além de inibir a ação do $IFN-\gamma$ e reduzir a expressão de moléculas MHC classe II (DING et al, 1990; GANTT et al, 2003).

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina produzida por macrófagos que também contribui para a sobrevivência da leishmânia nessas células. Ela inibe a síntese de outras citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-8 e $TNF-\alpha$ (DE WAAL MALEFYT et al, 1991a) e inibe a função das células apresentadoras de antígeno, pela diminuição da expressão de moléculas do complexo MHC de classe II (DE WAAL MALEFYT et al, 1991b). Na infecção crônica, quantidades semelhantes de IL-10 são produzidas tanto em linhagens resistentes quanto susceptíveis de camundongos. Entretanto, no início da infecção, a produção de IL-10 é significativamente maior nos animais susceptíveis (CHATELAIN et al, 1992).

Importante papel na mediação imune da LV tem as células T CD4+. Elas podem ser subdivididas em subpopulações baseadas na produção de citocinas após estimulação *in vitro*. As células T “helper” tipo 1 (Th1) produzem IFN- γ e interleucina-2 (IL-2), fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), interleucina-3 (IL-3) e linfotóxina (TNF- α), e são responsáveis pela imunidade mediada por células, pelas reações inflamatórias, além de estimular, também, a produção de anticorpos da classe IgG2a. Células T “helper” tipo 2 (Th2) produzem interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13), e mediam a imunidade humoral e as reações alérgicas. A IL-4 está relacionada com a produção de anticorpos da classe IgE, IgG1 e IgG4; e a IL-5 é importante para diferenciação, multiplicação e ativação de eosinófilos (MOSMANN et al., 1986). Camundongos BALB/c, geneticamente susceptíveis à infecção com *L. major* possuem alta expressão de RNA mensageiro para IL-4 nas células dos linfonodos que drenam a lesão. Em contraste, camundongos C57BL/6, geneticamente resistentes à infecção por *L. major*, expressam RNA mensageiro para IFN- γ e não para IL-4. (HEINZEL et al., 1991) .

Por ser um parasita intracelular, a resposta imune celular é considerada a mais importante tanto na resistência quanto na suscetibilidade à infecção por leishmânias (SACKS, NOBENTRAUTH, 2002). Uma citocina importante na resposta imune à leishmânia é o IFN- γ , produzida principalmente por células T CD4+ do tipo Th1, e por células NK, estimuladas por IL-12. Em camundongos resistentes, células TCD4+ do tipo Th1 produzem IFN- γ , o que ativa óxido nítrico sintetase (NOS), levando ao estímulo da ação microbicida mediada pelo óxido nítrico (NO). A liberação de NO leva à morte do parasita em macrófagos humanos, que podem também ser estimulado pela ação de quimiocinas como MCP-1 e MCP-1 α (BOGDAN et al, 2000; BRANDONÍSIO et al, 2002).

A interleucina-12 (IL-12) tem sido apontada como um dos mais importantes componentes da fase inicial da infecção pela leishmânia. É produzida primariamente por células apresentadoras de antígeno (monócitos, macrófagos, células dendríticas e células B) e sua principal atividade biológica é sobre células T e células NK, nas quais ela estimula a produção de citocinas, principalmente IFN- γ , proliferação celular e citotoxicidade (TRINCHIERI et al, 1996). Também desempenha um papel importante na diferenciação e expansão de células T CD4⁺ do tipo Th1 e é importante para o padrão de resistência do camundongo (SCHARTON-KERSTEN et al, 1995)

A susceptibilidade do hospedeiro a infecções por leishmânias está correlacionada com altos níveis de anticorpos e a resposta mediada por células, T CD4⁺ do tipo Th2 produzindo principalmente IL-4 (ABRANCHES et al., 1991; MURRAY, 1998; PINELLE et al., 1994; SACKS, NOBEN-TRAUTH, 2002). Na LV humana e murina, a ativação de células Th2 pode estar envolvida na progressão da doença (ATTA et al., 1998; ROGERS et al., 2002).

No modelo de LV, a resistência envolve tanto células T CD4⁺ quanto T CD8⁺ e IL-2, IFN- γ e IL-12, esta última num mecanismo independente de IFN- γ e ligada à produção de TGF β (SACKS, NOBEN-TRAUTH, 2002).

A resposta imune em cães parece seguir, em parte, o que ocorre no modelo de camundongo susceptível. Observam-se altos níveis de IL-2 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em sobrenadante de células de cães assintomáticos, comparado com os sintomáticos, sugerindo um papel dessas citocinas na resistência à *Leishmania infantum*. Os animais sintomáticos apresentam redução no número de linfócitos T e de linfócitos B (PINELLI, 1994). A redução no número de linfócitos T também foi correlacionada com a maior probabilidade destes animais infectarem o vetor (GUARGA et al., 2000).

A leishmaniose visceral canina (LVC) induz supressão de células T, ativação policlonal de células B com formação de anticorpos específicos e inespecíficos, culminando com altos níveis de anticorpos anti-*Leishmania*, presença de auto-anticorpos, quadro de hiperglobulinemia e complexos imunes circulantes que podem ficar ligados ou adsorvidos às hemácias e conseqüentemente contribuir para a menor sobrevivência das hemácias e a anemia observada na LV (BACELAR; CARVALHO, 2005). Atualmente tem sido demonstrada a participação de linfócitos B como fator de susceptibilidade a infecção (KIMA et al., 2000).

Quando não tratada a LV pode ser fatal, uma vez que o hospedeiro pode não apresentar uma resposta protetora eficiente contra o parasita (GONTIJO, MELO, 2004). No hospedeiro mamífero, a resposta imune pode levar à cura espontânea ou a progressão da doença (GRIMALDI JR, TESH, 1993; RIVAS et al., 2004). O aparecimento dos sintomas vai depender da imunocompetência do animal (MAGILL et al., 1993). A imunossupressão é uma consequência em parte da diminuição de células T CD4⁺. O grande número de parasitos observados nos órgãos do sistema mononuclear fagocitário pode ser uma consequência das alterações imunológicas, permitindo a multiplicação e dispersão do parasito para outros sítios, incluindo estômago, intestino e pulmão (SILVA, 2007).

Do exposto, observa-se que as células T são fundamentais no controle da infecção. Para evitar lesões teciduais durante a infecção por patógenos persistentes, o sistema imune desenvolve mecanismos regulatórios (JI et al, 2005; CAVASSANI, et al., 2006).

1.5.1 Células T reguladoras

Células T reguladoras (Treg) são um subgrupo de células T CD4⁺ com função supressora. Os primeiros estudos sobre estas células foram realizadas no início dos anos 70 (GERSHON, KONDO, 1970), contudo, a denominação de células T reg surgiu no final dos anos 90, em substituição ao termo células T supressoras (SHEVACH et al.,1998; NAGLER et al, 2004). Essas células se diferenciam no timo e são encontradas em órgãos linfóides secundários (TAAMS, 2002) e representam 5-10% do total de linfócitos TCD4⁺ periféricos de humanos e camundongos, onde atuam tanto no controle da resposta imune inata quanto adquirida (ITOH, 1999; SHEVACH, 2002). Têm sido descritas como as únicas células capazes de prevenir doenças auto-imunes suprimindo a ativação e expansão de reações próprias dos linfócitos. Também têm sido definidas por sua capacidade de controlar o efeito de respostas imunes excessivas ou mal orientadas contra outros agentes patogênicos (MENDEZ et al,2004).

As células T reg podem apresentar os subgrupos T reguladoras tipo 1 (Tr1) e Th3, que são induzidas pelo antígeno a secretar IL-10 e TGF- β , respectivamente, e o subgrupo T CD4⁺ CD25⁺, que além da elevada expressão de CD25⁺, também expressam CTLA-4 (antígeno 4 intracelular de linfócitos T citotóxico), GITR (receptor de glicocorticóide induzido por TNF) e Foxp3 (forkhead box p3) (READ, et al, 2000; RONCAROLO, et al,2001; WEINER, 2001; LEVINGS, et al, 2002; SHIMIZU, et al, 2002, FONTENOT et al., 2003; KEMPER, et al, 2003).

As células TCD4⁺CD25⁺ exercem seus efeitos supressores por meio do contato célula célula (SHEVACH, 2002; SAKAGUCHI, 2004). Também são capazes de suprimir respostas de células T CD4⁺, T CD8⁺, NK, células dendríticas (RUDENSKY, 2006) e linfócitos B (D'AMBROSIO, 2006).

O Foxp3 é um gene que codifica um fator de transcrição e que ocorre naturalmente em células T reg sendo específico deste tipo de célula e fundamental para seu desenvolvimento e função efetora (SAKAGUCHI, 2004), sendo considerado o marcador mais específico das células T reg (FONTENOT, 2003).

Alguns trabalhos realizados com *L. major* têm demonstrado que a presença de IL-10 secretadas por células T reg foram responsáveis pela persistência da infecção em camundongos

C57BL/6, mesmo após cura clínica (BELKAID et al., 2002). Além disso, células T reg, também, foram mostradas suprimindo a diferenciação Th1 e Th2 no início da infecção por *L. major* e causando doença após infecção, por meio da secreção de vários fatores, incluindo IL-10 (LIU et al, 2003). Contudo, outros trabalhos realizados com *L. major* (ASEFFA et al., 2002) e com *L. amazonensis* (JI et al., 2005) em camundongos C57BL/6, demonstraram que as células T reg atuam protegendo contra a infecção por estes parasitas.

Estudos realizados com *L. infantum* detectaram produção de IL-10 por células T CD4⁺CD25⁻FOXP3⁻ induzidas por esses parasitos, sugerindo que diferentes células T reg se desenvolvem em resposta a *L. infantum* e podem desempenhar um possível papel na promoção da persistência do parasito e estabelecimento da infecção (RODRIGUES, 2009).

Experimentos usando Foxp3 em camundongos C57BL/6 infectados com *L. major*, mostraram que as células CD4⁺CD25⁻FOXP3⁻ foram responsáveis pela susceptibilidade mediada por IL-10 (ANDERSON et al ,2007). Portanto, o papel das células T reg na susceptibilidade de infecções causadas por *L. major* ainda não está resolvido (NAGASE, 2007).

Desse modo, o estudo de células T reg e sua relação com as manifestações clínicas e resposta do baço em cães naturalmente infectados pela *Leishmania (L.) chagasi*, pode evidenciar aspectos de susceptibilidade em diferentes intensidades da infecção leishmaniótica. O estudo poderá contribuir, ainda, para caracterizar melhor o quadro clínico, a identificação de animais doentes em áreas endêmicas e definir melhor o papel do cão na cadeia epidemiológica da enfermidade.

Esta dissertação apresenta a seguinte estrutura formal: resumo, abstract seguido de uma introdução englobando revisão de literatura e objetivos; um capítulo contendo artigo completo, intitulado “**Células T reguladoras (T reg) no baço de cães com diferentes manifestações clínicas de leishmaniose visceral**” a ser encaminhado para publicação na revista Veterinary Immunology and Immunopatology, estruturados de acordo com as normas da revista e referências bibliográficas da introdução geral.

2.O CAPÍTULO I

CÉLULAS T REGULADORAS (T REG) NO BAÇO DE CÃES COM DIFERENTES MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DE LEISHMANIOSE VISCERAL

SIMONE MOUSINHO FREIRE¹, JOSÉ ÂNGELO LAULETTA LINDOSO², HIRO GOTO², NILTON ANDRADE MAGALHÃES¹, CAMILA FAZANNI², FRANCISCO ASSIS LIMA COSTA³.

1. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí
2. Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo
3. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Campus da Socopo – 64049-550, Teresina-Piauí-Brasil, fassisle@gmail.com

ABSTRACT

During infection by VL TCD4+Foxp3+ cells (T reg) act by inducing immunosuppression. In this study in the spleen of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* tried to observe the involvement of T reg cells in modulating the response against leishmania infection and correlate their presence with the intensity of clinical manifestations and organ. We used 39 animals of both sexes and ages unknown. The diagnosis of leishmaniasis was performed by serology (ELISA), parasitology (puncture of bone marrow and imprint of spleen). The animals were divided into four groups: Infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* and asymptomatic, oligosymptomatic, polysymptomatic and control group (uninfected). We collected blood and fragments of spleen. Organ imprints were prepared on slides for cytological analysis, then samples were fixed in 10% formalin for histological and morphometric, and RPMI 1640 for performing flow cytometry. The most frequent clinical findings were skin lesions (76.9%) and lymphadenopathy (65.38%). Histopathologic analysis revealed changes in the spleen as inflammatory neutrophil infiltration in the capsule granuloma, hyperplasia of follicles and depletion of T cells. Follicle hyperplasia was more frequent in the group of animals compared with asymptomatic and mildly symptomatic polysymptomatic ($P = 0.000117$). Hypercellularity was higher for asymptomatic compared to other groups ($P = 0.0000145$). In polysymptomatic, there was a greater depletion of periarteriolar sheath cells with the intensity ranging from normal to moderate ($P = 0.000191$). Hyperplasia of T cells was higher in asymptomatic ($P = 0.00000103$). Granuloma of medium intensity was observed in greater quantity in the group of asymptomatic animals ($P = 0.000580$). In this study, TCD4 + cells were stained using antibody anti-canine CD4+ (clone YKIX302.9) and Foxp3, antibody anti-mouse (clone FJK-16s) and analyzed by flow cytometry. The quantification of TCD4 + and TCD4 + Foxp3 +, showed no significant difference between groups of dogs examined, however, there was a tendency numerically

higher TCD4 + cells in control animals, compared to infected and cells TCD4 + CD25 + Foxp3 + in animal polysymptomatic. The results show that the clinical manifestations of canine visceral leishmaniasis in progressing with the intensity of the changes in the spleen, as well as the amount of T reg cells tend to be higher in animal with much clinical manifestations. In animals oligosymptomatics there are low number of T reg cells.

