

FLAVIANE ALVES DE PINHO

QUANTIFICAÇÃO DE mRNA DE IGF-I EM PELE, FÍGADO, BAÇO E LINFONODO  
POPLÍTEO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania)*  
*chagasi*

TERESINA/PI

2010

FLAVIANE ALVES DE PINHO

QUANTIFICAÇÃO DE mRNA DE IGF-I EM PELE, FÍGADO, BAÇO E  
LINFONODO POPLÍTEO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR  
*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

Co-orientadora: Profa. Dra. Hiro Goto

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal

TERESINA/PI

2010

FLAVIANE ALVES DE PINHO

QUANTIFICAÇÃO DE mRNA DE IGF-I EM PELE, FÍGADO, BAÇO E  
LINFONODO POPLÍTEO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR  
*Leishmania (Leishmania) chagasi*

Dissertação aprovada em: 29/01/2010

Banca examinadora:



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

Orientador



Dra. Célia Maria Vieira Vendrame – IMT/USP

Examinadora Externa



Profª. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz – CCA/UFPI

Examinadora interna

“Deus nunca disse que a vida seria fácil. Ele simplesmente prometeu que valeria a pena”.

Autor desconhecido

À minha mãe, Terezinha de Jesus Alves e aos meus irmãos, Fabiane Alves de Pinho e Daniel Alves Leão, que sempre me apoiaram e acreditaram nos meus objetivos acadêmicos.

Essa conquista é nossa.

## AGRADECIMENTOS

À DEUS pela oportunidade de viver e poder acreditar em um bem maior.

Ao meu orientador, Francisco Assis Lima Costa, que contribuiu diariamente para o meu enriquecimento científico.

A Profa. Dra. Hiro Goto pela oportunidade e aprendizado adquirido durante o desenvolvimento da minha dissertação no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia – IMT/USP.

À Profa. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz que me deu a oportunidade de ingressar no mundo da pesquisa.

Aos meus parceiros de coleta que durante esse processo tivemos a oportunidade de criarmos não só laços científicos, mas também uma amizade sólida e verdadeira: Aline Andrade, Nilton Magalhães, Kleverton Ribeiro, Fernando Oliveira, Edson Egledson e David César.

À minha amiga Lucilene Santos pelo exemplo de determinação e força, que sempre me ajudou em toda a minha trajetória.

Aos meus amigos Adeline Andrade, Francisco Leite, Lidiany Viana e Thiago Saraiva que sempre me ajudaram nos momentos difíceis.

A todos os colegas que formam o grupo da Patologia Animal, onde trocamos idéias e muitos momentos de descontração.

Aos companheiros de laboratório do Instituto de Medicina Tropical – IMT/USP: Eduardo Sanchez, Luiza Reis, Maria das Graças Prianti, Célia Vendrame e Taccyana Mikulski Ali pelas orientações na execução do meu projeto.

Ao grupo de estudo do IMT pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos e amizade. E, a todos aqueles que me acolheram e me guiaram durante toda a minha trajetória no instituto.

À Gerência de Zoonoses de Teresina/PI e Hospital Veterinário Universitário (UFPI) pelo apoio e dedicação dos funcionários no fornecimento de animais para a realização da pesquisa.

Aos professores da Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí.

Ao Eduardo Brás e Manoel de Jesus, técnicos do Laboratório de Histopatologia do Centro de Ciências Agrárias da UFPI, pela confecção das lâminas para análise histopatológica.

Aos funcionários da Pós-graduação, Luis Gomes da Silva e Vicente, sempre prestativos.

Aos meus colegas de Pós-graduação, pela amizade e momentos de descontração.

Aos cães sacrificados para a realização do meu projeto.

A todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para a realização do meu projeto e crescimento pessoal.

PINHO, Flaviane A.; MAGALHÃES, Nilton A.; SILVA, Kleverton R.; OLIVEIRA, Fernando, L. L.; CARVALHO, Aline A.; SANCHEZ, Eduardo M. R.; GOTO, Hiro; COSTA, Francisco A. L. Quantificação de mRNA de IGF-I em pele, fígado, baço e linfonodo poplíteo de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* [Quantification of mRNA of IGF-I in skin, liver, spleen and popliteal lymph nodes of dogs infected naturally with *Leishmania (Leishmania) chagasi*] Veterinary Immunology and Immunopatology.

A leishmaniose visceral (LV) é uma enfermidade infecciosa generalizada, crônica, que acomete preferencialmente órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear. O protozoário causador da LV nas Américas é *Leishmania (Leishmania) chagasi*. O cão doméstico é considerado o principal reservatório da LV. Durante a infecção, o fator de crescimento insulina símile-I (“insulin-like growth factor-I” = IGF-I) por exercer papel modulador na resposta imune, sobretudo por sua ação direta sobre a leishmânia, tem-se destacado como um fator importante no desenvolvimento da LV. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a participação de IGF-I no desenvolvimento da infecção e na patogenia da LV em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* e em cães não infectados, analisando a sua expressão em pele, fígado, baço e linfonodo poplíteo. Foram utilizados seis cães infectados com manifestação clínica para LV e seis cães não infectados controle. Os animais foram examinados clinicamente e foram realizados exames hematológicos e bioquímicos. Foram coletados fragmentos da orelha, região ungueal anterior, fígado, baço e linfonodo poplíteo. Foram preparados *imprints* dos órgãos em lâminas para análise citológica e em seguida fragmentos foram fixados em formol a 10% para análise histopatológica, e em meio RPMI 1640 com glicerol a 10% para RT-PCR e PCR em tempo real. Os achados clínicos mais frequentes foram lesões de pele (100%) e linfadenopatia (66,67%). Os exames laboratoriais revelaram anemia normocítica normocrômica, aumento de transaminase glutâmica pirúvica (TGP), aumento de proteínas totais com hiperglobulinemia e hipoalbuminemia em 80% dos cães infectados. Na análise citológica observou-se uma correlação positiva entre o parasitismo na pele e linfonodo poplíteo ( $r=0,99$ ). A análise histopatológica em pele revelou, dentre outras alterações, infiltrado inflamatório difuso e/ou focal predominantemente linfohistioplasmocitário. Havia correlação entre as alterações inflamatórias presentes na orelha e região ungueal ( $r= 0,85$ ). O fígado apresentou como lesão mais severa, metamorfose gordurosa. Havia hipertrofia e hiperplasia de células de Kupffer em intensidade maior no grupo de animais infectados quando comparado ao grupo controle ( $P= 0,0476$ ). No baço, foi encontrado depleção de células da bainha periarteriolar e granulomas. No linfonodo poplíteo observou-se infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário na cápsula e hiperplasia de folículos em intensidade maior do que no grupo controle ( $P= 0,0274$ ). Além disso, havia depleção de folículos e de células da região paracortical. Ao analisar os níveis séricos de IGF-I, observou-se que os animais infectados apresentavam níveis diminuídos quando comparado ao grupo controle, mas sem diferença significativa. A análise da expressão de mRNA de IGF-I permitiu observar que em pele, baço e fígado, ocorreram valores maiores de IGF-I nos cães infectados quando comparados aos animais controles. Em contrapartida, em linfonodo poplíteo os animais infectados apresentaram expressão de IGF-I menor quando comparados aos animais controles. De um modo geral, fígado de cães apresentava uma maior expressão de mRNA de IGF-I quando comparados aos demais órgãos. Nos animais com um quadro clínico mais avançado para LV, observou-se uma notável queda na expressão de IGF-I em pele, baço e linfonodo, exceto no fígado. Conclui-se que animais com LV apresentaram uma maior

expressão de IGF-I em pele, baço e fígado, sugerindo que a expressão de IGF-I pode estar associada com o estabelecimento da infecção leishmaniótica.

Palavras-chave: leishmaniose visceral, cão, insulin-like growth factor I, pele

PINHO, Flaviane A.; MAGALHÃES, Nilton A.; SILVA, Kleverton R.; OLIVEIRA, Fernando, L. L.; CARVALHO, Aline A.; SANCHEZ, Eduardo M. R.; GOTO, Hiro; COSTA, Francisco A. L. Quantification of mRNA of IGF-I in skin, liver, spleen and popliteal lymph nodes of dogs infected naturally with *Leishmania (Leishmania) chagasi* [Quantificação de mRNA de IGF-I em pele, fígado, baço e linfonodo poplíteo de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*] Veterinary Immunology and Immunopathology.

Visceral leishmaniasis (VL) is a widespread chronic infectious disease where that parasite occurs mainly in organs rich in cells of the mononuclear phagocyte system. The protozoan that causes VL in the Americas is *Leishmania (Leishmania) chagasi*. The domestic dog is considered the main reservoir of VL. During infection, the insulin-like growth factor-I (IGF-I) plays a role in the modulation of the immune response in the leishmaniasis, particularly acting directly on *Leishmania*. The aim of this study was to evaluate the participation of IGF-I in the development of the infection and the pathogenesis of LV in six dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Skin, liver, spleen and popliteal lymph node were examined. Following autopsy, ear, ungueal region, liver, spleen and popliteal lymph nodes were obtained for touch imprint cytology. Fragments of these organs were fixed in 10% formalin for histopathological analysis, and in RPMI 1640 medium with 10% glycerol for RT-PCR and real-time PCR. The most frequent clinical findings were skin lesions (100%) and lymphadenopathy (66.67%). Laboratory tests revealed normochromic normocytic anemia, increase of glutamic pyruvic transaminase (TGP), hypoalbuminemia and hyperglobulinemia in 80% of infected dogs. The cytological analysis showed a positive correlation between the parasitism in the skin and popliteal lymph node ( $r = 0.99$ ). The histopathologic analysis of skin showed a diffuse and/or focal infiltrate predominantly lymphohistioplasmocitary. There was correlation between the inflammatory changes present in the ear and ungueal region ( $r = 0.85$ ). In the liver the more severe alteration was fatty changes. There was hypertrophy and hyperplasia of Kupffer cells that were more intense in the group of infected animals when compared to the control group ( $P = 0.0476$ ). In the spleen, there was depletion of periarteriolar sheath cells and granuloma. In the popliteal lymph node inflammatory infiltrate lymphohistioplasmocitary in the capsule was observed. Hyperplasia of follicles was observed in greater proportions than in the control group ( $P = 0.0274$ ). Moreover, there was depletion of follicles and cells of the paracortical area. The serum levels of IGF-I, in the infected animals were reduced compared to the control group. Analysis of mRNA expression of IGF-I observed in the skin, spleen and liver, revealed higher levels in the infected dogs when compared to control animals. In contrast, popliteal lymph node in the infected animals showed expression of IGF-I was lower when compared to control animals. In general, the liver of dogs showed a higher mRNA expression of IGF-I when compared to other organs. In animals with a more advanced clinical feature of VL, there was a notable decrease in the expression of IGF-I in the skin, spleen and lymph node, except the liver. In conclusion the animals with VL had a higher expression of IGF-I in skin, spleen and liver which suggests that the expression of IGF-I is related to the the establishment of leishmanial infection.