Keywords: visceral leishmaniasis, dog, cells T reg, spleen

2.1 INTRODUÇÃO

Células T reguladoras (T reg) constituem uma linhagem distinta de linfócitos T que compõem de 5-10% de todas as células TCD4⁺ em roedores, gatos e seres humanos (Itoh et al., 1999; Shevach, 2002; Vahlenkamp et al., 2004). Estas células atuam no controle da resposta imune, suprimindo a função efetora de linfócitos (Sojka et al, 2008; Vignali et al, 2008; Tang e Bluestone, 2008) e expressam em sua superfície a molécula CD25+, a subunidade alfa do receptor de interleucina-2 (IL-2R) antes da ativação (Sakaguchi et al., 1995), o CTLA-4 (antígeno 4 intracelular de linfócitos T citotóxico), GITR (receptor de glicocorticóide induzido por TNF) (READ, et al, 2000; RONCAROLO, et al, 2001; WEINER, 2001; LEVINGS, et al, 2002; SHIMIZU, et al, 2002 ; KEMPER, et al, 2003) e o fator regulador transcricional (Foxp3) que é necessário para seu desenvolvimento e função (Brunkow et al., 2001; Hori et al., 2002; Fontenot et al, 2003; Khattri et al, 2003).

Existem vários tipos de células T reg; algumas são chamadas de induzidas, por agirem em resposta a agentes infecciosos e outras são consideradas naturalmente reguladoras (Bluestone e Abbas, 2003). As células T reg induzidas, tais como células Tr1 ou Th3, podem desenvolver-se a partir de células T CD4⁺ que são expostas a condições específicas de estimulação (Mills e McGuirk, 2004; O'Garra et al, 2004). As células T reg naturais, no entanto, surgem durante o processo normal de maturação no timo e expressam um conjunto de marcadores da superfície celular, dentre eles, o mais específico é o Foxp3 (Fontenot e Rudensky, 2005).

Apesar das diferenças funcionais e fenotípicas entre subgrupos T reg, a população como um todo tem um papel crítico na prevenção de doença auto-imune e manutenção da tolerância periférica (Biller, 2007). Inicialmente foi descrito para estas células o papel de impedir respostas auto-imune (Kim et al 2007; Sakaguchi et al, 2008), mas, posteriormente foi observado que as mesmas podem, também, regular respostas auto imune contra agentes infecciosos (Mills, 2004; Rouse e Suvas, 2004; Belkaid e Tarbell, 2009) e, ainda, limitar as

respostas efetoras que resultam na incapacidade de controlar adequadamente a infecção (Belkaid e Rouse, 2005).

Patógenos persistentes, como as leishmânias estabelecem infecções crônicas com a participação de células T reg $CD4^+CD25^+$ (Belkaid et al., 2002; McKee e Pearce 2004; Campanelli et al., 2006; Vigario et al., 2007) que, por sua vez, atuam induzindo a imunossupressão durante este tipo de infecção (Rodrigues et al, 2009). Em modelos experimentais de leishmaniose tegumentar, células Treg tem sido associadas à sobrevivência do parasita e reativação da doença (Belkaid et al., 2002). Infecção experimental com *Leishmania infantum* em camundongos indicam que células T reg se acumulam no baço (Rodrigues et al, 2009). A resistência a infecção está associada à expansão de um subgrupo de células T $CD4^+$ expressando o fenótipo Th1, produzindo IL-2 e IFN- γ . Em contraste a susceptibilidade à infecção é associada com a expressão de células T $CD4^+$ expressando o fenótipo Th2 produzindo IL-4 (Peters e Sacks, 2006).

Mais recentemente, as células Treg, também, foram identificadas em células mononucleares (PBMC) de sangue periférico de pacientes com leishmaniose cutânea infectados com *Leishmania braziliensis* (Salhi, 2008).

Estudos realizados em camundongos BALB/c com *L. infantum* detectaram produção de IL-10 por células T $CD4^+CD25^-FOXP3^-$ induzidas por esses parasitos, sugerindo que diferentes células T reg se desenvolvem em resposta a *L. infantum* e podem desempenhar um possível papel na promoção da persistência do parasito e estabelecimento da infecção (RODRIGUES, 2009).

Em cães as informações sobre células T reg na patogênese da leishmaniose visceral são ainda muito restritos, em parte devido à indisponibilidade de anticorpos adequados para a detecção desta população celular. Portanto, este trabalho propõe-se a avaliar em baço de cães a participação de células T reg na modulação da resposta frente à infecção por leishmânia e relacionar a sua presença com a intensidade das manifestações clínicas e alterações do órgão.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Animais.

Foram utilizados 39 cães adultos, machos e fêmeas de diferentes idades e raças, provenientes de clínicas particulares e da Gerência de Zoonoses – GEZOON-PI, incluindo

animais de proprietários e animais de rua da área endêmica, para leishmaniose visceral, de Teresina no estado do Piauí.

2.2.2 Exame clínico

Os animais foram submetidos a uma rigorosa avaliação clínica quanto aos seguintes aspectos: massa corporal, pelagem (brilho, ferimentos, presença de parasitos ou microorganismos), dimensão dos linfonodos da cadeia superficial, frequência cardíaca e respiratória, grau de hidratação etc. (Apêndice 1). Após análise dos seguintes parâmetros fisiológicos (temperatura retal, frequência cardíaca, frequência respiratória), os animais foram submetidos à eutanásia sob anestesia geral.

2.2.3 Diagnóstico de leishmaniose visceral

O diagnóstico de leishmaniose visceral foi realizado por meio de teste sorológico (ELISA) e detecção do parasita em esfregaço de medula óssea esternal ou imprint de baço corado por Giemsa.

2.2.4 Classificação clínica dos animais

Os animais foram divididos em quatro grupos: 1) Animais negativos, sem sintomatologia e sorologia e parasitológico negativos 2) Animais assintomáticos, com sorologia e parasitológico positivo, sem manifestações clínicas, 3) Animais oligossintomáticos com sorologia e parasitológico positivo e até três manifestações clínicas da doença e 4) Animais polissintomáticos com sorologia e parasitológico positivo e quatro ou mais manifestações clínicas da doença.

Posteriormente ao exame clínico, os animais foram tranquilizados com acepromazina 0,5 mg/Kg (1 %) e cloridrato de meperidina 4 mg/Kg (50 mg/mL) por via intramuscular. Após 10 minutos, utilizou-se uma associação anestésica de ketamina (15mg/Kg), diazepam (1mg/Kg) e xilazina (0,5 mg/Kg) por via endovenosa. Após 3 minutos foi injetado cloreto de potássio a 10% (1mL/Kg) por via endovenosa. O óbito foi confirmado pela ausência de batimentos cardíacos.

2.2.5 Aspectos éticos.

O método de eutanásia está de acordo com artigo 3 da declaração universal dos direitos dos animais e a resolução n° 714, de 20 de junho de 2002, em concordância com as

orientações do Conselho Federal de Medicina Veterinária e o comitê de ética da Universidade federal do Piauí, conforme parecer nº 0072/10.

2.2.6 Obtenção de tecido e células.

2.2.6.1 Obtenção de tecido para análise histopatológica e de células para citometria de fluxo.

Imediatamente após a eutanásia foram colhidos fragmentos de baço da região média e central do órgão, com dimensões de 0,5 cm de espessura, 1 cm de comprimento e 1 cm de largura. Antes da fixação foi preparado imprint do órgão em lâminas para exame parasitológico. Após esse procedimento o tecido foi fixado em formol a 10% tamponado com fosfato 0,01M pH 7,4 (formol tamponado) para microscopia de luz convencional (MIKEL, 1994). Fragmentos de baço, também, foram colhidos em meio RPMI 1640 para obtenção de células para análise em citômetro de fluxo.

2.2.6.2 Análise citológica

Os *imprints* depois de fixados com metanol e corados com Giemsa (MIKEL, 1994), foram examinados em microscópio de luz para a identificação de amastigotas nos tecidos.

2.2.6.3 Análise histopatológica

Os tecidos fixados em formol tamponado foram processados por técnica de rotina, cortados a 5 µm e corados com Hematoxilina-Eosina (H-E) e Ácido Periódico de Schiff (PAS) (LUNA, 1968), para exame em microscópio de luz com o objetivo de classificar as lesões e detectar amastigotas.

2.2.6.5 Análise morfométrica

O estudo morfométrico das lâminas coradas por H-E e PAS foi realizado em sistema de análise de imagem computadorizada Leica Qwin D-1000, versão 4.1¹ do Setor de Patologia animal do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da UFPI. Foram capturados 20 campos aleatórios de fragmentos de baço. Os parâmetros utilizados na análise morfométrica

¹ Leica Qwin D-1000, versão 4.1: Cambridge, UK.

foram: número, diâmetro e área de folículos linfóides, a espessura da camada de células da bainha periarteriolar e quantidade de arteríolas, e a quantidade de corpúsculos de Russel.

2.2.7 Análise da expressão de células T CD4⁺ e FOXP3⁺ por citometria de fluxo.

2.2.7.1 Preparação de suspensão de células esplênicas

Fragmentos de baço foram removidos, homogeneizados em placa de petri e deixados por 10 minutos a 4°C para sedimentação de fragmentos tissulares. Em seguida, o sobrenadante transferido para um tubo de 15 mL e centrifugado a 300 g por 10 minutos a 4 ° C, sendo feita a lise das hemácias com cloreto de amônio a 0,1% em PBS frio por 2 minutos e imediatamente equilibrada a osmolaridade com PBS [10X]. Após três lavagens com RPMI 1640 a concentração celular foi acertada para 2 x 10⁶/ mL e ressuspensa em meio RPMI 1640 com 20% de DMSO com 50% de soro fetal bovino e posteriormente criopreservadas em nitrogênio líquido até o uso.

2.2.7.2 Descongelamento das células

Amostras selecionadas para realização de citometria de fluxo foram retiradas do nitrogênio líquido e deixadas em temperatura ambiente até o descongelamento. Em seguida foram transferidas para um tubo contendo 5 mL de RPMI completo (RPMI 1640+ 1% de L-glutamina, Hepes 10mM, 10 % de soro fetal). Após duas lavagens a 300 g por 10 min, as células foram ressuspensas em 1 mL de RPMI completo e acertada a concentração celular para 2 x 10⁶ células. Repetiu-se a lavagem e ressuspendeu-se as células em 100µL de DPBS para marcação de TCD4⁺ e Foxp3.

2.2.7.3 Detecção de células T CD4⁺ e Foxp3⁺ por citometria

Células esplênicas, na concentração de 2x 10⁶, foram imunomarcadas para expressão de células TCD4⁺, usando-se anticorpo anti-CD4⁺ canino conjugado com FITC (clone YKIX302.9; Serotec, Raleigh, NC) seguindo-se a recomendação do fabricante. Resumidamente, as células foram incubadas com 10 µL de anticorpo para 100 µL de células, por 30 minutos a 4 ° C. Após lavagens para remoção dos anticorpos não ligados, foi realizada fixação com solução de fixação por 30 minutos a 4°C. Após lavagem com solução de permeabilização [1X], foi realizada bloqueio das ligações inespecíficas com 100 µL da mesma solução, por 15 minutos a 4°C. Em seguida as células foram incubadas com 1µg/10⁶ células do anticorpo Foxp3 anti-mouse/rato conjugado com ficoeritrina (clone FJK-16s,

eBioscience, San Diego, CA) por 30 minutos a 4°C. Após três lavagens com solução de permeabilização [1X], as células foram ressuspensas em DPBS e transferidas para tubo de 5 mL para leitura em citômetro de fluxo (BD, USA) .

2.2.7.4 Citometria de fluxo

Para realização da citometria de fluxo foram utilizadas suspensão de células esplênicas de 20 animais. Os dados das amostras foram adquiridas utilizando-se citômetro de fluxo FACSCalibur do Laboratório de Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), usando o programa CellQuest, de acordo com parâmetros de tamanho (FSC- Foward Scatter), granulosidade (SSC- Side Scatter) e intensidade de fluorescência dos anticorpos marcados com ficoeritrina (PE) e isotiocianato de fluoresceína(FITC). Foram adquiridos 10.000 eventos por cada amostra. A análise dos dados obtidos foi realizada utilizando-se o programa Summit V3.3.

2.2.8 Análise estatística

Os resultados dos exames histopatológicos e de morfometria foram analisados de forma quantitativa e semi-quantitativa, neste caso, mensurando-se a localização, distribuição e intensidade da lesão, numa escala de 0 a 4⁺ onde 0 = normal, 1 = mínima ou duvidosa; 1⁺ = média; 2⁺ = moderada; 3⁺ = moderadamente severa; 4⁺ = severa. Nas análises dos dados comparativos utilizaram-se fundamentalmente testes estatísticos não paramétricos pela natureza dos dados (Kruskal-Wallis e método Dunn) utilizando-se o programa Sigma Stat.

Para análise dos dados de citometria foi utilizado o programa Sigma Stat, pelo método ANOVA não paramétrico Kruska-Wallis.

2.3 Resultados

Os 32 animais naturalmente infectados apresentavam anticorpos anti-*Leishmania* pelo teste de ELISA. Na maioria dos animais foi difícil visualizar amastigotas em esfregaço de medula óssea do esterno e baço e no exame histopatológico do baço.

Nos animais infectados, os sinais clínicos mais frequentes foram: lesões de pele (76,9%) (Figura 2), linfadenopatia (65,38%); onicogribose (57,69%) (Figura 3); emagrecimento (50%) (Figura 4); conjuntivite (38,46%); apatia (26,9%); mucosas pálidas (19,23%); diarreia (3,84%) e febre (3,84%) (Figura 1).

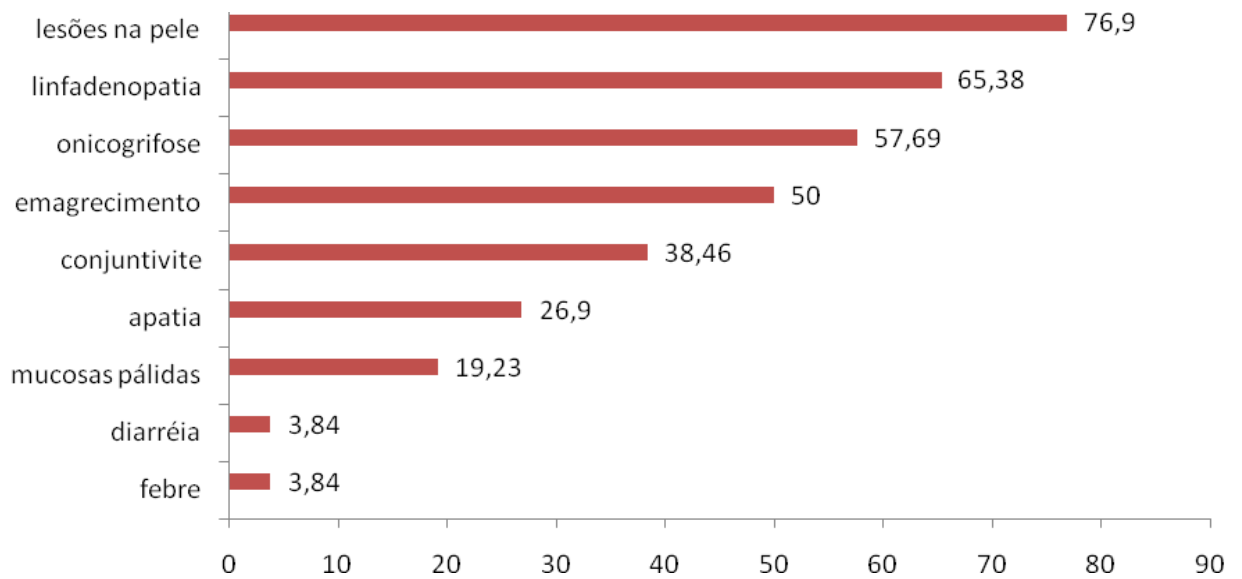


Figura 1. Ocorrência de sinais clínicos de leishmaniose visceral no grupo de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*.

A análise histopatológica do baço revelou alterações caracterizadas por infiltrado inflamatório neutrofílico na cápsula de intensidade mínima (Figura 5), presença de granuloma, hiperplasia de folículos e depleção de células T, que se acentuavam de acordo com a progressão das manifestações clínicas da doença. Outras lesões se manifestavam inicialmente, por congestão e hiperplasia da polpa vermelha, com presença de linfócitos, macrófagos e neutrófilos.

Na polpa branca observou-se que hiperplasia de folículos era mais evidente no grupo de animais assintomáticos comparado aos oligossintomáticos e polissintomáticos ($P = 0.000117$, teste de Kruskal Wallis e Dunn) (Figura 6).



Figura 2. Lesão de pele. Cão labrador naturalmente infectado por *Leishmania (L.) chagasi*.



Figura 3. Onicogribose. Cão SRD naturalmente infectado por *Leishmania (L.) chagasi*.



Figura 4. Emagrecimento. Cão SRD naturalmente infectado por *Leishmania (L.) chagasi*.

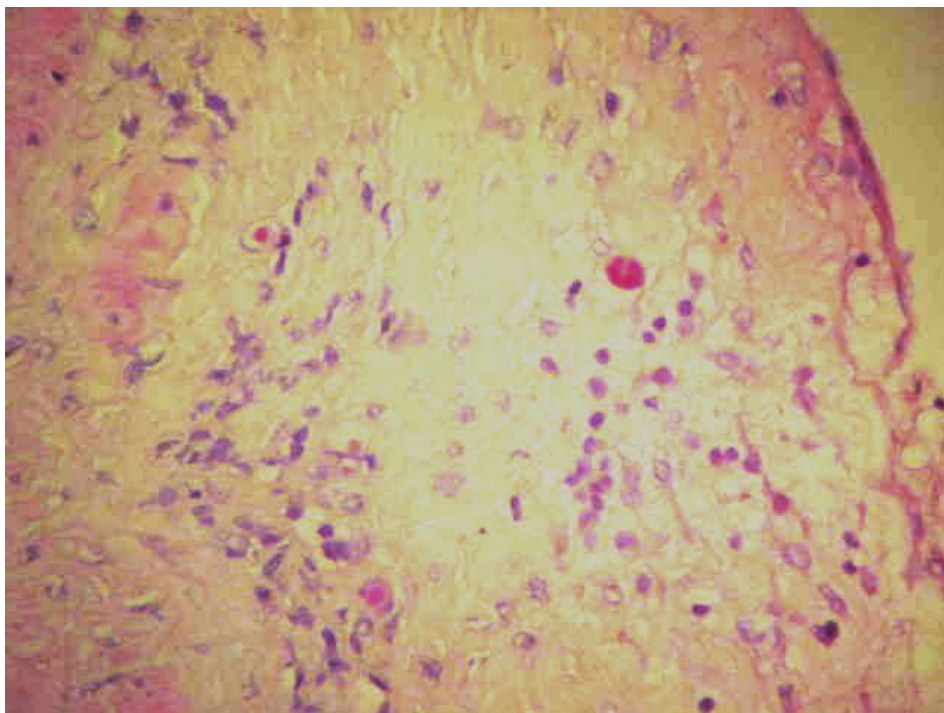


Figura 5. Baço de cão naturalmente infectado por *Leishmania (L.) chagasi*. Infiltrado inflamatório da cápsula. Coloração: H-E. Aumento: 40x.

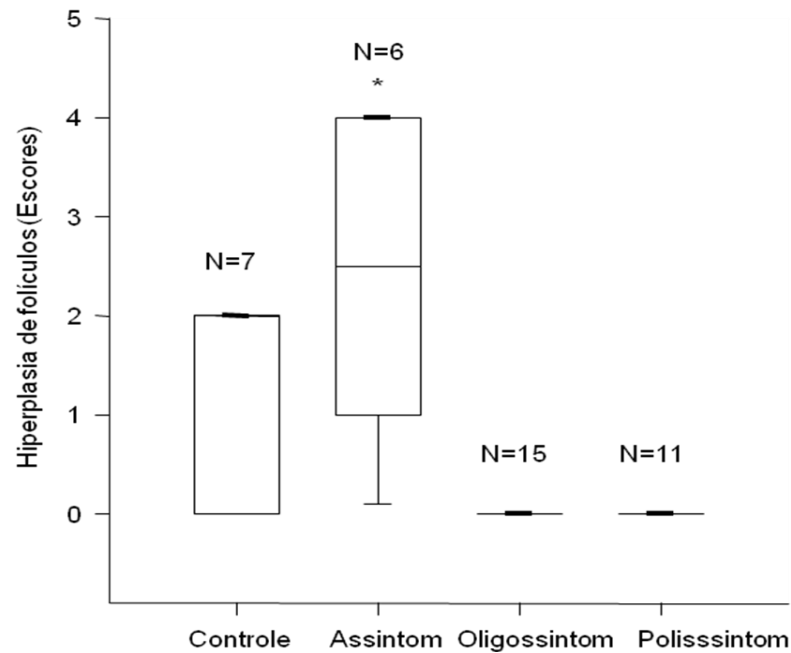


Figura 6. Análise semi-quantitativa da intensidade de hiperplasia de folículos no baço de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L) chagasi* e cães controle não infectados. N= número de animais por grupo. * P = 0.000117. Teste Kruskal-Wallis e método Dunn.

Analisando a hiperplasia no baço dos animais infectados, observou-se maior evidência nos assintomáticos comparado aos controles e polissintomáticos e entre animais oligossintomáticos e polissintomáticos ($P = 0.0000145$, teste de Kruskal Wallis e Dunn) (Figura 7). No grupo de animais polissintomáticos, observou-se depleção de células da bainha periarteriolar em intensidade maior do que nos demais grupos ($P = 0.000191$) (Figura 8 e 9). Por sua vez, hiperplasia de células T foi mais evidente no grupo de animais assintomáticos ($P = 0.00000103$, teste de Kruskal Wallis e Dunn) (Figura 10).

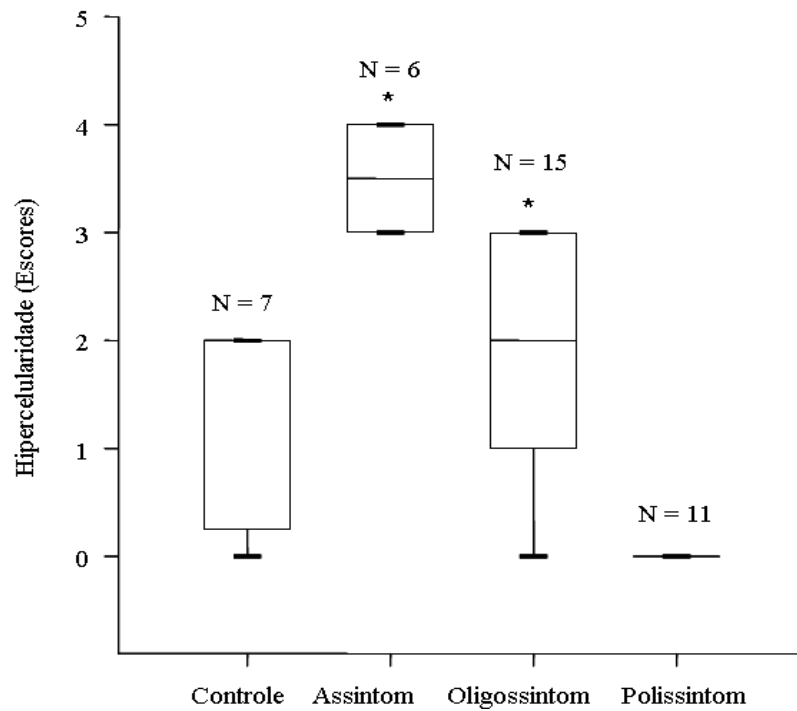


Figura 7. Análise semi-quantitativa de intensidade da hiper celularidade no baço de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L) chagasi* e cães controle não infectados. N= número de animais. * P = 0.0000145. Teste Kruskal-Wallis e método Dunn.

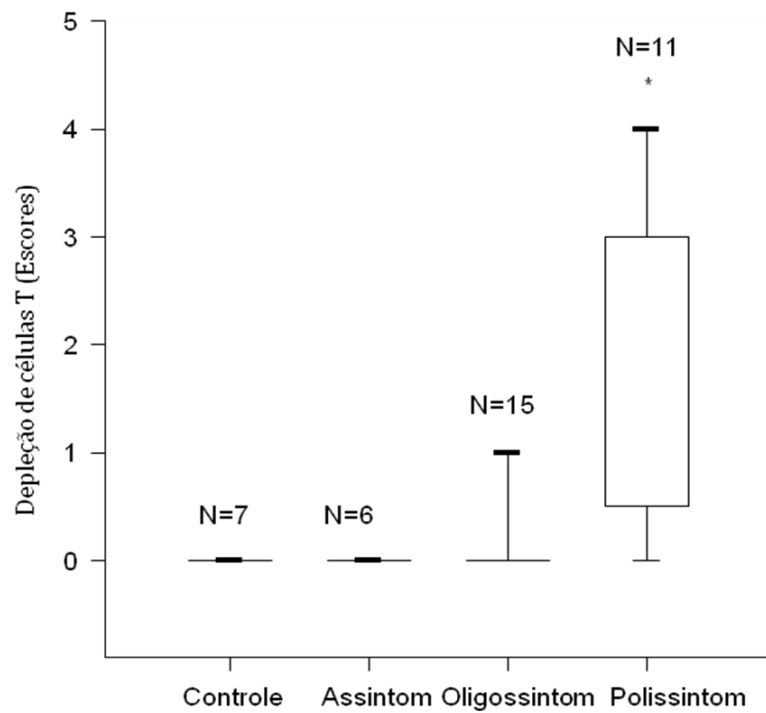


Figura 8. Análise semi-quantitativa de intensidade de depleção de células T no baço de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L) chagasi* e cães controle não infectados. N= número de animais. * P = 0.000191. Teste Kruskal-Wallis e método Dunn.