Keywords: visceral leishmaniasis, dog, insulin-like growth factor I, skin

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2 CAPÍTULO I: Expressão de IGF-I em pele, fígado, baço e linfonodo poplíteo de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> .....	20
ABSTRACT.....	20
2.1 INTRODUÇÃO.....	21
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.3 RESULTADOS.....	26
2.4 DISCUSSÃO.....	41
2.5 CONCLUSÕES.....	47
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	53
APÊNDICE 1.....	60
ANEXO.....	61

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

As leishmanioses são doenças endêmicas com altos índices de morbidade e mortalidade. Mais de trezentos e cinquenta milhões de pessoas (adultos e crianças), em diferentes partes do mundo, estão em risco de contrair leishmaniose e estima-se que cerca de 60.000 mortes por ano ocorram devido a essa enfermidade. As leishmanioses são consideradas um dos principais problemas 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 (LV). Atualmente, as leishmanioses têm uma larga distribuição geográfica e são agora relatadas em áreas não endêmicas (WHO, 2010).

O protozoário causador da LV nas Américas é um parasita intracelular obrigatório, da família Trypanosomatidae, gênero e subgênero *Leishmania* e espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Sinonímia = *L. infantum*) (MAURÍCIO; STOTHARD, MILES, 2000). A principal forma de transmissão do parasita para o homem e outros hospedeiros mamíferos é pela picada de fêmeas de dípteros da família *Psychodidae*, sub-família *Phlebotominae*, conhecidos genericamente por flebotomíneos. A *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* é a principal espécie transmissora da *L. chagasi* no Brasil, mas outra espécie, a *L. cruzi*, foi considerada vetor em foco da doença no estado de Mato Grosso do Sul (SANTOS et al., 1998).

O complexo das leishmanioses, quanto às características clínicas e a relação parasito-hospedeiro, pode ser dividido em duas doenças distintas: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV). A LT é considerada uma enfermidade polimórfica e espectral da pele e das mucosas, que pode se manifestar por meio de diferentes formas clínicas: cutânea, cutaneomucosa e disseminada (LAINSON; SHAW, 1998). A LV ou calazar é uma enfermidade infecciosa generalizada crônica, que acomete preferencialmente órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear, podendo ser fatal ao hospedeiro (SANTOS-GOMES; CAMPINO; ARRANCHES, 2000; SILVA, 2007).

No Brasil, a LV inicialmente tinha um caráter eminentemente rural e, mais recentemente, vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte. Na década de 90, aproximadamente noventa por cento (90%) dos casos notificados de LV ocorreram na Região Nordeste. À medida que a doença se expande para outras regiões e atinge áreas urbanas e periurbanas, a prevalência da doença vem se modificando, de modo que a Região Nordeste, no período de 2000 a 2002, já apresentou uma redução para 77% dos casos registrados no país (BRASIL, 2006).

No ano de 2000, foram registrados 3.779 novos casos de LV em humanos em 18 estados brasileiros. Estima-se que para cada caso humano, ocorra uma média de pelo menos 200 cães infectados. As infecções dos cães precedem sempre o surgimento de casos humanos, pois o cão é considerado o principal reservatório da doença para o homem (MONTEIRO; LACERDA; ARIAS, 1994; DESJEUX, 2003).

A doença tem apresentado mudanças importantes no padrão de transmissão, inicialmente predominado pelas características de ambientes rurais e periurbanas e, mais recentemente, em centros urbanos como São Luís (MA), Fortaleza (CE), Natal (RN), Aracaju (SE), Belo Horizonte (MG), Santarém (PA), Corumbá (MS), Campo Grande (MS), Palmas (TO), Araçatuba (SP) com registro de casos autóctones (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; TESH, 1995).

Dentre os estados do Nordeste, o Piauí foi palco da primeira epidemia de LV humana há quase três décadas. Em Teresina, foram notificados os primeiros casos humanos a partir de 1971, mantendo seis casos/ano até 1980. No período de 1971 a 1979 a LV apresentava-se como uma endemia no Estado e, a maioria dos casos, era notificada como procedente de Teresina. A epidemia teve início em 1981, com o registro de 55 casos, ocorrendo dentro de períodos bem definidos compreendidos entre os anos de 1981-1986 e 1989-1995 (COSTA; PEREIRA; ARAÚJO, 1990; ARAÚJO, 1995). Desde então, a cidade de Teresina, sofreu muitas transformações sócio-econômicas e ambientais, que contribuíram, ainda mais, para o aumento da prevalência e incidência da LV humana e canina (WERNEK et al., 2008).

A doença canina, do ponto de vista epidemiológico, é considerada mais importante que a doença humana, pois além de ser mais prevalente, os animais infectados apresentam elevado parasitismo cutâneo, tornando-os a principal fonte de infecção para os insetos vetores (RIBEIRO et al., 1999). Os cães preenchem as condições necessárias para serem reservatórios, por serem altamente susceptíveis à infecção, por apresentarem intenso parasitismo cutâneo e também pelo seu convívio junto ao homem (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006). No entanto, mais de dois milhões de cães participaram de uma triagem e mais de 160.000 cães soropositivos foram eliminados, mas a incidência da LV humana não foi reduzida em níveis aceitáveis (BRAGA et al., 1998).

Comparando-se a infecção canina e o percentual de eliminação de cães soropositivos nos períodos de 1995 a 2006 em Teresina-PI, foi observado que apesar da taxa de eliminação ser relativamente alta, com média de 62,97%, a mesma não parece ter exercido influência sobre a infecção canina de forma regular, pois a eliminação elevada de cães soropositivos em um ano não conseguiu reduzir a infecção canina no ano seguinte. Além disso, nesse mesmo

período não foi possível verificar a influência significativa da infecção canina sobre a incidência humana (ARAGÃO; DOURADO; PACHECO, 2008).

De acordo com a Gerência de Zoonoses de Teresina – PI (dados não publicados), o inquérito sorológico realizado em 23.918 amostras de cães oriundos de todas as regiões da cidade, no período de janeiro a dezembro de 2008, apresentou resultados positivos em 3.115 cães (13,02%). No posto permanente da Gerência de Zoonoses de Teresina-PI (GEZOON), no mesmo período, foram realizados 2.339 exames sorológicos apresentando resultados positivos em 458 (19,58%) dos animais.

O cão doméstico desempenha grande importância na epidemiologia da LV em áreas endêmicas por albergar o parasita na derme, atuando, desse modo, como fonte de infecção para flebotomíneos durante o repasto sanguíneo (LAINSON; SHAW, 1987; MATTOS JR et al., 2004). No entanto, não somente o cão é reservatório da *L. chagasi* em áreas urbanas, mas, também, animais da fauna sinantrópica e, inclusive, o homem, são considerados reservatórios do parasita no Brasil (COSTA, 1997; COSTA et al., 2000).

Nos arredores de Teresina já foram observadas raposas (*Cerdocyon thous*) naturalmente infectadas por *L. chagasi* (MENDONÇA et al., 2003; ANTUNES et al., 2006). Esses animais favorecem a possibilidade de comunicação recíproca com cães e seres humanos das proximidades (ANTUNES et al., 2006). O soro de raposas (*Cerdocyon thous*) foi testado para verificar a presença de anticorpos contra as proteínas da saliva de *L. longipalpis*, tendo sido observado que esses animais apresentaram altos títulos de anticorpos, sugerindo contato entre raposas e o vetor de LV em Teresina. Amostras de soro de humanos e cães que viviam na mesma área apresentaram menor reatividade contra a saliva do vetor quando comparado às raposas. Esses achados sugerem que o foco de transmissão natural de *L. chagasi* existe independentemente da transmissão entre cães e humanos (GOMES et al., 2007).

Os cães são considerados a parte mais vulnerável no ciclo de transmissão de *L. chagasi*. No entanto, a infecção não significa necessariamente doença ativa (MORENO; ALVAR, 2002). Cerca de 60-80% dos animais que têm contato com o parasito, como demonstrado pela presença de anticorpos anti-leishmânia ou por resposta imune mediada por célula específica ou pela detecção de DNA de leishmânia pela Reação em Cadeia de Polimerase, não apresentaram manifestações clínicas da enfermidade (BERRAHAL et al., 1996; CABRAL et al., 1998; SOLANO-GALLEGO et al., 2001), tornando impossível o diagnóstico puramente clínico. Dessa forma, o diagnóstico da doença é complexo e deve se fundamentar em informações relativas ao estado clínico do animal, epidemiologia da área de

ocorrência da doença, achados parasitológicos, sorológicos e moleculares, sendo que todos os dados devem ser considerados em conjunto (ALVAR et al., 2004).

A importância do cão assintomático na cadeia epidemiológica tem gerado vários questionamentos a respeito do seu papel como reservatório potencial na transmissão da LV. Parte dos animais infectados, mesmo na ausência de manifestações clínicas da doença, apresenta parasitismo cutâneo, sendo potencialmente infectantes para o vetor (TRAVI et al., 2001; MORENO; ALVAR, 2002; LARANJEIRA, 2008; REIS et al., 2009). Em contrapartida, outros estudos demonstram que a carga parasitária está correlacionada com o estado clínico. Os cães assintomáticos apresentam baixo parasitismo em órgãos do sistema fagocítico mononuclear e, mesmo, ausência de parasitas na pele (SOLANO-GALLEGO et al., 2001; VERÇOSA et al., 2008). Portanto, animais que apresentam manifestações clínicas possuem maior probabilidade de infectar os vetores flebotomíneos que cães sem manifestações clínicas (VERÇOSA et al., 2008). A infecção em cães por espécies de *Leishmania* é clinicamente semelhante à infecção humana, embora no cão sintomático, além do acometimento das vísceras, sejam frequentemente encontradas lesões de pele e anexos, destacando-se dermatite esfoliativa, alopecia, ulcerações cutâneas, sobretudo nas orelhas, focinho e ponta da cauda, onicogribose e hiperqueratose nasal e digital (CIARAMELLA et al., 1997; ALVAR et al., 2004; KRAUSPENHAR et al., 2007).