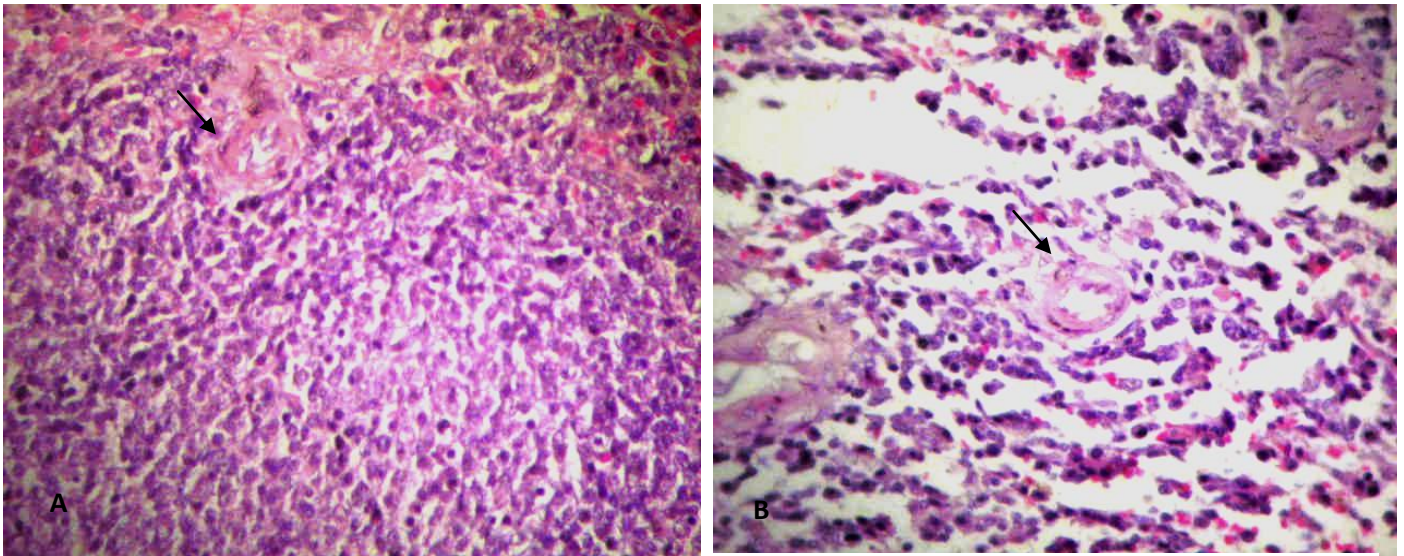


Figura 9. Baço de cão naturalmente infectado por *Leishmania (L) chagasi*. (A) Bainha periarteriolar normal. (B) Depleção de células da bainha periarteriolar. Coloração: H-E. Aumento: 40x.

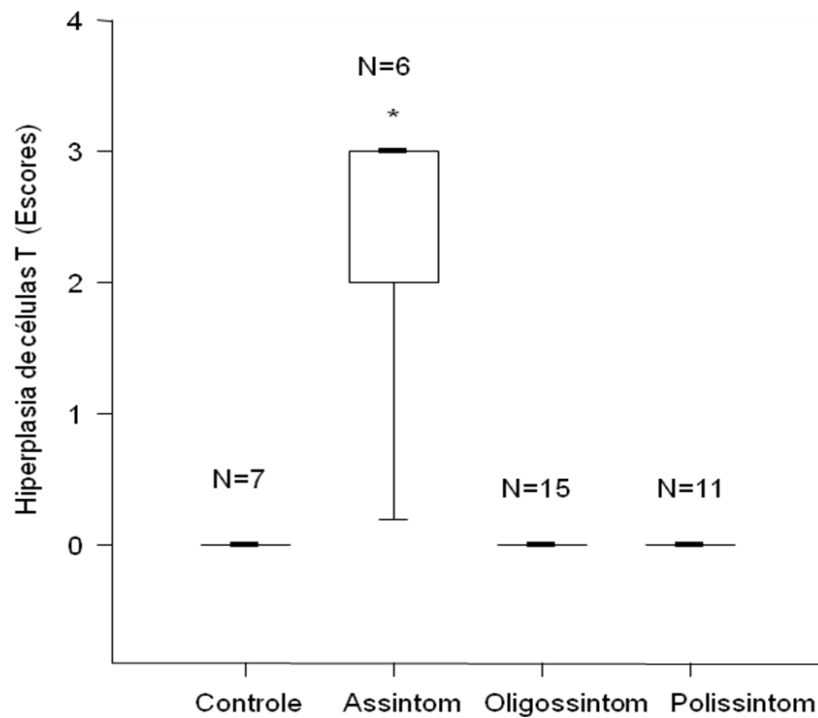


Figura 10. Análise semi-quantitativa de intensidade de hiperplasia de células T no baço de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L) chagasi* e cães controle não infectados. N= número de animais. * P = 0.00000103. Teste Kruskal-Wallis e método Dunn.

Granuloma de intensidade média foi observado no grupo de animais assintomáticos, havendo diferença em relação aos demais grupos ($P = 0.000580$, teste de Kruskal Wallis e Dunn) (Figura 11). Congestão da polpa vermelha foi bastante freqüente e a intensidade, em muitos casos, era moderadamente severa. Apesar da evidência destas alterações serem numericamente mais expressivas nos animais com manifestações clínicas da doença do que nos animais controles, não havia diferença significativa entre esses dois grupos ($P = 0.750$, teste de Kruskal Wallis e Dunn) (Figura 12). Constatou-se, ainda, a presença de megacariócitos, que era maior nos assintomáticos e controles, em relação aos polissintomáticos e oligossintomáticos ($P = 0.0000202$, teste de Kruskal Wallis e Dunn).

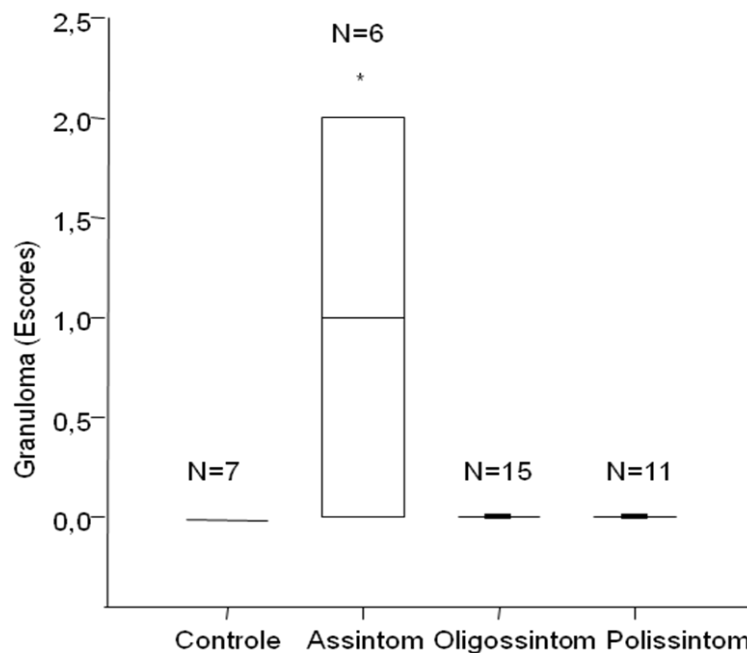


Figura 11. Análise semi-quantitativa de intensidade de granuloma no baço de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L) chagasi* e cães controle não infectados. N= número de animais. * $P = 0.000580$. Teste Kruskal-Wallis e

Na análise morfométrica o número de folículos era semelhante entre os grupos de animais ($P = 0.346$, teste de Kruskal Wallis), mas constatou-se que havia uma tendência numericamente superior nos animais oligossintomáticos. O mesmo foi observado para o diâmetro folicular ($P = 0.555$, teste de Kruskal Wallis) e área folicular ($P = 0.788$, teste de Kruskal Wallis), mas numericamente esses valores eram superiores nos animais assintomáticos (Apêndice 2 e 3).

A coloração com Ácido Periódico de Schiff (PAS) revelou a presença de células do folículo linfóide com grânulos protéicos arredondados e eosinofílicos (corpúsculo de Russel) (MAJNO & JORIS, 1996). A presença dos mesmos era numericamente maior nos animais polissintomáticos e oligossintomáticos, não havendo, contudo, diferença significativa entre os grupos ($P = 0.898$, teste de Kruskal Wallis) (Figura 13).

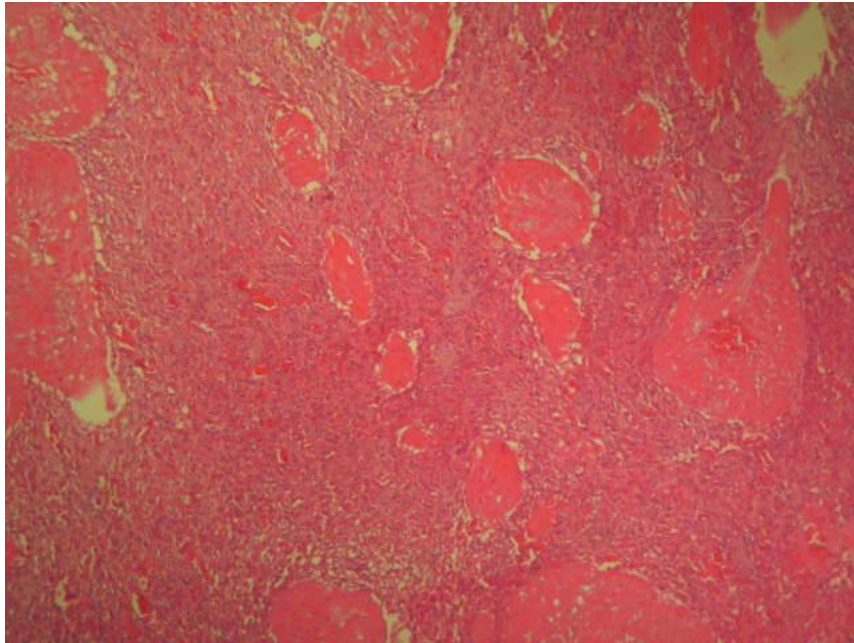


Figura 12. Baço de cão naturalmente infectado por *Leishmania (L) chagasi*. Congestão. Coloração: H-E. Aumento: 10x.

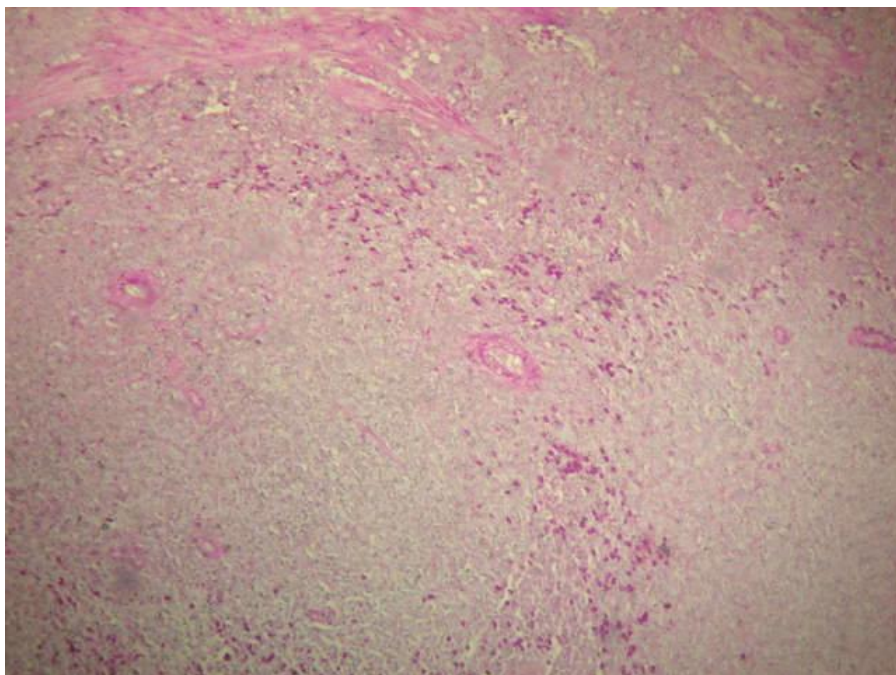


Figura 13. Baço de cão naturalmente infectado por *Leishmania (L) chagasi*. Corpúsculos de Russel. Coloração: PAS. Aumento: 10x.

O resultado da resposta de células TCD4⁺, por citometria de fluxo, revelou que havia uma tendência numericamente maior de células nos animais controles, do que nos animais infectados, ainda que não houvesse diferença significativa entre os grupos (P = 0.202, teste de Kruskal Wallis) (Figura 14). Entre os animais infectados observou-se que essa tendência era maior nos animais oligossintomáticos. A análise das células TCD4⁺Foxp3⁺ também não mostrou diferença significativa entre os grupos (P=0.322, teste de Kruskal Wallis), contudo, observou-se uma tendência numericamente maior destas células nos animais polissintomáticos, vindo a seguir os animais controles, assintomáticos e oligossintomáticos (Figuras 15 e 16).

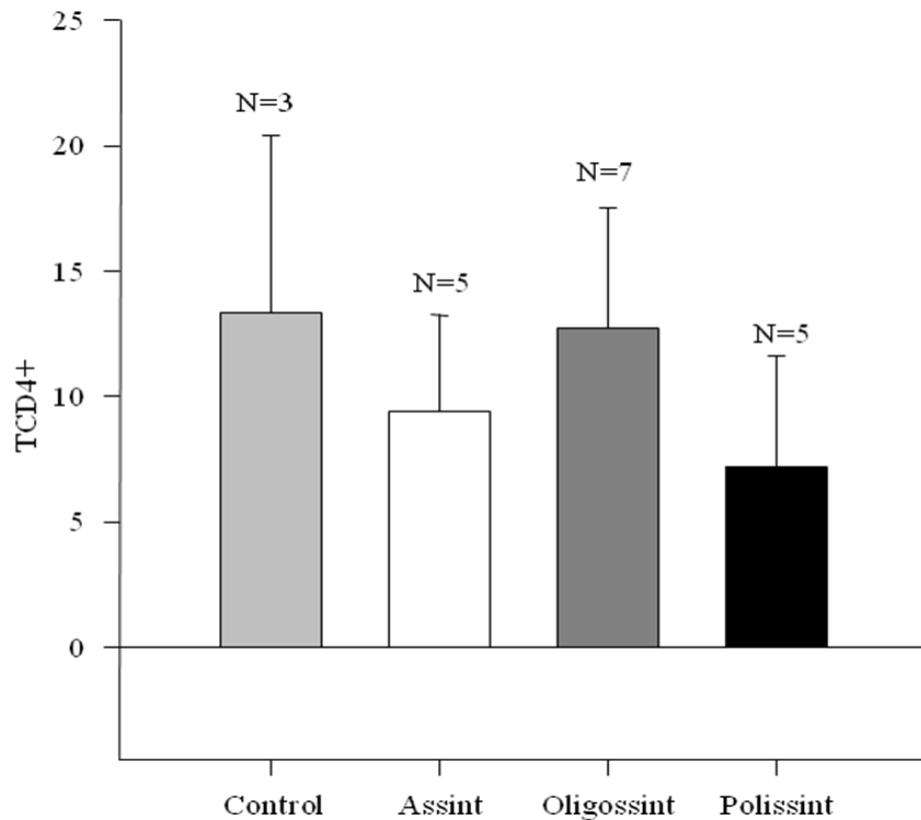


Figura 14. Análise quantitativa de células TCD4⁺ no baço de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L) chagasi* e cães controle não infectados. N= número de animais. P = 0.202. Teste Kruskal-Wallis.

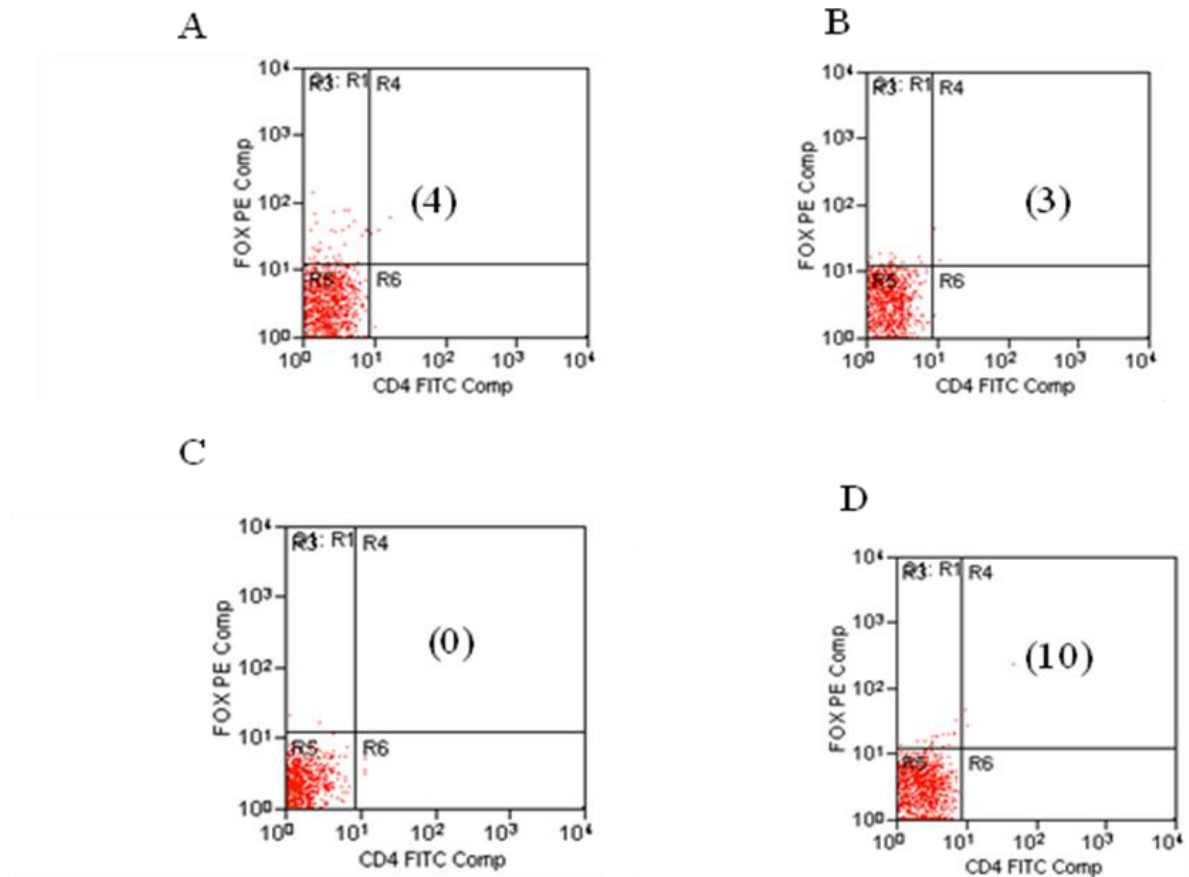


Figura 15. Células TCD4⁺Foxp3⁺ em animais (A) controle, (B) assintomático, (C) oligossintomático e (D) polissintomático. Estão representados os Gates analisados e os dados em parênteses representam o número absoluto de células.

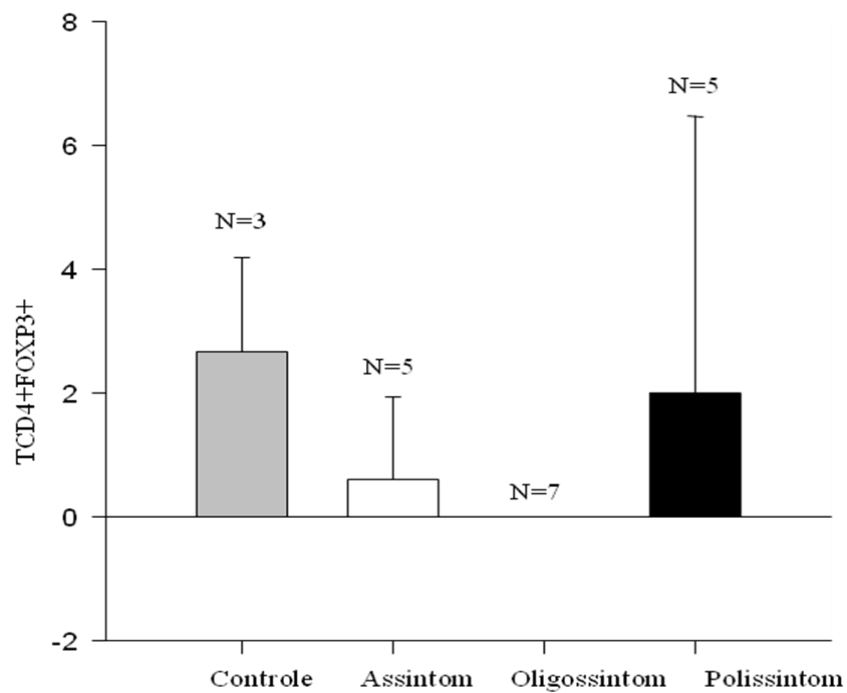


Figura 16. Análise quantitativa de células TCD4⁺Foxp3⁺ no baço de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L) chagasi* e cães controle não infectados. N= número de animais. P = 0.322. Teste Kruskal-Wallis.

2.4 Discussão

Os estudos realizados sobre leishmanioses, em grande parte, são direcionados para o entendimento dos processos imunológicos que envolvem a resposta específica e inespecífica em modelos murinos. A avaliação dos fatores relacionados à progressão da doença no cão naturalmente infectado por *Leishmania (Leishmania) chagasi* abrange uma área que pode contribuir para melhor elucidação da patologia e imunopatogenia da LV, pois o cão é um excelente modelo natural de estudo da doença, visto que desenvolve a infecção em sua forma plena, semelhante ao que acontece com o homem e é o principal reservatório urbano da doença (Moreno,2002).

Os resultados deste estudo mostraram que os sinais clínicos mais frequentes nos 32 animais infectados foram lesões de pele e linfadenopatia. Estas manifestações parecem ser as mais importantes na LVC, pois, as mesmas já foram confirmadas em outros estudos realizados em outras regiões do Brasil e, mesmo, em outros países (Costa-Val et al., 2007; Ribeiro, 2007; Reis et al., 2006; Baneth, 2006; Alvar et al., 2004; Amusatequi et al., 2003). Desse modo, tendo em vista que o diagnóstico clínico da LVC em áreas endêmicas é difícil, uma vez que as manifestações se confundem com os de outras doenças (Gradoni, 2002; Bryden et al 2005), tais parâmetros clínicos podem possibilitar uma identificação precoce inicial a ser confirmada posteriormente por exames mais específicos. Vale ressaltar que, no presente estudo, o linfonodo poplíteo foi o mais afetado.

O ensaio metodológico empregado, com a análise de animais em diferentes fases de progressão da doença, permitiu observar que as manifestações clínicas da leishmaniose visceral canina progredem com a intensidade das alterações no baço, pois, foram analisados grupos de animais sem a doença, animais infectados sem manifestações clínicas, infectados com até três manifestações clínicas e infectados com mais de três manifestações clínicas.

Todos os animais infectados eram parasitologicamente positivos, muito embora a pesquisa de parasitas no baço tenha sido difícil pelas técnicas de citologia e histopatologia.

O baço quando afetado pela *Leishmania*, mantém-se parasitado durante todo o curso da LV, sendo, portanto, um órgão que pode fornecer informações importantes nas investigações sobre as alterações morfológicas e imunológicas decorrentes dessa doença (Carrion et al., 2006; Reis et al., 2009). Avaliando-se as lesões histopatológicas do baço observou-se que hiperplasia de folículos, depleção de células da bainha periarteriolar, hiperplasticidade da polpa vermelha e congestão, foram as alterações mais severas. Tais

alterações parecem ser as que ocorrem com maior frequência no baço, como observado em outros estudos (Tasca, 2009). No nosso estudo não foi observado depleção de folículos, o que difere de outros trabalhos (Reis et al., 2009; Santana et al., 2008). Considerando que os folículos linfóides constituem um dos locais de produção de células B, é compreensível que a hiperplasia de folículos nos animais assintomáticos deste estudo, esteja contribuindo para o controle da doença, desde que a proliferação de células B esteja levando a uma maior produção de IGg2 (Mosmann et al, 1986)

A hiperplasia de células T, encontrada nos animais assintomáticos e a depleção de células da bainha periarteriolar, encontrada nos animais polissintomáticos, parecem refletir a evolução clínica da doença, visto que vários estudos vêm demonstrando que resistência e susceptibilidade do cão à LV, está relacionada com a resposta imune celular (Scharton-Kersten et al, 1995).

Uma lesão muito frequentemente relatada em animais infectados é a presença de granuloma (Santana et al., 2008), que é específico para cada órgão (Murray, 2001), e parece não está associada ao controle da infecção (Lemos et al., 2000). Nos animais infectados deste estudo, granulomas foram encontrados em pequena quantidade, à semelhança do que foi observado em outros estudos (Lemos et al., 2000; Santana et al., 2008), contudo, aqui sugere haver alguma relação com o controle da infecção, uma vez que só foi encontrado em animais assintomáticos. Em outros trabalhos observou-se que granulomas parecem refletir a persistência da inflamação crônica em resposta ao descontrole da infecção, ao invés de proteção contra a doença. Os componentes celulares do granuloma, podem secretar interleucina 10 e outras citocinas que podem favorecer a sobrevivência da *Leishmania* (Wilson et al., 1996).

A análise de células T CD4+ tem sido motivo de vários estudos na LV, visto que essas células estão envolvidas na mediação imune da LV no cão (Shanchez, 2004). No final dos anos 90, um subgrupo de células TCD4+ foi caracterizado como células T reguladoras, anteriormente conhecidas como células T supressoras (Shevach et al., 1998; Nagler et al., 2004). Esses estudos possibilitaram verificar que células T reg contribuem para a indução de imunossupressão e, desse modo, para a manutenção da infecção (Rodrigues et al., 2009).

Em camundongos e no homem, células Treg podem ser identificadas baseadas na expressão de moléculas de superfície como a cadeia alfa do receptor de IL-2 (CD25), pela expressão do receptor de TNF induzido por glicocorticóide (GITR), CD103, proteína 4 associada a linfócito T citotóxico (CTLA-4) (Dieckmann ,et al 2001; Jonuleit, et al,2001) e, ainda, CD127 (Liu, et al, 2006). Mas, estudos recentes mostraram que a detecção intracelular

do fator de transcrição Foxp3 é inequivocamente característico de células T reg em roedores (Ramsdell, F., 2003). Contudo vários pesquisadores tem demonstrado a indução da expressão de Foxp3 em células TCD4+ ativadas que não possuem atividade supressora (Walker, et al, 2003; Allan, et al, 2005; Morgan, et al, 2005).

Em cão, tem sido sugerido que a expressão de Foxp3 ocorre predominantemente dentro da população de células T reg, portanto, permitindo o uso da expressão desse fator de transcrição como um marcador de células T reg (Biller et al, 2007).

A questão se Foxp3 é adequado para a identificação de células T reg é conflitante. Alguns estudos tem demonstrado que a expressão de Foxp3 é aumentada em células T não reguladoras (Walker, et al, 2003; Allan, et al, 2005; Morgan, et al, 2005). Por isso a avaliação de células Treg deve ser feita pela expressão de múltiplos marcadores de superfície associados a células Treg. Entretanto a ausência de reagentes para avaliar a expressão dessas moléculas no cão, atualmente impede a análise de células Treg utilizando múltiplos marcadores de superfície. Desse modo, a avaliação da expressão de Foxp3 constitui o melhor método disponível para identificar células Treg no cão (Biller et al, 2007).

Em face dos resultados, foi possível identificar, por citometria de fluxo, leucócitos no baço de todos os cães examinados expressando Foxp3, variando de poucas células, como observado nos cães oligossintomáticos, para um alta percentagem de células, como observado nos cães polissintomáticos. De acordo com estudos prévios (Bluestone; Abbas, 2003), esses resultados sugerem fortemente que essas células no baço são células Treg naturais.