Os principais sinais clínicos na leishmaniose visceral canina (LVC) são caquexia, hipergamaglobulinemia, hepatoesplenomegalia, anemia, linfadenopatia e lesões de pele (CIARAMELLA et al., 1997; FERRER, 1999; BRITO et al., 2004; LIMA et al., 2004; LANGONI et al., 2005; LINHARES et al., 2005; KRAUSPENHAR et al., 2007). Apesar do viscerotropismo natural da *L. chagasi*, lesões de pele são as manifestações mais frequentes (FERRER et al., 1988).

As leishmânias quando são inoculadas na pele do hospedeiro pelos flebotomíneos, invadem os macrófagos e neles se multiplicam. Cerca de três horas após a inoculação, leishmânias são observadas em vários neutrófilos e alguns macrófagos, dependendo da resposta do hospedeiro, de onde podem se disseminar para outros órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear como baço, medula óssea, fígado e trato gastrointestinal (SANTOS-GOMES; CAMPINO; ARRANCHES, 2000; TAFURI et al., 2001).

Histologicamente, 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, é observada hipertrofia das células de Kupffer, as quais podem estar intensamente parasitadas.

Na medula óssea, os histiócitos parasitados vão gradativamente substituindo o tecido hematopoiético. O baço pode apresentar cápsula espessa, intenso parasitismo e hipotrofia da polpa branca (REY, 2002).

Estudos em cães experimentalmente infectados por *L. chagasi*, demonstraram que as principais alterações histológicas ocorrem em órgãos linfóides e tecido cutâneo. A maior delas foi a redução da população de linfócitos nas regiões paracorticais dos linfonodos e tonsilas, e na bainha linfocitária periarteriolar do baço. Outra característica morfológica importante observada foi a hiperplasia nodular e aumento de células plasmáticas nos folículos linfóides dos linfonodos, tonsilas, baço e placas de Peyer; todas essas áreas são predominantemente B-dependentes, indicando que a infecção experimental de LV canina apresenta lesões semelhantes às observadas aos casos humanos. Os cães desenvolveram lesões cutâneas progressivas e evidências de supressão da imunidade mediada por células (KEENAN et al., 1984).

A LV é uma doença infecciosa grave que pode ser fatal se não tratada, pois o hospedeiro susceptível falha em desencadear uma resposta protetora eficiente contra o parasita (GONTIJO; MELO, 2004). Mesmo conhecendo as características dos agentes causadores das leishmanioses e o modo como esses infectam um hospedeiro vertebrado, entende-se hoje que a resposta imune do hospedeiro mamífero pode levar à cura espontânea ou a progressão da doença (GRIMALDI JR; TESH, 1993; RIVAS et al., 2004).

Sabe-se que nas leishmanioses a resposta imune celular é considerada a mais importante tanto na resistência quanto na suscetibilidade à infecção (SACKS; NOBENTRAUTH, 2002). No entanto, na fase inicial, fatores inespecíficos estão sendo considerados fundamentais na determinação do curso da doença (REINER; LOCKSLEY, 1995; SHANKAR; TITUS, 1995). Além do sistema complemento, neutrófilos e eosinófilos (SACKS; LOUIS; WIRTH, 1993; LAURENTI et al., 1996), outros fatores estão sendo considerados nessa fase, dentre eles, o fator de crescimento insulina-símile I (“insulin-like growth factor”-IGF-I).

IGF-I está despertando grande interesse no estudo da imunidade nas leishmanioses, pois supostamente corresponde a um dos primeiros fatores encontrados pelas formas promastigotas de leishmânia na pele do hospedeiro e, possivelmente, como amastigotas, após a internalização por macrófagos (GOTO et al., 1998).

Os fatores de crescimento insulina-símile (Insulin-like growth factor – IGF) são polipeptídeos filogeneticamente bem preservados, com massa molecular de 7,5 kDa, sendo conhecidas duas formas principais: IGF-I e –II, que apresentam 60% de similaridade na

seqüência de resíduos de aminoácidos. Estão presentes na circulação e na maioria dos tecidos; são sintetizados pela maioria das células, mas, principalmente, pelos hepatócitos. No soro e nos tecidos a maior parte desses fatores encontram-se ligados às proteínas ligantes de IGF (“IGF-binding proteins” = IGF-BPs). IGF-I e -II interagem com receptores de superfície (IGF-IR e IGF-IIR), presentes nas células da maioria dos tecidos. O IGF-IR é o que apresenta funções mais definidas e importantes no processo biológico (HUMBEL, 1990; RECHELER; NISSLEY, 1990; JONES; CLEMONS, 1995).

Os IGFs participam do crescimento e da função de quase todos os órgãos (LE ROITH, 1997), além disso, são importantes na indução da resposta inflamatória, ativação imune e cura de feridas (JONES; CLEMONS, 1995; KRATZ et al., 1992; KRATZ; GIDLUND, 1994). O IGF-I exerce efeitos metabólicos similares a insulina e está envolvido na homeostase tecidual por meio da regulação da proliferação celular e morte programada das células (apoptose). Evidências sugerem que IGF-I afeta a homeostasia do sistema imune por aumentar linfopoiese, granulopoiese, proliferação celular e sobrevivência celular (KOOIJMAN; HOOGHE-PETERS; HOOGHE, 1996; CLARK, 1997).

Nas leishmanioses, o IGF-I mostrou-se relevante por induzir *in vitro* um aumento na proliferação de formas promastigotas de *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) panamensis*, *L. (L.) amazonensis* e em formas amastigotas axênicas de *L. (L.) mexicana*, induzindo a fosforilação de moléculas intracelulares. O mesmo não acontece quando leishmânias são estimuladas com IGF-II. *In vivo*, estudos demonstraram que há aumento da lesão em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (V.) panamensis* pré-incubada com IGF-I, com número maior de parasitas viáveis no sítio da lesão acompanhado de maior infiltrado inflamatório, com proporção maior de parasitos/célula no tecido, mostrando que IGF-I na interação parasito/hospedeiro favorece o crescimento do parasita no interior da célula hospedeira. Além disso, dados *in vitro* mostraram que IGF-I também pode afetar estágios tardios da infecção, por estimular formas amastigotas dentro do macrófago e/ou atingir o vacúolo parasitóforo. No entanto, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não estão claros (GOMES et al., 1997; GOMES et al., 1998; GOTO et al., 1998).

Como o efeito leishmanicida de macrófagos é exercido por óxido nítrico (“nitric oxide” = NO) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e como o efeito de IGF-I, observado na exarcebação da lesão, pode ser por interferência no mecanismo de ação do NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi estudado o seu efeito na interação *L. (L.) amazonensis* e macrófago peritoneal de camundongo *in vitro*. Foi observado que o parasitismo de macrófagos estava aumentado sob efeito de IGF-I. Ao mesmo tempo, a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não apresentava alteração, porém, NO apresentava-

se reduzido em culturas de macrófagos de camundongo BALB/c infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* estimuladas com IGF-I em relação a culturas não estimuladas. Na seqüência, foi observado que o efeito de IGF-I seria na ativação de arginase do parasita e, provavelmente, também do macrófago, com geração de poliaminas que são nutrientes para o parasita e, reciprocamente, com redução da produção de NO (VENDRAME et al., 2007).

Assim, foi observado que IGF-I é um fator que tem efeito no curso da doença leishmaniótica, exercendo um papel modulador da resposta imune, destacando-se, sobretudo, a sua ação direta sobre a leishmânia, diferindo, portanto, dos demais fatores que agem principalmente na célula hospedeira (GOMES et al., 2000). Os estudos sobre IGFs nas leishmanioses são escassos, tanto como elemento inespecífico do hospedeiro, quanto no que se refere à resposta imune específica. Esta se torna mais complexa uma vez que o perfil Th1 e Th2 não é bem definido em infecções por espécies de *Leishmania* como *L. (L.) donovani*, *L. (L.) chagasi* (PINELLI et al, 1994; PINELLI et al, 1999) e *L. (L.) amazonensis* (QI et al, 2004).

A expressão de IGF-I, principalmente por macrófagos, é desencadeada por um conjunto específico de citocinas que levam a um aumento do mesmo durante o processo infeccioso. Wynes e Riches (2003) observaram *in vitro* em macrófagos obtidos da medula óssea de camundongo, que citocinas do perfil Th1, principalmente IFN- $\gamma$ , diminuem a expressão de IGF-I, enquanto que citocinas do perfil Th2, principalmente IL-4 e IL-13, estimulam a expressão de IGF-I.

O entendimento do perfil da expressão de citocinas na leishmaniose visceral canina ainda não está claro. A resposta protetora em cães foi relatada em animais com ausência de sinais clínicos, baixos níveis de anticorpos e carga parasitária reduzida, além de uma resposta linfoproliferativa *in vitro* ou uma resposta tardia contra os antígenos na pele. Estudos prévios descreveram que a ativação de células do perfil Th1 produz IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  (PINELLI et al., 1994; PINELLI et al. 1999). Por outro lado, a doença ativa é caracterizada por uma marcada resposta humoral, uma imunossupressão específica contra o parasita que aparece em animais com sinais clínicos avançados da doença e com alta carga parasitária nos diferentes tecidos (REIS et al., 2006). O perfil de citocinas observado nessas condições é um misto da resposta Th1/Th2 (PINELLI et al., 1999; SANTOS-GOMES et al., 2002, CARRILLO; MORENO, 2009).