A avaliação de células Treg em cães associadas a processos patológicos ainda é pouco conhecida (Biller et al., 2007; Kim et al, 2007; Keppel et al, 2008;). A quantificação de células TCD4+ e TCD4+Foxp3+, não revelou diferença significativa entre os grupos de cães examinados. Contudo observou-se uma tendência numérica da presença de maior número de células TCD4+ nos animais controles, do que nos animais assintomáticos e sintomáticos, o que difere dos resultados encontrados em trabalhos similares (Sanchez et al., 2004). Mas, esse resultado indica a importância de células TCD4+ na mediação imune de animais susceptíveis à LV (Pinelle et al.,1994), visto que haviam mais células nos animais sadios. Por outro lado, ao analisar apenas os animais infectados, observou-se uma tendência da presença de maior número de células TCD4+ nos animais sintomáticos comparados aos assintomáticos. Esses resultados se contrapõem a análise morfométrica da bainha periarteriolar, que revelou uma presença maior de células TCD4+ nos animais assintomáticos. Isto, possivelmente, possa ter sido influenciado pela colheita de material de baço e o seu processamento, como no preparo da suspensão de células, onde pode ter havido perda de células para análise por citometria de

fluxo, pois era visível a diferença na quantidade de pellet formado entre os animais. Mesmo que a concentração de células tenha sido acertada para 2×10^6 , em câmara de Newbauer, sempre há algum erro na contagem e, mesmo, em alguns animais não havia células suficientes para chegar a essa concentração. Nesse caso o cálculo de concentração era feito com o pellet total, o que pode ter influenciado nos resultados. Além disso, sabe-se que na modulação da resposta imune de cães com LV, ocorre uma resposta mista Th1/Th2 (Baneth et al., 2008). Assim, qualquer desequilíbrio nesse padrão dicotômico, que influencie a ativação celular e a expressão de citocinas, pode favorecer a progressão ou o controle da doença. Ainda podemos inferir que muitas células T CD4+ nos animais assintomáticos, poderiam não estar ativadas e, conseqüentemente, não estariam expressando marcadores de superfície capazes de serem reconhecidas na citometria de fluxo. Outra possibilidade é a de que os níveis maiores de células TCD4+ nos animais sintomáticos, visto na citometria de fluxo, seriam devido a uma maior ativação dessas células na tentativa do controle da infecção.

A resposta de células TCD4+Foxp3+ não apresentou diferença significativa entre os grupos de animais. Nos animais não infectados e infectados assintomáticos, essas células estavam presentes em baixa quantidade. Guardando as devidas proporções, estes resultados apresentam alguma similaridade com indivíduos saudáveis, nos quais células Treg representam somente 5-10% de células T CD4+ (Itoh et al., 1999; Shevach, 2002; Vahlenkamp et al., 2004). Mesmo sem qualquer controle de outras enfermidades que pudessem estar acometendo os animais, pois se tratavam de animais recolhidos pela Gerência de Zoonoses de Teresina para o controle da LVC e da raiva urbana, esses resultados mostram que células T reg participam dos eventos patológicos e imunológicos da LV, sendo a sua presença em pequena quantidade, compatível com a ausência ou com a presença de poucas manifestações clínicas de LV. Sabe-se que células T reg modulam a resposta imune Th1 e Th2 (Belkaid, et al, 2002) e, pelo menos, na leishmaniose tegumentar, células Foxp3 acumulam e suprimem a proliferação e produção de citocinas (Ji et al, 2005), contribuindo para a manutenção da infecção (Takahashi, et al. 2000). De modo similar, tem sido observado que em modelo murino de infecção por *Leishmania major*, células T reg natural favorecem a expansão e sobrevivência do parasito em linhagem geneticamente resistente. Essas células acumulam no local da infecção e controlam a expressão de células T efetoras.

Nos animais assintomáticos, não havia correlação entre a presença de células T pela análise histopatológica, e a expressão de células T reg, por citometria de fluxo; enquanto células T estavam presentes em maior quantidade, células T reg estavam presentes em menor quantidade. Este resultado é altamente sugestivo de uma eficiente resposta celular contra o

parasito, nesses animais, que envolve o recrutamento de células TCD4⁺ específicas (Sacks, Noben-Trauth, 2002). Já a comparação entre os animais com manifestações clínicas de LV, incluindo oligossintomáticos e polissintomáticos, revelou uma tendência numericamente maior de células TCD4⁺Foxp3⁺ do que nos animais sem manifestações clínicas, o que é compatível com a supressão da resposta imune determinada pela presença de células Foxp3⁺ (Rouse; Suvas, 2004). A comparação da resposta de células TCD4⁺Foxp3⁺ com a forma clínica da LVC revelou que os animais assintomáticos apresentavam um número menor de células do que os sintomáticos (oligossintomáticos e polissintomáticos), mas, era maior quando comparado apenas aos oligossintomáticos.

A caracterização clínica de cães com LV ainda não está bem estabelecida. Esta caracterização é feita basicamente pelo número de sinais clínicos que o animal apresenta (Pozio et al, 1981). Levando em conta os resultados obtidos, parece que células TCD4⁺Foxp3⁺ influencia a manifestação clínica da LVC; contudo a sua presença em menor quantidade nos animais oligossintomáticos, portanto, animais com até três sinais clínicos, do que nos assintomáticos, decorre de alguma razão por nós ainda desconhecida.

2.5 Conclusões

- Os sinais clínicos de LVC em área endêmica se confundem com os de outras enfermidades, mas os mais frequentes nos animais deste estudo foram lesões de pele, linfadenopatia, onicogribose e emagrecimento;
- Os animais sintomáticos manifestam um quadro de imunossupressão, caracterizado por depleção de células da bainha periarteriolar que aumentou com a progressão da doença;
- Granuloma no baço sugere estar relacionado com o controle da LV, pois foi encontrado apenas nos animais assintomáticos;
- Células TCD4⁺Foxp3⁺ (T reg) estão presentes no baço de cães;

- Células TCD4+ estão presentes no baço de animais com LV, em maior quantidade nos animais com manifestações clínicas do que sem manifestações clínicas;
- Células T reg influenciam as manifestações clínicas da leishmaniose visceral canina estando presente em menor quantidade nos animais assintomáticos do que nos sintomáticos;
- Nos animais oligossintomáticos ocorre baixos níveis de células Treg.

2.6 Referências Bibliográficas

Allan, S.E., Passerini, L., Bacchetta, R., Crellin, N., Dai, M., Orban, P.C., Ziegler, S.F., Roncarolo, M.G., Levings, M.K., 2005. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs. *J. Clin. Invest* 115, 3276–3284

Alvar, J., Cañavate, C., Molina R., Moreno, J., Nieto, J., 2004. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.*, 57, 1-88.

Amusatogui, I., Sainz, A., Rodriguez, F., Tesouro, M.A., 2003. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *Eur. J. Epidemiol.* 18, 147-156.

Baneth, G., 2006. Leishmaniasis. In: Greene, C.E. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3a ed. Canada: Saunders Elsevier, p.685-698.

Belkaid, Y., Piccirillo, C.A., Mendez, S., Shevach, E.M., Sacks, D.L., 2002. CD4+ CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature*. 420, 502–507.

Belkaid, Y., Rouse, B. T. 2005. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat. Immunol.* 6, 353– 360.

Belkaid, Y., Tarbell, K., 2009. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. *Rev. Immunol.* 27, 551–589.

Biller, B.J., Elmslie, R.E., Burnett, R.C., Avery, A.C., Dow, S.W. 2007. Use of FoxP3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 116, 69–78.

Bluestone, J.A., Abbas, A.K. 2003. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 253–257.

Bryden, S.L., White, S.D., Dunston, S.M., Burrouws, A.K., Olivry, T. 2005. Clinical, histopathological and immunological characteristics of exfoliative cutaneous lupus erythematosus in 25 German short-haired pointers. *Vet. Dermatol.* 16, 239-252.

Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepfer, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., Ramsdell, F., 2001. Disruption of a new forkhead/wingedhelix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 27, 68–73.

Campanelli, A.P., Roselino, A.M., Cavassani, K.A., Pereira, M.S., Mortara, R.A., Brodskyn, C.I., Goncalves, H.S., Belkaid, Y., Barral-Netto, M., Barral, A., Silva, J.S., 2006. CD4+ CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J. Infect. Dis.* 193, 1313–1322.

Carrion, J., Nieto, A., Iborra, S., Iniesta, V., Soto, M., Folqueira, C., Abanades, D.R., Requena, J.M., Alonso, C., 2006. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Parasite Immunol.* 28, 173–183.

Costa-Val, A.P., Cavalcanti, R.R., Gontijo, N. F., Michalick, M.S., Alexander, B.; Williams, P., Melo, M.N., 2007. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Vet. J.* 174, 636-43.

Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., Schuler, G., 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp. Med.* 193, 1303–1310

Fontenot, J. D., Gavin, M. A., Rudensky, A. Y., 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4, 330–336.

Fontenot, J.D., Rudensky, A., 2005. A well adapted regulatory contrivance: the forkhead family transcription factor Foxp3 and regulatory T cell development. *Nat. Immunol.* 6, 331–337.

Gradoni, L. 2002. The diagnosis of canine leishmaniasis. *Canine Leishmaniasis: Moving towards a solution*. In: *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum*, Intervet International by, Sevilla, Spain, 7-14.

Hori, S., Carvalho, T.L., Demengeot, J., 2002. CD25+ CD4+ regulatory cells suppress CD4+ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice. *Eur. J. Immunol.* 32, 1282

Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S., 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057–1061; Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.A., Ramsdell, F., 2003. An essential role for Scurfin in CD4 + CD25 + T regulatory cells. *Nat. Immunol.* 4, 337–342

Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., Sakaguchi, S., 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25 + CD4 + naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol.* 162, 5317–5326.

Ji J, Masterson J, Sun J & Soong L. 2005. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol.* 174, 7147–7153.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., Enk, A.H., 2001. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.* 193, 1285–1294

Kemper, C.; Chan, A.C.; Green, J. M.; Brett, K. A.; Murphy, K. M.; Atkinson, J. P. 2003. Activation of human CD4₊ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nat.* 421, 388.

Keppel K.E., Campbell K.L., Zuckermann F.A., Greeley E.A., Schaeffer D.J., Husmann R.J. 2008. Quantitation of canine regulatory T cell populations, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol.* 123, 337-44.

Kim, J. M., Rasmussen, J. P., Rudensky, A. Y., 2007. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat. Immunol.* 8, 191–197.

Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.A., Ramsdell, F., 2003. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺T regulatory cells. *Nat. immunol.* 4, 337-342.

Lemos, V. S., Ascensão, J.S., Sampaio, P.T.V., Rodrigues de Freitas, L.A., 2000. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological response in CBA mice. *Microb. Infect.* 15, 1807-1815.

Levings, M. K., Bacchetta, R.; Schulz, U.; Roncarolo, M. G. 2002. The role of IL-10 and TGF- β in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allerg Immunol.* 129, 263.

Liu, W., Putnam, A.L., Xu-Yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Gottlieb, P.A., Kapranov, P., Gingeras, T.R., de St Groth, B.F., Clayberger, C., Soper, D.M., Ziegler, S.F., Bluestone, J.A., 2006. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4 + Treg cells. *J. Exp. Med.* 203, 1701–1711.

Luna, G. L. 1968. Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3 ed. New York McGraw Hill, 285pp.

Majno, G.; Joris, I. 1996. Cells, tissues, and disease: principle of general pathology. Blackwell Science. USA, p. 123-173.

McKee, A.S., Pearce, E.J., 2004. CD25⁺ CD4⁺ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *J. Immunol.* 173, 1224–1231.

Mills, K.H.G., McGuirk, P., 2004. Antigen-specific regulatory T cells—their induction and role in infection. *Semin. Immunol.* 16, 107–117.

Mills, K. H. G., 2004. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat. Rev. Immunol.* 4, 841–855.

Mikel, U. V. 1994. Advanced laboratory methods in histology and pathology. American Registry of Pathology Washington DC.

Moreno, J., Alvar, J. 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 18, 399–405.

Morgan, M.E., van Bilsen, J.H., Bakker, A.M., Heemskerk, B., Schilham, M.W., Hartgers, F.C., Elferink, B.G., van der Zanden, L., de Vries, R.R., Huizinga, T.W., Ottenhoff, T.H., Toes, R.E., 2005. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells in humans. *Hum. Immunol.* 66, 13–20

Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A., Coffman R.L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136, 2348-2357

Nagler, A.C. et al. 2004. Control freaks: immune regulatory cells. *Nat. Immunol.* 5, 119–22.

O'Garra, A., Vieira, P.L. Vieira, P., Goldfeld, A.E., 2004. IL-10-producing and naturally occurring CD4⁺ Tregs: limiting collateral damage. *J. Clin. Invest.* 114, 1372–1378.

Peters, N., Sacks, D., 2006. Immune privilege in sites of chronic infection: Leishmania and regulatory T cells. *Immunol. Rev.* 213, 159–179.

- Pinelli, E. Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., Del Real, G., Ruitenber, J. 1994. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. *Infection and Immunity*. 62, 229-235.
- Pozio, E. Gradoni, L., Bettini, S., Gramiccia, M. 1981. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). *Acta Tropica*. 38, 383-393.
- Ramsdell, F., 2003. Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? *Immunity* 19, 165–168.
- Read, S., Malmstrom, V.; Powrie, F. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁺CD4⁺ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*. 192, 295.
- Reis, A.B., Martins-Filho, O.A., Teixeira-Carvalho, A., Carvalho, M.G., Mayrink, W., França-Silva, J.C., Giunchetti, R.C., Genaro, O., Corrêa-Oliveira, R., 2006. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci*. 81, 68–75.
- Reis, A.B., Martins-Filho, Teixeira-Carvalho, Giunchetti, R.C., Carneiro, C.M., Mayrink, W., Tafuri, W.L., Corrêa-Oliveira, R., 2009. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunology and Immunopathol*. 128, 87-95.
- Ribeiro, R.R. Biodistribuição, Toxicidade e Eficácia Terapêutica da Formulação de Antimoniato de Meglumina Encapsulado em Lipossomas Nanométricos em Cães Naturalmente Infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. 2007. Tese. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 149p.
- Rodrigues, O.R., Marques, C., Clemente, M.S., Ferronha, M.H., Santos-Gomes, G.M., 2009. Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection. *Immunobiol.*, 214, 101–111.
- Roncarolo, M. G.; Bacchetta, R.; Bordignon, C.; Narula, S.; Levings, M.K. 2001. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev*. 182, 68.
- Rouse, B. T. Suvas, S., 2004. Regulatory cells and infectious agents: détente cordiale and contraire. *J. Immunol*. 173, 2211–2215.
- Sanchez, M.A., Diaz, N.L., Zerpa, O., Negron, E., Convit, J., Tapia, F.J. 2004. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 70, 618–624.

- Santana, C.C., De Freitas, L.A.R., Oliveira, G.G.S., Pontes-de-Carvalho, L.C., Dos Santos, W.L.C., 2008. Splenic changes in visceral leishmaniasis inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. *Parasite Immunol.* 30, 515-524.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M., 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155, 1151–1164.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 133, 775–787.
- Sacks, D., Noben-trauth, N. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Natural Review Immunology.* 2, 845-858.
- Salhi, A., V. Rodrigues, Jr., F. Santoro, H. Dessein, A. Romano, L. R. Castellano, M. Sertorio, S. Rafati, C. Chevillard, A. Prata, A. Alcais, L. Argiro, and A. Dessein. 2008. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J. Immunol.* 180, 6139–6148.
- Scharton-Kersten, T., et al. 1995. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J. Immunol.* 154, 5320-5330.
- Shevach, E.M., 2002. CD4 + CD25 + suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 389–400.
- Shevach, E.M., Thornton A., Suri-Payer E. 1998. T lymphocyte-mediated control of autoimmunity. *Novartis Found Symp.* 215, 200-11.
- Shimizu, J., Yamazaki, S.; Takahashi, T.; Ishida, Y.; Sakaguchi, S. 2002. Stimulation of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol.* 3, 135.
- Sojka, D. K., Huang, Y.-H., Fowell, D. J., 2008. Mechanisms of regulatory T-cell suppression—a diverse arsenal for a moving target. *Immunol.* 124, 13–22.
- Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* 192, 303–310.

Tang, Q., Bluestone, J. A., 2008. The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat. Immunol.* 9, 239–244.

Tasca, K.I., Buzetti, W.A.S; Tenorio, M.S., Paulan, S.C., Lima, F.L., Queiroz, N.M.G.P., Machado, R.G., Oliveira, T.M.F.S., Neves, M.F., Noronha Jr., A.C.F., Assis, J. 2009. Exames parasitológicos, imunoistoquímicos e histopatológicos para detecção de *Leishmania chagasi* em tecidos esplênicos de cães com leishmaniose visceral. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 18, 27-33.

Vahlenkamp, T.W., Tompkins, M.B., Tompkins, W.A., 2004. Feline immunodeficiency virus infection phenotypically and functionally activates immunosuppressive CD4 + CD25 + T regulatory cells. *J. Immunol.* 172, 4752–4761.

Vignali, D. A. A., Collison, L. W, Workman, C. J., 2008. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 523–532.

Vigário, A.M., Gorgette, O., Dujardin, H.C., Cruz, T., Cazenave, P.A., Six, A., Bandeira, A., Pied, S., 2007. Regulatory CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells expand during experimental Plasmodium infection but do not prevent cerebral malaria. *Int. J. Parasitol.* 37, 963–973.

Walker, M.R., Kasprovicz, D.J., Gersuk, V.H., Benard, A., Van Landeghen, M., Buckner, J.H., Ziegler, S.F., 2003. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4 + CD25-T cells. *J. Clin. Invest.* 112, 1437–1443.

Weiner, H. L. 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor- β -secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev.* 182, 207.

Wilson, M.E, Sandor, M., Blum A.M, Young, B.M, Metwali, A., Elliott, D., Lynch, R.G., Weinstock, J.V. 1996. Local suppression of IFN- γ in hepatic granulomas correlates with tissue-specific replication of *Leishmania chagasi*. *J Immunol.* 156, 2231–2239.

Ziegler, S.F., 2006. FOXP3: of mice and men. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 209–226.

2.7 Referências Bibliográficas da Introdução Geral

- 1) ABBAS, A. K .; LICHTMAN, A. H.; POBER, J.S. **Cellular and molecular immunology**. 3 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997. 494p.

- 2) ABRANCHES, P.; PEREIRA, M.C.D.S.; SILVA ,F.C.; GOMES, G.M.S.; JANS, J. G. Canine leishmaniasis: **pathological and ecological factors influencing transmission of infection.** Journal of Parasitology, v. 77, p. 561–577, 1991.
- 3) ANDERSON, C.F.; OUKKA, M., KUCHROO, V.J., SACKS, D. **CD4+CD25–Foxp3– Th1 cells are the source of IL-10–mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmâniasis.** The Journal of experimental Medicine. v. 204, n. 2, p. 285–297, 2007.
- 4) ASEFFA, A. et al. **The early IL-4 response to *Leishmânia major* and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4+CD25+ T cells.** The Journal of Immunology, v. 169, p. 3232–3241, 2002.
- 5) ATTA, A.M., et al. **Anti-leishmânial IgE antibodies: a marker of active disease in visceral leishmâniasis.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 59, p. 426-430, 1998.
- 6) BACELLAR O, CARVALHO E.M. **Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral.** Gazeta Médica da Bahia, v.75, p. 24-34, 2005.
- 7) BELKAID, Y. et al. **CD4_CD25_ regulatory T cells control *Leishmânia major* persistence and immunity.** Nature, v. 420, p. 502–507, 2002.
- 6) BERRAHAL, F. et al. **Canine leishmâniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 55, p. 273-277, 1996.
- 7) BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH A. **The role of nitric oxide in innate immunity.** Immunology Review, v. 173, p. 17-26, 2000.

- 8) BRAGA, M. D. et al. **Control of canine visceral leishmâniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 31, p. 419–424, 1998.
- 9) BRANDONISIO O, et al. **Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in leishmânia infantuminfected human macrophages.** *Clinical Experimental Medicine*, v 2, p. 125-129, 2002.
- 10) BRASIL, Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde- FUNASA. *Doenças Infecciosas e Parasitárias: Aspectos Clínicos, Vigilância Epidemiológica e Medidas de Controle Guia de Bolso*. 2. Edição revista e ampliada. Brasília: Ministério da Saúde. 2000. p. 117-118.
- 11) BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1 edição, 3.^a reimpressão. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2006. 120 p.
- 12) BRASIL, Ministério da Saúde. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, segundo UF de residência. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2007.** Disponível em < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_lv.pdf> Acesso :7 maio 2008.
- 13) CABRAL, M. et al. **The imunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing discase spectrum from asymptomatic dogs.** *Veterinary Parasitology*, v. 76, p. 173-189, 1998.
- 14) CASTELLANO, L.R.C. **Resposta imune anti-*Leishmania* e mecanismos de evasão.** *VITAE Academia Biomédica Digital*, v.25, p.1-10, 2005

- 15) CAVASSANI, A.R , et al. **Systemic and Local characterization of Regulatory t cells in a Chronic Fungal infection in humans.** The Journal of Immunology, p. 5811-5818, 2006.
- 16) CHATELAIN, R.; VARKILA, K.; COFFMAN, R.L. **IL-4 induces a Th2 response in *Leishmânia major*-infected mice.** Journal of Immunology, v. 148, p. 1182-1187, 1992.
- 17) CIARAMELLA, P. et al. **A retrospective clinical study of canine leishmâniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmânia infantum*.** The Veterinary Record, v.141, p. 539-543, 1997.
- 18) COSTA, C. H. N. **Are dogs important reservoirs of visceral leishmâniasis?** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 30, p. 155, 1997.
- 19) COSTA, C.H.N.;PEREIRA,H.F.; ARAÚJO, M.V. **Visceral leishmaniasis epidemic in Piauí State, Brazil, 1980-1986.** Revista de Saúde Pública, v.24,. n 5. p.361-362, 1990.
- 20) COSTA, C. H. N. et al. **Competence of the human host as a reservoir for *Leishmânia chagasi*.** Journal of infectious Disease, v. 182, p. 997-1000, 2000.
- 21) COSTA, F.A.L. et al. **CD4+ cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmâniasis.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.33,p. 1455-1458, 2000.
- 22) COSTA,F.A, PRIANTI,M.G, SILVA, T.C, SILVA, S.M, GUERRA, J.L, GOTO, H. **T cells, adhesion molecules and modulation of apoptosis in visceral leishmaniasis glomerulonephritis.** BMC Infect Disease, v.11,p. 10:112, 2010
- 23) COUTINHO,M.T.Z. et al. **Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis.** Veterinary parasitology, v.128, n.1-2,p.149-155, 2005.

- 24) D'AMBROSIO, D. **Regulatory T cells: How do they find their space in the immunological arena?** *Seminars in Cancer Biology*, v. 16, p. 91-97, 2006.
- 25) DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. **Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 3, p. 151-156, 2006.
- 26) DE WAAL MALEFYT, R., et al. **Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes.** *Journal of Experimental Medicine*, v. 174, p. 1209-1220, 1991 a.
- 27) DE WAAL MALEFYT, R., et al. **Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression.** *Journal of Experimental Medicine*, v. 174, p. 915-924, 1991b.
- 28) DING, A., et al. **Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-beta 1 -beta 2 and -beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma.** *Journal of Immunology*, v. 145, p. 940-944, 1990
- 29) DUARTE, M. I. S. **Patologia das principais doenças tropicais no Brasil.** Leishmaniose visceral (calazar). In: BRASILEIRO FILHO, G. *Bogliolo Patologia*. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 1215-1275
- 30) FEITOSA, M. M. **Avaliação clínica de animais naturalmente infectados**, in: 1 Fórum sobre Leishmania Visceral Canina; 9.2006. Jaboticabal, São Paulo. *Anais Jaboticabal*. Universidade Estadual Paulista, 2006. Disponível em www.cbpv.com.br/artigos/CBPV_anais_ILVC.pdf > acesso em: 23 de maio de 2010.

- 31) FERRER LM: **Clinical aspects of canine leishmaniasis.** In: PROCEEDINGS OF THE INTERNACIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM. Barcelona, Spain. Canine Leishmaniasis: an update. Wiesbaden: Hoeschst Roussel vet , p.6-10,1999.
- 32) FONTENOT, J. D.; GAVIN, M.A.; RUDENSKY, A.Y. **Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells.** *Natural Immunology*, v.3, p. 330-336. 2003.
- 33) GANTT, K.R. et al. **Activation of TGF-beta by *Leishmânia chagasi*: importance for parasite survival in macrophages.** *The Journal of Immunology*, v. 170, p. 2613-2620. 2003.
- 34) GERSHON, R.K.; KONDO K. **Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes.** *Immunology*. v.18, p. 723-737.1970
- 35) Gerência de Controle de Zoonoses de Teresina (GEZOON, PI). *Relatório de atividades*. Setor de Leishmaniose visceral. 2007. (Dados cedidos pela Gerência)
- 36) GONTIJO, C.M.F.; MELO , M.N., **Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas.** *Revista Brasileira de Epidemiologia.*, v.7, p. 338-349. 2004.
- 37) GOTO H. **Imunidade inata e imunopatogenia nas leishmanioses experimentais.** 2004. 111fls. Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2004
- 38) GRIMALDI JR, G.; TESH, R. **B. Leishmâniasis of the New World: current concepts and implications for future research.** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 6, p. 230–250, 1993.
- 39) GUARGA JL.; MORENO J.; LUCIENTES J.; GRACIA MJ.; PERIBÁÑEZ MA.; ALVAR J.; CASTILLO JA. **Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity**

- amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells.** Research in Veterinary Science, v.3,p. 249-53,2000.
- 40) HEINZEL, F.P et al. **Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes *in vivo* during healing and progressive murine leishmâniasis.** Proceedings National Academy Science USA, v. 88, p. 7011-7015, 1991.
- 41) ITOH, M. et al. **Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self- tolerance.** Journal of Immunology. v. 162. p.5317-5326. 1999;
- 42)JI, J.; MASTERSON, J.; SUN,J.; SOONG, L. **CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmânia amazonensis* infection.** The Journal of Immunology, v. 174, p. 7147–7153, 2005.
- 43) KEMPER, C.; CHAN,A.C.; GREEN, J. M.; BRETT, K. A.; MURPHY, K. M.; Atkinson, J. P. **Activation of human CD4_ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype.** Nature, v. 421, p. 388, 2003.
- 44)KIMA, P.E. et al. **Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis.** The Journal of Experimental Medicine, v.191, p. 1063-1067, 2000.
- 45) KOUTINAS, A. F. et al. **Clinical considerations on canine visceral leishmaniosis in Greece: a retrospective study of 150 cases (1989-1996).** Journal of the American Animal Hospital Association, v. 35:376-83, 1999.
- 46) KRAUSPENHAR, C. et al. **Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil.** Ciência Rural, v.37, 2007.