Por fim, pesquisas foram desenvolvidas na leishmaniose experimental murina no intuito de desvendar a importância de IGF-I na doença, abrindo portas para uma intervenção terapêutica mais eficiente. Neste contexto, cabe destacar que o cão é considerado um modelo

experimental bastante relevante por desenvolver a doença na sua forma plena, à semelhança da manifestação da doença no homem, portanto, revelando características imunológicas e patológicas importantes para o estudo dos fatores intrínsecos envolvidos no curso da enfermidade (DEPLAZES et al., 1995; HOMMEL et al.,1995; SANTOS-GOMES; CAMPINO; ARRANCHES, 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a participação de IGF-I no desenvolvimento da infecção e na patogenia da LV em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, analisando a sua expressão em pele, fígado, baço e linfonodo poplíteo.

Esta dissertação apresenta a seguinte estrutura formal: resumo, summary seguido de uma introdução englobando revisão de literatura e objetivos; um capítulo contendo artigo completo, intitulado “**Expressão de IGF-I em pele, fígado, baço e linfonodo poplíteo de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi***”, a ser encaminhado para publicação na Veterinary Immunology and Immunopatology, estruturados de acordo com as normas da revista.

## 2 CAPÍTULO I

### EXPRESSÃO DE IGF-I EM PELE, FÍGADO, BAÇO E LINFONODO POPLÍTEO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania (leishmania) chagasi*

Flaviane A. Pinho<sup>1</sup>, Nilton A. Magalhães<sup>1</sup>, Kleverton R. Silva<sup>1</sup>, Fernando L. L. Oliveira<sup>1</sup>, Aline A. Carvalho<sup>1</sup>, Eduardo M. R. Sanchez<sup>2</sup>, Hiro Goto<sup>2</sup>, Francisco A. L. Costa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Setor de Patologia Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Campus Socopo – S/N, Teresina, Piauí, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia, Instituto de Medicina Tropical – USP, 05403-000, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, prédio II, 4º andar, São Paulo, São Paulo, Brasil

Endereço para correspondência:

\*F.A.L. Costa, Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Setor de Patologia Animal. Campus da Socopo S/N, 64.049-550, Teresina-Piauí, Brasil

Tel. +55-86-3215-5760

Fax. +55-86-3215-5753

E-mail: fassisle@gmail.com

#### ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a chronic infectious disease caused by protozoa *Leishmania (Leishmania) chagasi*. The domestic dog is considered the main reservoir of VL. During infection, the insulin-like growth factor-I (IGF-I) plays a role in the modulation of the immune response in the leishmaniasis, particularly acting directly on *Leishmania*. To evaluate the participation of IGF-I in the development of the infection and the pathogenesis of VL, the expression of IGF-I in skin, liver, spleen and lymph nodes was evaluated in six symptomatic dogs naturally infected by *Leishmania chagasi* and six uninfected dogs. The most frequent clinical findings were skin lesions (100%) and lymphadenopathy (66.67%). Laboratory tests revealed normochromic normocytic anemia, increase of glutamic pyruvic transaminase (TGP), hypoalbuminemia and hyperglobulinemia in 80% of infected dogs. The cytological

analysis showed a positive correlation between the parasitism in the skin and popliteal lymph node ( $r = 0.99$ ). The histopathologic analysis of skin showed a diffuse and/or focal infiltrate predominantly lymphohistioplasmocitary. There was correlation between the inflammatory changes present in the ear and ungueal region ( $r = 0.85$ ). In the liver the more severe alteration was fatty changes. There was hypertrophy and hyperplasia of Kupffer cells more intense in the group of infected animals when compared to the control group ( $P = 0.0476$ ). In the spleen, there was depletion of periarteriolar sheath cells and granuloma. In the popliteal lymph node was observed inflammatory infiltrate lymphohistioplasmocitary in the capsule. Hyperplasia of follicles was observed in greater proportions than in the control group ( $P = 0.0274$ ). Moreover, there was depletion of follicles and cells of the paracortical area. The serum levels of IGF-I, in the infected animals were reduced compared to the control group. Analysis of mRNA expression of IGF-I observed in the skin, spleen and liver, revealed higher values in infected dogs when compared to control animals. In contrast, popliteal lymph node in the infected animals showed expression of IGF-I was lower when compared to control animals. In general, the liver of dogs showed a higher mRNA expression of IGF-I when compared to other organs. In animals with a clinical picture more advanced of LV, there was a notable decrease in the expression of IGF-I in skin, spleen and lymph node, except the liver. In conclusion the animals with VL had a higher expression of IGF-I in skin, spleen and liver which suggests that the expression of IGF-I is related to the establishment of leishmanial infection.

Keywords: visceral leishmaniasis, dog, insulin-like growth factor I, skin

## 2.1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença sistêmica, causada pela *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Syn= *L. infantum*) (Maurício et al., 2000) no continente americano, caracterizada por um comprometimento severo de órgãos do sistema fagocítico mononuclear com intensa proliferação de células (Brandonísio et al., 1990).

A LVC tem um grande impacto na saúde pública brasileira porque o cão é o mais importante reservatório de leishmaniose visceral no ambiente urbano e periurbano (Reithinger e Davies, 1999; Palatnik-de-Sousa et al., 2001), por ser altamente susceptível à infecção, por apresentar intenso parasitismo cutâneo e, também, pelo seu convívio junto ao homem (Dantas-Torres e Brandão-Filho, 2006).

A LVC é uma doença infecciosa grave que, quando clinicamente manifesta, é fatal para o cão (Silva, 2007) e quando não tratada traz conseqüências sérias para o homem (Gontijo e Melo, 2004). O controle ou a progressão da doença envolve fatores específicos e inespecíficos da resposta imune do hospedeiro e a capacidade de evasão do parasita. O fator de crescimento insulina-símile I (IGF-I) corresponde a um dos primeiros fatores encontrados pelas formas promastigotas de leishmânia na pele do hospedeiro e, possivelmente, pelas formas amastigotas, após a internalização por macrófagos (Goto et al., 1998).

O IGF-I tem se mostrado relevante por induzir *in vitro* um aumento na proliferação de formas promastigotas de *Leishmania L. (L.) mexicana*, *L. (V.) panamensis*, *L. (L.) amazonensis* e em formas amastigotas axênicas de *L. (L.) mexicana*, induzindo a fosforilação de moléculas intracelulares. *In vivo*, estudos demonstraram que há aumento da lesão em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (V.) panamensis* pré-ativada com IGF-I, com número maior de parasitas viáveis no sítio da lesão acompanhado de maior infiltrado inflamatório, com proporção maior de parasitos/célula no tecido, mostrando que IGF-I na interação parasito/hospedeiro favorece o crescimento do parasita no interior da célula hospedeira. Além disso, IGF-I também pode afetar estágios tardios da infecção, por estimular formas amastigotas dentro do macrófago e/ou atingir o vacúolo parasitóforo. No entanto, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não estão claros (Gomes et al., 1997; Gomes et al., 1998; Goto et al., 1998).

Como o efeito leishmanicida de macrófagos é exercido por óxido nítrico (“nitric oxide” = NO) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e como o efeito de IGF-I, observado na exarcebação da lesão, pode ser por interferência no mecanismo de ação do NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi estudado o seu efeito na interação *L. (L.) amazonensis* e macrófago peritoneal de camundongo *in vitro*. Foi observado que o parasitismo de macrófagos estava aumentado sob efeito de IGF-I. Ao mesmo tempo, a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não apresentava alteração, porém, NO apresentava-se reduzido em culturas de macrófagos de camundongo BALB/c infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* estimuladas com IGF-I em relação a culturas não estimuladas. Na seqüência, foi observado que o efeito de IGF-I seria na ativação de arginase do parasita e, provavelmente, também do macrófago, com geração de poliaminas que são nutrientes para o parasita e, reciprocamente, com redução a produção de NO (Vendrame et al., 2007).

Assim, IGF-I é um fator que tem efeito no curso da doença leishmaniótica exercendo um papel modulador da resposta imune, destacando-se, sobretudo, a sua ação direta sobre a leishmânia, diferindo, portanto, dos demais fatores que agem principalmente na célula hospedeira (Gomes et al., 2000). Os estudos sobre IGF-I nas leishmanioses são escassos,

tanto como elemento inespecífico do hospedeiro, quanto no que se refere à sua participação na resposta imune específica. Esta se torna mais complexa uma vez que o perfil Th1 e Th2 não é bem definido em infecções por espécies de *Leishmania* como *L. (L.) donovani*, *L. (L.) chagasi* (Pinelli et al., 1994; Pinelli et al., 1999) e *L. (L.) amazonensis* (Qi et al., 2004).

Por fim, pesquisas foram desenvolvidas na leishmaniose experimental murina no intuito de desvendar a importância de IGF-I na doença, abrindo portas para uma intervenção terapêutica mais eficiente no combate à infecção leishmaniótica. Neste contexto, cabe destacar que o cão é considerado um modelo experimental bastante relevante por desenvolver a doença na sua forma plena, à semelhança da manifestação da doença no homem, portanto, revelando características imunológicas e patológicas importantes para o estudo dos fatores intrínsecos envolvidos no curso da enfermidade (Deplazes et al., 1995; Hommel et al., 1995; Santos-Gomes et al., 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a participação de IGF-I no desenvolvimento da infecção e na patogenia da LV em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, analisando a sua expressão em pele, fígado, baço e linfonodo poplíteo.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram incluídos neste estudo 12 cães provenientes de área endêmica para LV da cidade de Teresina-Piauí, recolhidos pela Gerência de Zoonoses. Cães adultos, machos e fêmeas, de idade desconhecida foram examinados aleatoriamente para leishmaniose em levantamento epidemiológico realizado pela Gerência de Zoonoses, com base na detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, pelos métodos de ELISA (Ensaio imunoenzimático) e/ou imunofluorescência indireta (IFI). Como teste padrão para confirmação da doença realizou-se exame direto para detecção de *Leishmania*, por meio de esfregaços, corados com Giemsa, de medula óssea esternal, aspirado de linfonodo poplíteo e/ou sangue periférico de orelha. Os animais foram divididos em dois grupos: seis cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* com manifestações clínicas da doença e seis animais controles não infectados.

Os animais foram examinados quanto aos parâmetros clínicos conforme ficha de avaliação anexa (apêndice 1). Foi realizado exame hematimétrico do sangue de todos os animais, utilizando-se técnica automatizada em equipamento VetABC, além da contagem diferencial de leucócitos em esfregaço sanguíneo. Com o uso do “kit” LABTEST (Labteste

Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil) foram avaliadas as concentrações de creatinina (catálogo nº 35) e uréia (catálogo nº 27) no sangue.

Foram realizadas dosagens bioquímicas no soro utilizando kits do LABTEST (Labteste Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil): AST/TGO (catálogo nº 109), ALT/TGP (catálogo nº 198), albumina (catálogo nº 19), proteínas totais (catálogo nº 99) e fosfatase alcalina (catálogo nº 40). Os níveis séricos de IGF-I foram avaliados pelo Laboratório de Hormônios do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por ensaio quimioluminescente IGF-I Immulite 2000 (DPC – Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA).

Após o exame clínico, os cães foram eutanasiados com overdose de tiopental sódico (33%, da dose de 5 ml/kg, IV). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o guia brasileiro de cuidados e uso de animais de laboratório (Projeto número 3.964/97 - <http://www.planalto.gov.br>). Todos os protocolos experimentais foram previamente analisados e aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Piauí. Os animais controles não infectados foram doados pela Gerência de Zoonoses de Teresina-PI, os quais pertenciam ao grupo de animais errantes capturados para o controle da raiva urbana.

Logo após a eutanásia, os animais foram submetidos à necropsia completa e coletados fragmentos de pele da região da orelha e ungueal anterior, fígado, baço e linfonodo poplíteo. *Imprints* dos órgãos em lâminas foram realizados, fixados com álcool metílico, corados com Giemsa (Mikel, 1994) e examinados em microscópio de luz para a identificação de amastigotas. A contagem de parasitos foi feita em 50 campos aleatórios com objetiva de 100x.

Os fragmentos de pele, fígado, baço e linfonodo poplíteo foram fixados em formol tamponado com fosfato 0,01M pH 7,4 para análise histopatológica. Os tecidos fixados foram processados por técnica de rotina, cortados a 5 µm, corados por H-E (Luna, 1968) e analisados em microscópio de luz para classificação das lesões e detecção de amastigotas.

Os resultados da análise histopatológica foram analisados de forma quantitativa e semi-quantitativa, mensurando-se a localização, distribuição e intensidade da lesão, numa escala de 0 a 5 onde 0 = normal, 1 = mínima ou duvidosa; 2 = média; 3 = moderada; 4 = moderadamente severa; 5 = severa.

Para quantificação de mRNA de IGF-I, pesou-se 30 mg de pele, fígado, baço e linfonodo poplíteo colocando-os em criotubos com meio RPMI com glicerol a 10% em nitrogênio líquido até seu processamento no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - USP.

A extração do RNA total de fígado, baço e linfonodo poplíteo foi realizada com reagente Trizol (Invitrogen, Estados Unidos) e da pele foi realizado com o kit Rneasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, Alemanha), seguindo instruções do fabricante. O RNA total purificado foi estocado à -80 °C em água tratada com dietilpírocarbonato (DEPC) até o momento de uso.

A concentração, integridade e pureza do RNA total extraído das amostras foram verificadas por meio do espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 - Estados Unidos). Adotou-se como valor ideal de pureza e integridade do RNA, uma razão de 1.7 a 2.1 entre as absorvâncias de 260 e 280 nanômetros (nm). Todas as amostras foram normalizadas a uma concentração de 70 ng/μL.

A transcrição reversa (RT-PCR) para a síntese do cDNA a partir do mRNA foi realizada nas seguintes condições: 4 μL das amostras de RNA total foram misturados com *mix* 1 contendo: random primers e oligoDT (12 – 18) (Invitrogen, Estados Unidos), e submetidas inicialmente a dois ciclos: (1) 75 °C durante 5 minutos e (2) 25 °C por 5 minutos em termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf (Alemanha). Após os ciclos, acrescentou-se em cada uma das amostras *mix* 2 contendo: 4,0 μL 5X First Strand Buffer (Invitrogen, Estados Unidos); 2 μL de dNTP's *mix* 10 mM (Invitrogen, Estados Unidos); 1 μL M-MLV Reverse Transcriptase 200 U/μL (Invitrogen, Estados Unidos); 1 μL Ribolock™ Rnase Inhibitor 40 u/μL (Fermentas, União Européia) e 2 μL de dithiothreitol (DTT) (Invitrogen, Estados Unidos), após adição do *mix* 2 as amostras foram submetidas a dois novos ciclos no termociclador: (1) 37 °C durante 50 minutos e (2) 70 °C por 15 minutos e foram estocadas à -20 °C após o término dos ciclos da reação. Depois as concentrações de cDNA foram analisadas e normalizadas à uma concentração de 1000 ng/μL.

Para determinação da expressão do mRNA de IGF-I utilizou-se a técnica de PCR em tempo real. Otimizou-se a reação em um volume final de 25 μL nas seguintes condições: 2 μL de cDNA, 10 μL de Sybr Green (2x) (Applied Biosystems), primer a 150 nM e 11,5 μL de água ultra-pura estéril. A reação foi submetida à amplificação em termociclador Applied Biosystem StepOne Real Time PCR System aos seguintes ciclos: 95° por 10 minutos; 95°C por 15 segundos; 61°C por 1 minuto, 70°C por 1 minutos, submetidos a 44 ciclos.

Foram utilizados iniciadores (*primers*) de amplificação para detecção de IGF-I e o gene da β-actina, sendo que este foi usado como gene constitutivo para a quantificação relativa do gene específico (IGF-I). As seqüências foram: IGF-I Forward: 5' GGG TTC TAC TTC AAC AAG CCC ACA, 3'Reward: 5'GGG GTG CAC AGT ACA TCT CTA GCC 3', β-

actina Forward: 5'CGT GAC ATC AAG GAA GAA GCT CTG 3' e Reward: 5'CGG GTA GTT CGT AGC TCT TCT CCA 3', construídos a partir de seqüências do RNA mensageiro de cães para esses genes, obtidas da página WEB do NCBI (gene bank), com números de acesso L08254, AF021873, respectivamente. O produto da amplificação de IGF-I é de 127 pb e  $\beta$ -actina 103 pb.

No desenho dos *primers* supradescritos foram utilizadas ferramentas *online* disponibilizadas nos *sites* “Primer 3” (<http://frodo.wi.mit.edu>) e “Sci Tools” do *site* “IDTDNA” (<http://www.idtdna.com/Scitools>).

Os valores de expressão gênica de IGF-I foram normalizados pela expressão do gene constitutivo,  $\beta$ -actina. A expressão relativa de IGF-I na pele, baço, fígado e linfonodo poplíteo nos grupos dos animais infectados e controle foi quantificada pela seguinte equação (PFAFFL et al., 2001):

$$\text{Razão} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{C_{\text{alvo}}}}{(E_{\text{ref}})^{C_{\text{ref}}}}$$

$E_{\text{alvo}}$ : é a eficiência do transcrito do gene alvo

$E_{\text{ref}}$ : é a eficiência do transcrito gene referência

$C_{\text{alvo}}$  é valor Ct (cycle treshold)

$C_{\text{ref}}$  é valor de Ct

Nas análises dos dados comparativos foram utilizados fundamentalmente testes estatísticos não paramétricos pela natureza dos dados (Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis a depender do número de grupos) e também foi utilizado teste não paramétrico na análise da correlação (Spearman).

## 2.3 RESULTADOS

Os achados clínicos encontrados no grupo dos animais infectados foram: lesões na pele (100%), linfadenopatia (66,67%); onicogribose (50%); emagrecimento (33,33%); coriza (33,33%); conjuntivite (16,67%); apatia (16,67%); febre (16,67%); mucosas pálidas (16,67%) e diarreia (16,67%) (Figura 1).

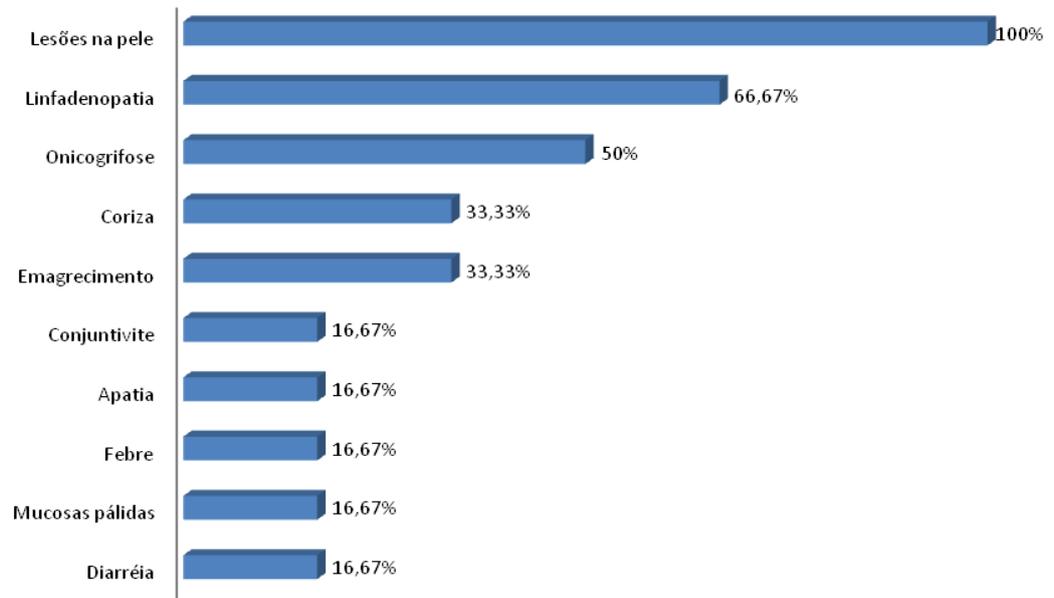


Figura 1. Ocorrência de sinais clínicos de leishmaniose visceral no grupo de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*.

Após a triagem clínica, utilizou-se o exame parasitológico como padrão-ouro para o diagnóstico de LV, sendo positivos os seis animais utilizados no grupo dos cães infectados. Os testes de IFI e ELISA, realizados neste grupo de animais, revelaram apenas dois (33,33%) e cinco animais soropositivos (83,33%), respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1- Resultados dos testes sorológicos (ELISA e RIFI), parasitológico (exame direto de medula óssea esternal e/ou aspirado de linfonodo poplíteo) e número de sinais clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* e de cães controle não infectados.