- 47) LAINSON R; SHAW, J.J.: Evolution, classification and geographical distribution. In: LAINSON, R.; SHAW, J. J. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**, ed. Peters W, Killick-Kendrick R, vol. 1, chap. 7, London: Academic Press, p. 1-120, 1987.
- 48) LANGONI, H. et al. **American visceral leishmaniasis: a case report**. The Journal of Venomous animals and toxins including tropical diseases, v. 11, p. 361-372, 2005.
- 49) LEVINGS, M. K., BACCHETTA, R.; SCHULZ, U.; RONCAROLO, M. G. **The role of IL-10 and TGF- β in the differentiation and effector function of T regulatory cells**. International Archives Allergy Immunology, v. 129, p.263, 2002.
- 50) LIMA, W.G. et al. **Canine visceral leishmâniasis: a histopathological study of lymph nodes**. Acta tropica, v. 92, p. 43-53, 2004.
- 51) LINHARES, G. F. C. et al. **Relato de um caso clinico de leishmaniose visceral em um cão na cidade de Goiânia**. Revista de Patologia Tropical, v. 34, p. 69-72, 2005.
- 52) LITTLE, S. E. **Protozoal Diseases. Leishmaniasis**. In GREENE, C. E. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3th ed. St. Louis: Saunders, p. 685-698, 2006.
- 53) LIU, H. et al. **CD4₊CD25₊ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF- β , and CTLA4**. The Journal of Immunology, v. 171, p. 5012–5017, 2003.
- 54) LOPEZ, R. et al. **Circulating immune complexes and renal function in canine leishmâniasis**. Journal of Veterinary Medicine, v. 43, p. 469-474, 1996.
- 55) LUVIZOTTO, M. C. R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, Jaboticabal, 2006. **Anais...** Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UEP, p.15-22, 2006.

- 56) MAGALHÃES, N.A. **Avaliação das alterações pulmonares em cães com leishmaniose visceral e sua associação com as manifestações clínicas.** 2009. 44 fls. Dissertação de mestrado apresentada na Universidade Federal do Piauí. Pós-graduação em Ciência Animal. 2009.
- 57) MAGILL, A.J.; GROGL, M.; GASSER, R.A.; SUM, W.; OSTER, C.N. **Visceral infection caused by leishmania tropica in veterans of operation Desert Storm.** New England Journal of Medicine, v.328. p.1383-1387, 1993.
- 58) MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUSA, W.J.S.; AMENDOEIRA, M.M.R. **Leishmaniose visceral-Calazar.** Jornal Brasileiro de Medicina, v.41, n.69, 1981.
- 59) MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. **The strange case of *Leishmania chagasi*.** Parasitology Today, v. 16, p. 188–189, 2000.
- 60) MENDEZ, S. et al. **Role for CD4+CD25+ regulatory T cells in reactivation of persistent Leishmaniasis and control of concomitant immunity.** The Journal of Experimental Medicine, v. 200, p. 201-210. 2004.
- 61) MISSAWA, N. A.; LIMA, G. B. M. **Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no estado de Mato Grosso.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Uberaba, v. 39, n. 4, 2006.
- 62) MORENO, J.; ALVAR, J. **Canine leishmâniasis: epidemiological risk and the experimental model.** Trends in Parasitology, v. 18, p. 399-405, 2002.
- 63) MOSMANN T.R. et al. . **Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.** Journal of Immunology, v.136, p. 2348-2357, 1986.

- 64) MURRAY, H.W.; RUBIN, B.Y.; ROTHERMEL, C.D. **Killing of intracellular *Leishmânia donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine.** *Journal of Clinical Investigation*, v. 72, p. 1506-1510, 1983.
- 65) MURRAY MD, TIERNEY WM, BRATER DC. **Determining the effectiveness of torasemide and furosemide in heart failure: design of a randomised comparison using the regenstrief medical record system.** *Clinical Drug investigation*, v.16, p. 45-52, 1998.
- 66) NAGASE, H. ; JONES, K. M.; ANDERSON, C. F. ; NOBEN-TRAUTH , N. **Despite Increased CD4_Foxp3_ Cells within the Infection Site, BALB/c IL-4 Receptor-Deficient Mice Reveal CD4_Foxp3-Negative T Cells as a Source of IL-10 in *Leishmânia major* Susceptibility.** *The Journal of Immunology*, v.179, p. 2435-2444, 2007.
- 67) NAGLER, A.C. et al. **Control freaks: immune regulatory cells.** *Natural Immunology*, v.5.p.119-22. 2004.
- 68) NEVES, D. P. **Parasitologia Humana.** 11^o. Ed. Atheneu, São Paulo. 2005
- 69) PEARSON, R.D.; STEIGBIGEL, R.T. **Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmânia donovani* by human polymorphonuclear leukocytes.** *Journal of Immunology*, v. 127, p. 1438-1443, 1981.
- 70) PINELLI, E. et al. **Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*.** *Infection and Immunity*, v.62, p. 229-235, 1994.
- 71) POZIO, E. et al. **Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto).** *Acta tropica*, v. 38, p.383-93, 1981

- 72) READ, S., MALMSTROM, V.; POWRIE, F. **Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁺CD4⁺ regulatory cells that control intestinal inflammation.** *The Journal of Experimental Medicine*, v.192,p.295, 2000.
- 73) REY, L. **Parasitologia.** 3. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan. 2001. p 214- 256
- 74) RIDLEY, D. S. Pathology. In: PETERS, W.; KILLICH-KENDRICK, R. (eds). **The Leishmaniasis in Biology and Medicine.** London: Academic Press, 1987. p. 670-680.
- 75) RIVAS, L. et al. **Virulence and disease in leishmâniasis: what is relevant for the patient?** *Trends in parasitology*, v. 20, p. 297–301, 2004.
- 76) RODRIGUES, O.R, ET AL. **Identification of regulatory T cells during experimental Leishmania infantum infection.** *Immunobiology*, v. 214, p.101-111, 2009.
- 77) ROGERS, K.A. et al. **Type 1 and Type 2 responses to Leishmânia major.** *FEMS Microbiology Letters*,v. 209, p. 1-7, 2002.
- 78) RONCAROLO, M. G.; BACCHETTA, R.; BORDIGNON,C.; NARULA, S.; LEVINGS, M.K.. **Type 1 T regulatory cells.** *Immunology Review*, v. 182,p.68, 2001
- 79) RUDENSKY, A.Y; CAMPBELL, D.J. **In vivo sites and cellular mechanisms of T reg cell- mediated suppression.** *The Journal of Experimental Medicine*, v. 203, p. 489-492, 2006.
- 80) SACKS, D., NOBEN-TRAUTH, N. **The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice.** *Natural Review Immunology* v, 2, p. 845-858, 2002.

- 81) SAKAGUCHI, S. **Naturally arising CD4₊ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses.** Annual Review of Immunology, v.22, p. 531–562. 2004.
- 82) SANTOS, S. O. et al. **Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis.** Medical and Veterinary Entomology, v. 12, p. 315-7, 1998.
- 83) SANTOS-GOMES, G. M.; CAMPINO, L.; ABRANCHES, P. **Canine Experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 95, p. 193-198, 2000.
- 84) SCHARTON-KERSTEN, T., et al. **IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmâniasis.** The Journal of Immunology, v. 154, p. 5320-5330, 1995.
- 85) SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DO PIAUÍ. Coordenação de Vigilância em Saúde Ambiental. Programa de Controle das Leishmanioses. **Série histórica de 1998 a 2008**, Teresina, PI, 2009.
- 86) SHEVACH, E. M. **CD4₊CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers.** Nature. Reviews. Immunology. v.2, p. 389–400, 2002.
- 87) SHEVACH, E. M.; THORNTON, A.; SURI-PAYER, E. **T lymphocyte-mediated control of autoimmunity.** Novartis Found Symp.v.215. p.200-11. 1998;
- 88) SHIMIZU, J., YAMAZAKI, S.; TAKAHASHI, T.; ISHIDA, Y.; SAKAGUCHI, S. **Stimulation of CD25⁺CD4₊ regulatory T cells through GITR breaks immunological selftolerance.** Natural Immunology, v.3:135, 2002.
- 89) SILVA, F. S. **Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina.** Revista tropica – Ciências Agrárias e Biológicas, v. 1, p. 20-31, 2007.

- 90) SLAPPENDEL, R. J. **A review based on 95 cases in the Netherlands.** The Veterinary quarterly v.10:1-16, 1988
- 91) SOLANO-GALLEGO, L. et al. **Prevalence of *Leishmânia infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmâniasis endemicity using PCR on several tissues and serology.** Journal of Clinical Microbiology, v. 39, p. 560-563, 2001.
- 92) TAFURI, W.L. et al. **Canine visceral leishmâniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil.** Veterinary Parasitology, v. 96, p. 203-212, 2001.
- 93) TAAMS, L.S. et al. **Antigen-specific T cell suppression by human CD4+CD25+ regulatory T cells.** European Journal of Immunology, v.32.p.1621-30. 2002.
- 94) TAFURI, W. L. et al. **Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil.** Veterinary Parasitology, v. 96, p. 203-212, 2001.
- 95) TORRENT, E. et al. **Myocarditis and generalized vasculitis associated with leishmaniasis in a dog.** The Journal Small Animal Pratic, v.11:549-552, 2005.
- 96) TRINCHIERI, G.; GEROSA, F. **Immunoregulation by interleukin- 12.** Journal of Leukocyte Biology, v. 59,p. 505-511, 1996.
- 97) WEINER, H. L. **Induction and mechanism of action of transforming growth factor- β -secreting Th3 regulatory cells.** Immunology Review, v. 182, p.207, 2001.
- 98) XAVIER, S.C. et al. **Canine visceral leishmâniasis: a remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal reported from Belo Horizonte, Minas**

- Gerais, Brazil.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.58, p. 994-1000, 2006.
- 99) WOODMAN, R.C ,et al. **The functional paradox of CD43 in leukocyte recruitment: a study using CD43-deficient mice.** Journal Experimental Medicine, v.188, p. 2181-2186, 1998.
- 100) WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços. Disponível em: <http://www.who.int/leishmâniasis/en_>. Acesso em 2 de março de 2010.

Apêndice 1

FICHA PARA EXAME CLÍNICO

Identificação
Animal nº _____
Sexo: Macho () Fêmea (); Cor: _____
Peso: _____ Kg; Idade: _____
Procedência: _____
Diagnóstico: Sorológico _____ Parasitológico _____

Exame clínico
Emagrecimento: Sim () Não () Alopecia: Sim () Não ()
Descamação furfurácea na pele (seborréia): Sim () Não () Queratite: Sim () Não ()
Lesões na pele: Sim () Não ()
- Localização: Focinho () Orelha () Extremidades () Outros _____
Ulcerações na pele: Sim () Não ()
- Localização: Focinho () Orelha () Extremidades () Outros _____
Despigmentação no focinho: Sim () Não ()
Nódulos Subcutâneos: Sim () Não () Onicogribose: Sim () Não () Conjuntivite: Sim () Não ()
Edema: Sim () Não () Apatia: Sim () Não ()
Febre: Sim () Não () Mucosas pálidas: Sim () Não ()
Dispnéia: Sim () Não () Incoordenação motora: Sim () Não ()
Hiperestesia: Sim () Não ()
Paresia do trem posterior: Sim () Não ()
Fezes sanguinolentas: Sim () Não () Diarréia: Sim () Não ()
Linfonodos superficiais aumentados: Sim () Não () Qual? _____

Exame de necropsia
Linfonodos mesentéricos aumentados: Sim () Não ()
Baço aumentado: Sim () Não () Fígado aumentado: Sim () Não ()
Observações: _____

Apêndice 2

Análise morfométrica das alterações em baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania (L) chagasi*, coradas com H-E

Hematoxilina- eosina (Mediana)					
Cães	Folículos			Bainha Periarteriolar	
	N de folículos	Área folicular (x 10 ³ μm ²)	Diâmetro folicular (x 103 μm ²)	Número de arteríolas	espessura (μm)
Controles					
40	0	0	0	0	0
41	0	0	0	1	28,69
42	0	0	0	2	45,49
43	1	133,56	1,36	2	5,67
44	2	277,8	2,03	1	11,64
45	1	108,8	1,23	1	7,09
46	2	105,5	1,24	2	11,29
Assintomáticos					
2	5	90,99	1,2	6	28,6
5	0	0	0	2	14,31
8	1	185,3	1,7	3	28,6
26	7	147,56	1,61	9	14,34
27	0	0	0	2	32,92
31	1	223,05	2,65	0	0
Oligossintomáticos					
1	9	107,7	1,21	10	42,17
6	2	25,3	0,6	9	12,26
7	6	153,8	1,5	14	21,13
11	5	80,8	1,21	10	18,8

13	0	0	0	3	14,29
15	1	186,9	1,8	1	19,24
16	1	120,56	1,4	10	16,22
17	1	114	1,3	1	21,96
18	1	16,1	1,5	2	9,56
19	1	127,4	1,4	6	11,9
21	0	0	0	5	17,05
25	2	247,15	1,89	2	10,13
28	3	240	1,91	4	21,45
30	8	138,3	1,43	14	15,73
33	5	104,1	1,56	6	19,76
Polissintomáticos					
4	0	0	0	6	20,37
9	8	198,56	1,81	13	17,05
10	3	279,8	2,14	5	25,12
12	0	0	0	2	28,98
14	0	0	0	14	11,01
22	3	109,09	1,31	3	9,6
23	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0
29	3	220,57	1,86	0	0
20	5	78,06	1,09	1	7,53
34	1	122,34	1,39	3	25,1

Apêndice 3

Análise morfométrica das alterações em baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania (L) chagasi*, e cães não infectados, coradas com Ácido periódico de Schiff (PAS)

PAS (média)	
Animais	Corpúsculos de Russel
Controles	
40	0
41	0
42	4
43	17
44	60
45	52
46	27
Assintomáticos	
2	39,5
5	87
8	21,5
26	0
27	0
31	0
Oligossintomático	
1	63
6	71
7	0

11	95
13	31
15	15
16	48
17	0
18	0
19	29
21	20
25	0
28	7
30	6
33	8
Polissintomáticos	
4	0
9	34
10	8
12	52
14	0
20	13,5
22	32
23	16
24	48
29	34
34	55