GRUPO	CÃO	NÚMERO DE SINAIS			
		CLÍNICOS	ELISA	RIFI	PARASITOLÓGICO
Cães controle não infectados	1	0	N	N	N
	2	0	N	N	N
	3	0	N	N	N
	4	0	N	N	N
	5	0	N	N	N
	6	0	N	N	N
Cães infectados	7	1	P	N	P
	8	3	N	N	P
	9	4	P	P	P
	10	4	P	N	P
	11	6	P	N	P
	12	8	P	P	P

RIFI: valores de títulos  $\geq 1:40$  considerados positivos

ELISA: valores de títulos igual 1:100 considerados positivos

N=negativo; P=positivo

As alterações hematológicas encontradas em cinco animais infectados foram: anemia normocítica normocrômica em quatro (80%) animais, leucopenia em três (60%), eosinopenia absoluta e relativa em um (20%), eosinofilia em um (20%), neutrofilia relativa em três (60%), linfopenia em quatro (80%), monocitose em três (60%) e trombocitopenia em três (60%) animais (Tabela 2).

A análise das dosagens bioquímicas de cinco animais infectados revelou aumento de fosfatase alcalina em um (20%) animal, de TGO em três (60%), TGP em cinco (100%), hipoalbuminemia em quatro (80%), aumento de proteínas totais em quatro (80%), hiperglobulinemia em quatro (80%), diminuição de fosfatase alcalina em um (20%) (Tabela 2).

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais controles não infectados estavam dentro da normalidade.

Tabela 2. Alterações hematológicas e bioquímicas de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*

Exames laboratoriais	Parâmetros alterados	Animais com parâmetros alterados
Hematológico	Leucopenia	3(60%)
	Eosinofilia	1(20%)
	Linfopenia	4(80%)
	Anemia normocítica normocrômica	4(80%)
	Trombocitopenia	2(40%)
	Monocitose	3(60%)
	Eosinopenia	1(20%)
	Neutrofilia	3(60%)
Bioquímico	Aumento de fosfatase alcalina	1(20%)
	Diminuição de fosfatase alcalina	1(20%)
	Aumento de TGO	3(60%)
	Aumento de TGP	5(100%)
	Hipoalbuminemia	4(80%)
	Aumento de proteínas totais	4(80%)
	Hiperglobulinemia	4(80%)

Na análise citológica de pele, fígado, baço e linfonodo poplíteo foram encontradas leishmânias com maior frequência na orelha (4/6) (Figura 2) e no linfonodo poplíteo (3/6) e com menor frequência na região ungueal, fígado e baço (1/6) (Tabela 3). Além disso, observou-se uma correlação positiva entre o parasitismo no linfonodo e pele ( $r=0.99$ ) (Figura 3).

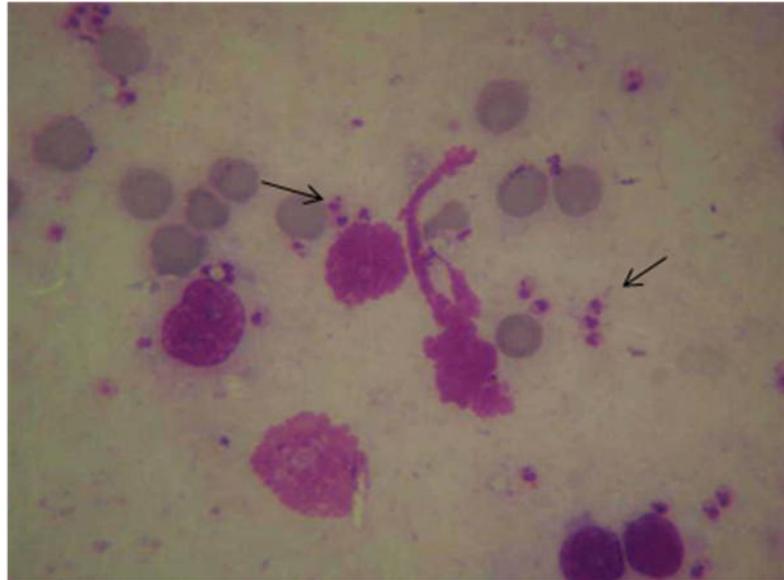


Figura 2. *Imprint* de orelha de cão naturalmente infectado por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Presença de formas amastigotas (setas) de *Leishmania*. Coloração: Giemsa. Aumento: 100x.

Tabela 3. Frequência na detecção de leishmânia em "imprint" de órgãos de seis cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*

Órgão	Número de animais
Orelha	4 (66,67%)
Ungueal	1 (16,67%)
Fígado	1 (16,67%)
Baço	1 (16,67%)
Poplíteo	3 (50%)

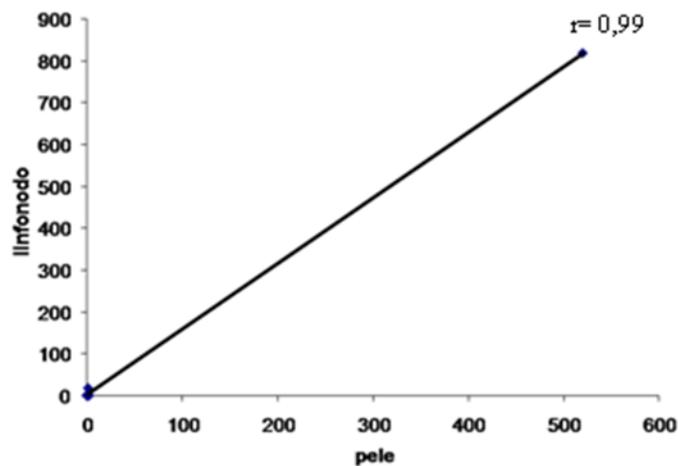


Figura 3. Correlação entre o número de parasitas na orelha e linfonodo poplíteo de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Analisados 50 campos aleatórios em objetivo de 100 x.  $p = 0,0001$  (teste de Sperman).

Na análise histopatológica de pele (orelha e região ungueal anterior) dos cães infectados foram observados infiltrado inflamatório difuso e/ou focal predominantemente linfohistioplasmocitário (Figura 4), variando de intensidade mínima a severa, mas em alguns casos, em menor intensidade, havia neutrófilos, eosinófilos, plasmócitos e fibroblastos. O infiltrado localizava-se na região periglandular, perifolicular e perivascular. Havia presença de glândulas sudoríparas dilatadas, paraceratose, dilatação do bulbo folicular, edema de células epiteliais, vasculite e presença de granulomas na região sub-epidérmica. Vale ressaltar que em um caso havia predominância de neutrófilos quando o infiltrado apresentava-se difuso e severo. Observou-se que os animais com mais de quatro sinais clínicos apresentavam maior carga parasitária (Figura 5) e lesões mais severas que os animais com menos sinais clínicos. Havia correlação entre as alterações inflamatórias presentes na orelha e região ungueal (Figura 6).

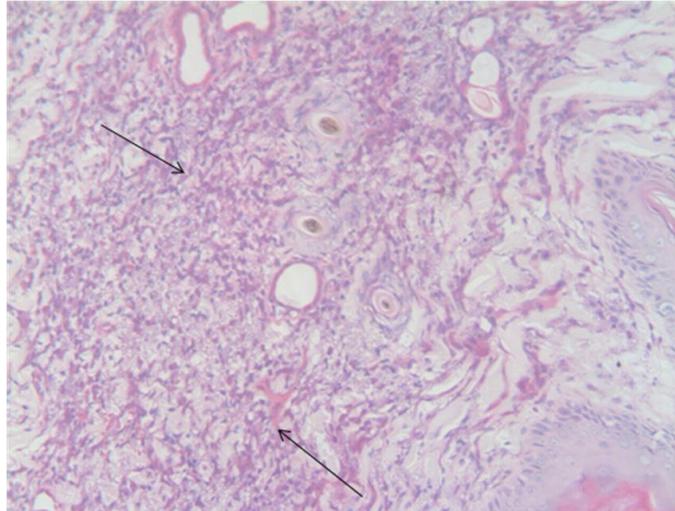


Figura 4. Pele da orelha de cão naturalmente infectado por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Infiltrado inflamatório. Coloração: H-E. Aumento: 20x.

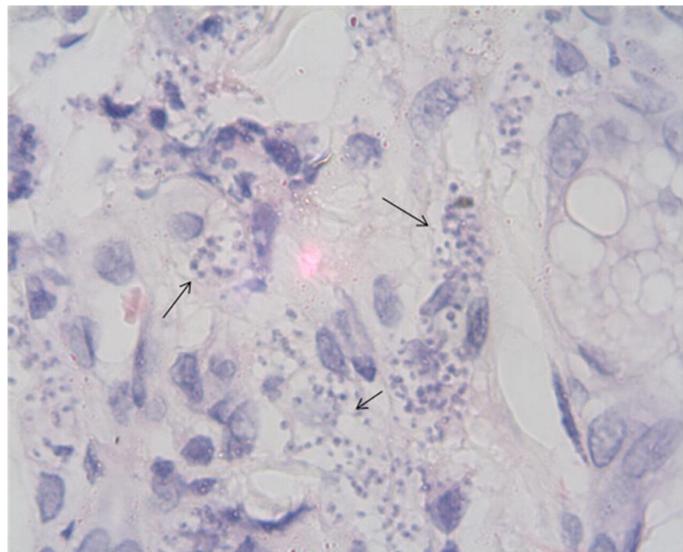


Figura 5. Pele da orelha de cão naturalmente infectado por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Presença de formas amastigotas de *Leishmania*(setas). Coloração: H-E. Aumento: 100x.

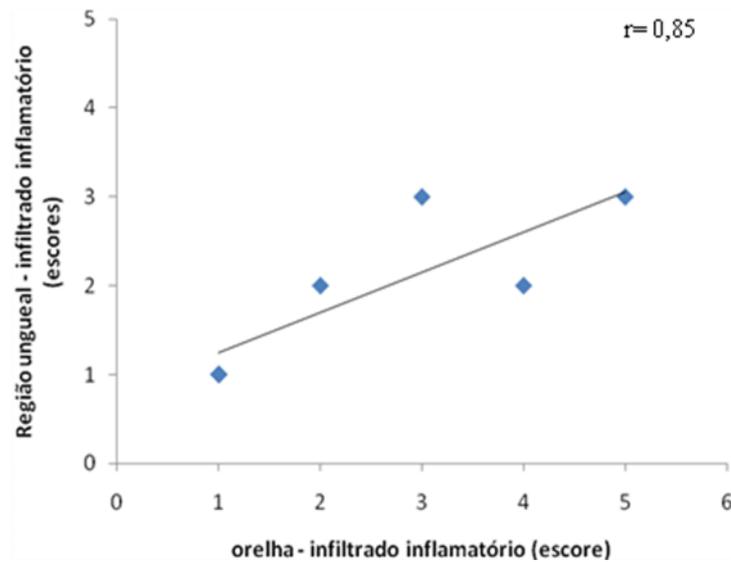


Figura 6. Correlação entre o infiltrado inflamatório na orelha e região ungueal de seis cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*.  $p=0,033$  (Teste de Spearman).

No fígado as alterações histopatológicas caracterizaram-se por um agrupamento de células mononucleares de localização periportal, na zona 3 do lóbulo hepático de Rappaport e intralobular, de intensidade média a moderada, traduzidas como granulomas (Figura 7). Havia hipertrofia e hiperplasia de células de Kupffer em intensidade maior no grupo de animais infectados quando comparados ao grupo controle ( $p = 0,0476$  teste de Mann-Whitney) (Figura 8). Metamorfose gordurosa foi a alteração que apresentou maior grau de severidade (Figura 9). Observou-se, ainda, infiltrado inflamatório linfocitoplasmocitário no espaço porta e na zona 3 do lóbulo hepático de Rappaport, bem como infiltrado inflamatório subcapsular de intensidade mínima e congestão dos sinusóides de intensidade média a moderada.

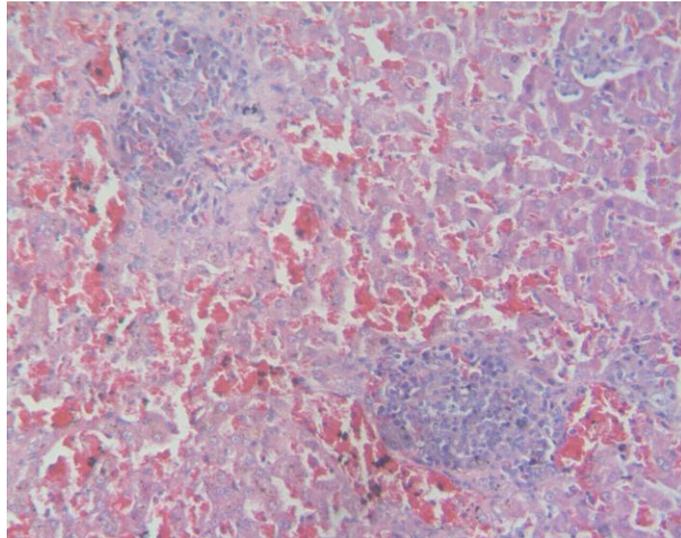


Figura 7. Fígado de cão naturalmente infectado por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Granuloma. Coloração: H-E. Aumento: 40x.

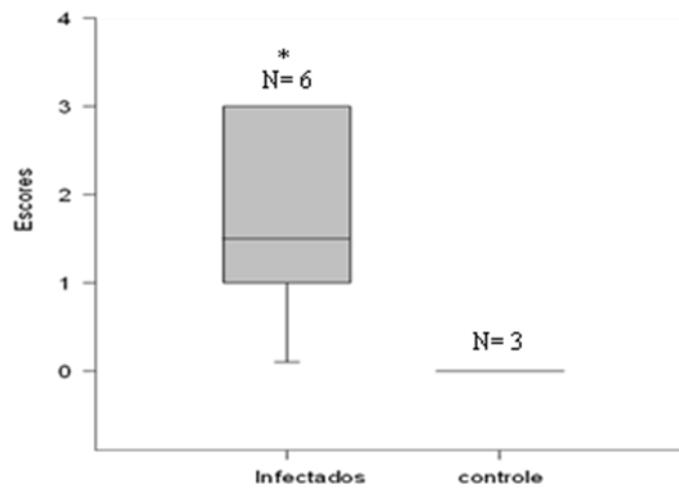


Figura 8. Análise semi-quantitativa da intensidade de hiperplasia e hipertrofia de células de Kupffer (mediana de escores e intervalo entre percentis 25 e 75) em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* e cães controle não infectados. \*P = 0.0476 (teste de Mann-Whitney).

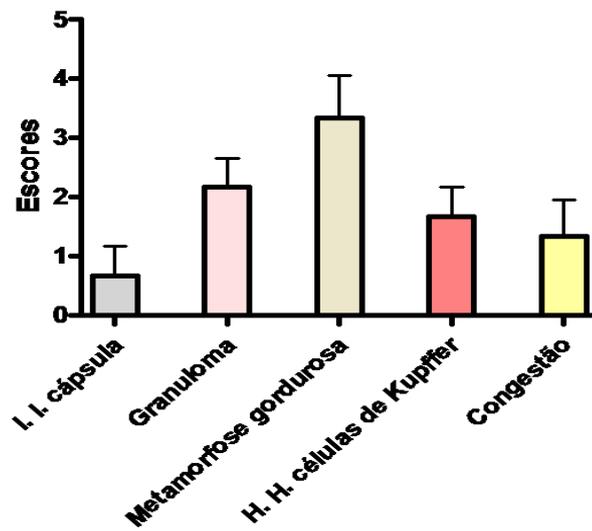


Figura 9. Alterações histopatológicas observadas em fígado de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Escores adotados para avaliação da intensidade das lesões: 0 = normal; 1= mínimo; 2= médio; 3= moderado; 4= moderadamente severo; 5= severo.

No baço, foi encontrado infiltrado inflamatório na cápsula de intensidade mínima a severa (Figura 10). Observou-se depleção de folículos com grau de intensidade moderada a severa, depleção de células da bainha periarteriolar e granulomas em intensidade moderada. Congestão da polpa vermelha foi bastante freqüente e a intensidade, em muitos casos, era severa (Figura 11). Constatou-se, ainda, a presença de megacariócitos. 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.

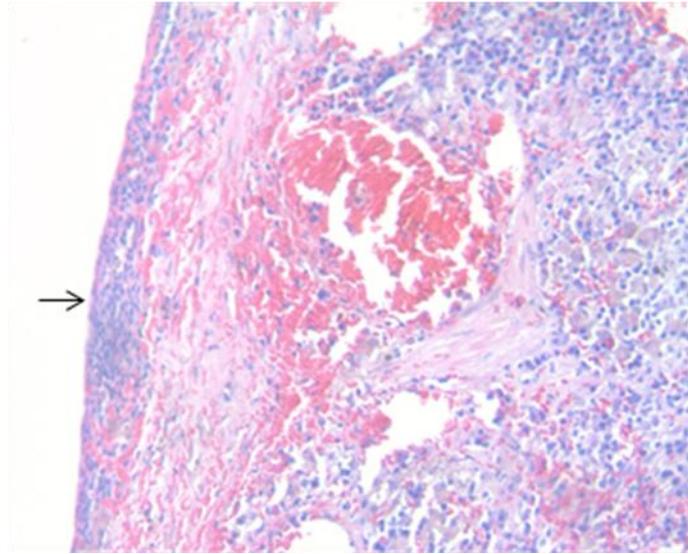


Figura 10. Baço de cão naturalmente infectado por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Infiltrado inflamatório na cápsula. Coloração: H-E. Aumento: 40x.

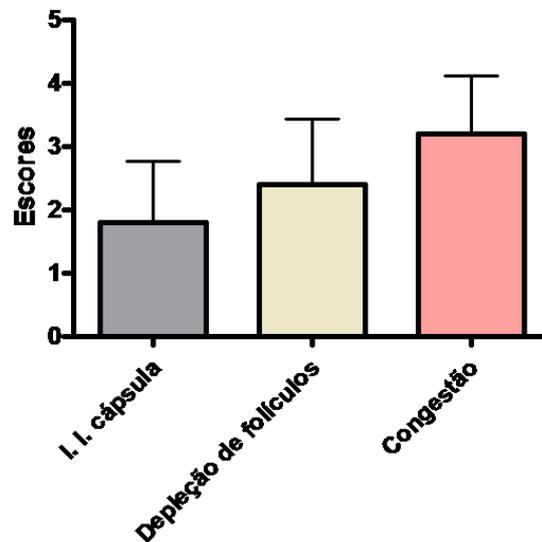


Figura 11. Alterações histopatológicas observadas em baço de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Escores adotados para avaliação da intensidade das lesões: 0 = normal; 1= mínimo; 2= médio; 3= moderado; 4= moderadamente severo; 5= severo.

No linfonodo poplíteo observou-se infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário na cápsula, na maioria dos casos, mas havia, também, a presença de neutrófilos em menor quantidade. Em quatro animais infectados havia hiperplasia de folículos em intensidade maior do que no grupo controle (Figura 12). Foi observado em apenas dois animais infectados depleção de folículos em intensidade moderada. Em cinco cães infectados foi observado depleção de células da região paracortical (Figura 13) em intensidade média a moderadamente severa. Além disso, observou-se infiltrado inflamatório no seio medular de intensidade média a moderada constituído por linfócitos, macrófagos, plasmócitos e neutrófilos (Figura 14). Congestão nos seios medulares foi observada em apenas um caso em intensidade moderada.

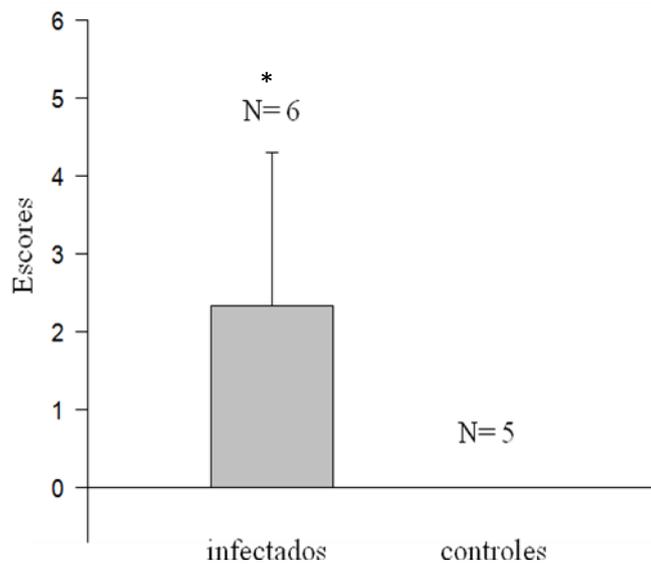


Figura 12. Análise semi-quantitativa da intensidade de hiperplasia de folículos em linfonodo poplíteo de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* e cães controle não infectados. \*P=0.0274 (Teste t).

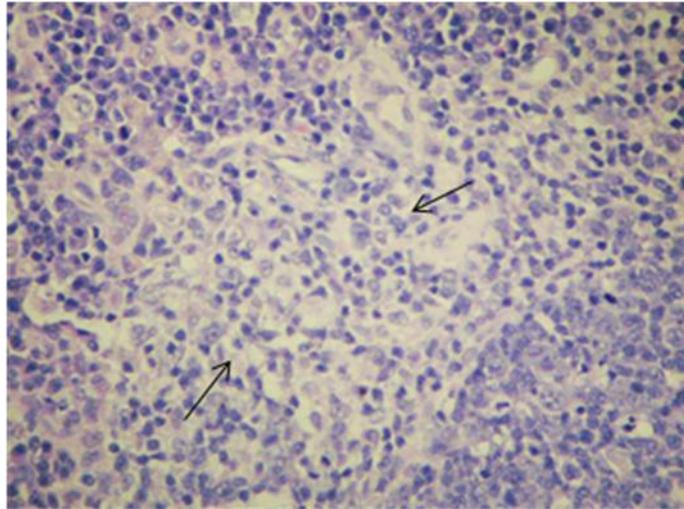


Figura 13. Linfonodo poplíteo de cão naturalmente infectado por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Depleção de células da região paracortical. Coloração: H-E. Aumento: 40x.

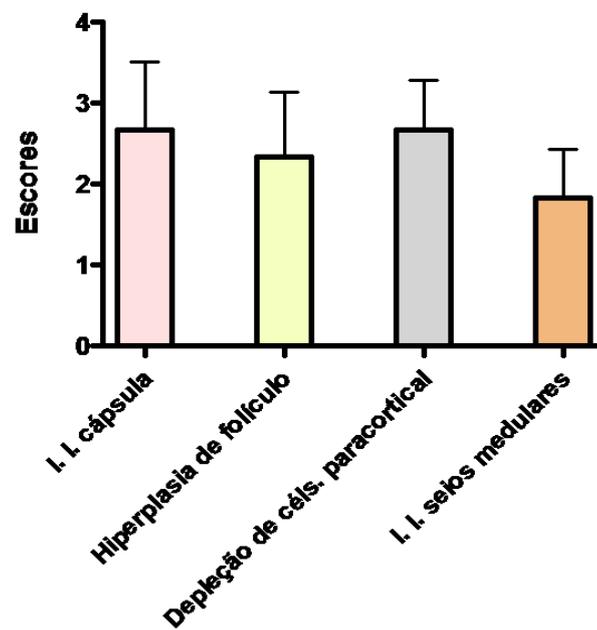


Figura 14. Alterações histopatológicas observadas em linfonodo poplíteo de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Escores adotados para avaliação da intensidade das lesões: 0 = normal; 1= mínimo; 2= médio; 3= moderado; 4= moderadamente severo; 5= severo.

Ao analisar os níveis séricos de IGF-I, observou-se que os animais infectados apresentavam níveis diminuídos quando comparado ao grupo controle (Figura 15), mas sem diferença significativa.

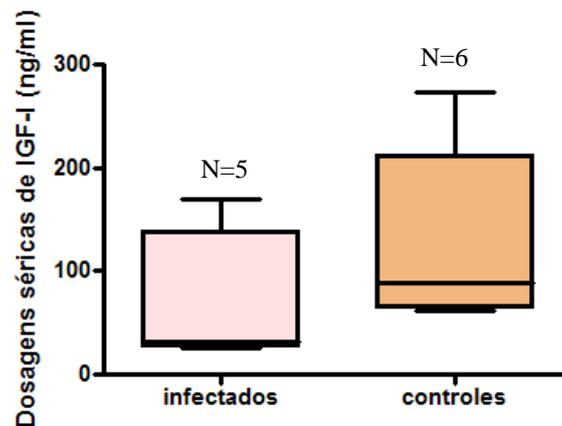


Figura 15. Dosagens séricas de IGF-I em cinco cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* e cães controles não infectados. Ensaio quimioluminescente IGF-I Immulite 2000 (DPC – Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). P = (Teste Mann-Whitney).

A análise da expressão de mRNA de IGF-I por PCR em tempo real permitiu observar que tanto em pele (orelha e região ungueal anterior) quanto em baço e fígado, ocorreram expressão maior de IGF-I nos cães infectados quando comparados aos animais controles. Em contrapartida, em linfonodo poplíteo os animais infectados apresentaram expressão de IGF-I menor quando comparados aos animais controles. De um modo geral, fígado de cães apresentava uma maior expressão de mRNA de IGF-I quando comparados aos demais órgãos (Figura 16).

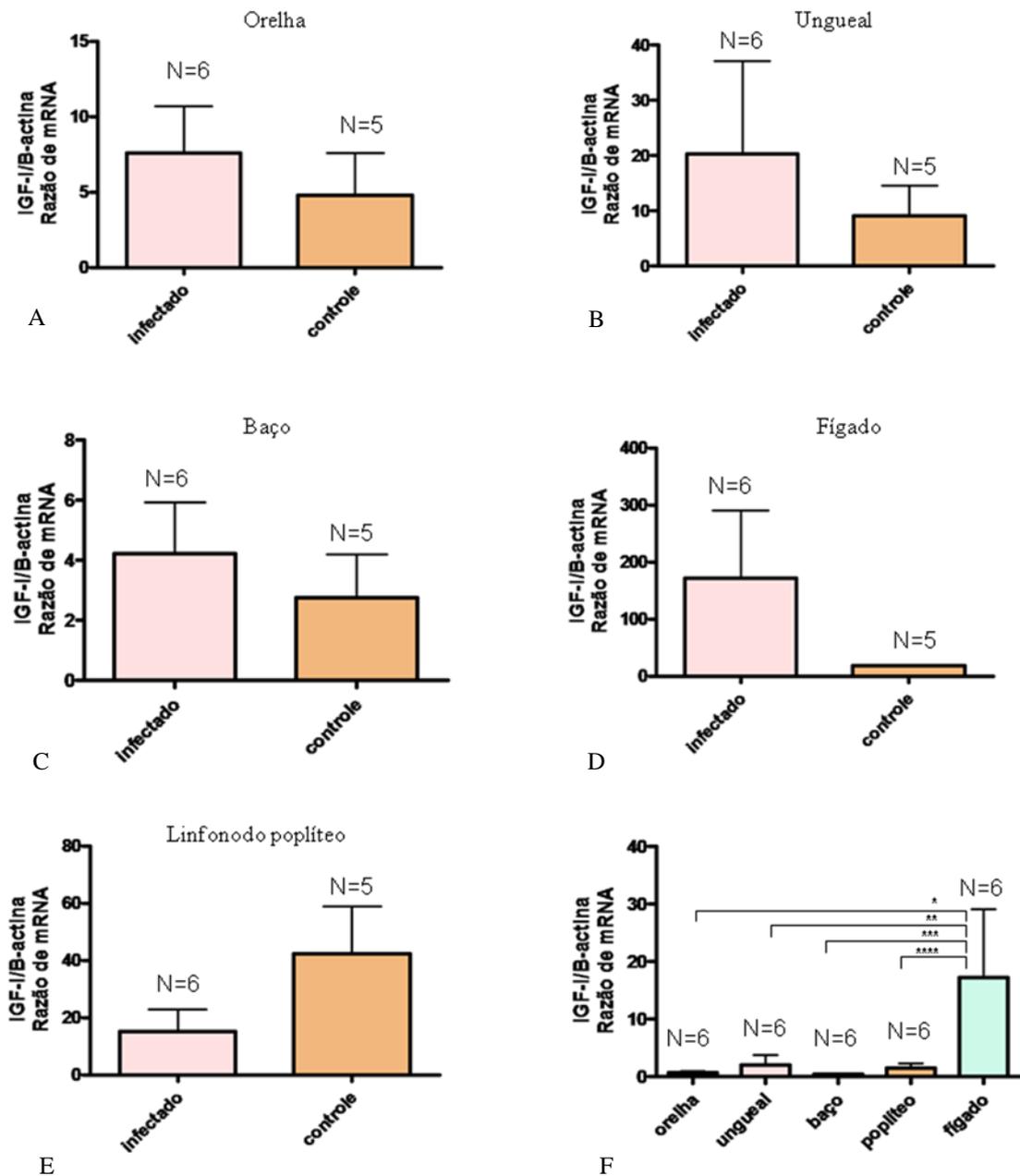


Figura 16. Análise quantitativa da expressão de mRNA de IGF-I em pele (orelha e região ungueal anterior), baço, fígado e linfonodo poplíteo em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* e cães controles não infectados (A-E). Análise quantitativa da expressão de mRNA de IGF-I em pele, fígado, baço e linfonodo poplíteo de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. \*P=0.0277 (Teste de Dunn's) (F).

Ao se analisar a expressão de mRNA de IGF-I nos diferentes órgãos de cães infectados de forma isolada, observou-se que os cães com apenas um sinal clínico e aqueles com três sinais clínicos apresentaram um padrão de expressão semelhante, mas com um ligeiro aumento em fígado e região ungueal no animal com três sinais clínicos. Já nos animais com quatro sinais clínicos, mesmo havendo um decréscimo de expressão de mRNA de IGF-I no fígado, quando comparado aos cães com menos sinais clínicos, observou-se um aumento nos demais órgãos, com um padrão de expressão semelhante. Já nos animais com um quadro clínico mais avançado para LV, observou-se uma notável queda na expressão de IGF-I em pele, baço e linfonodo, exceto no fígado (Figura 17).

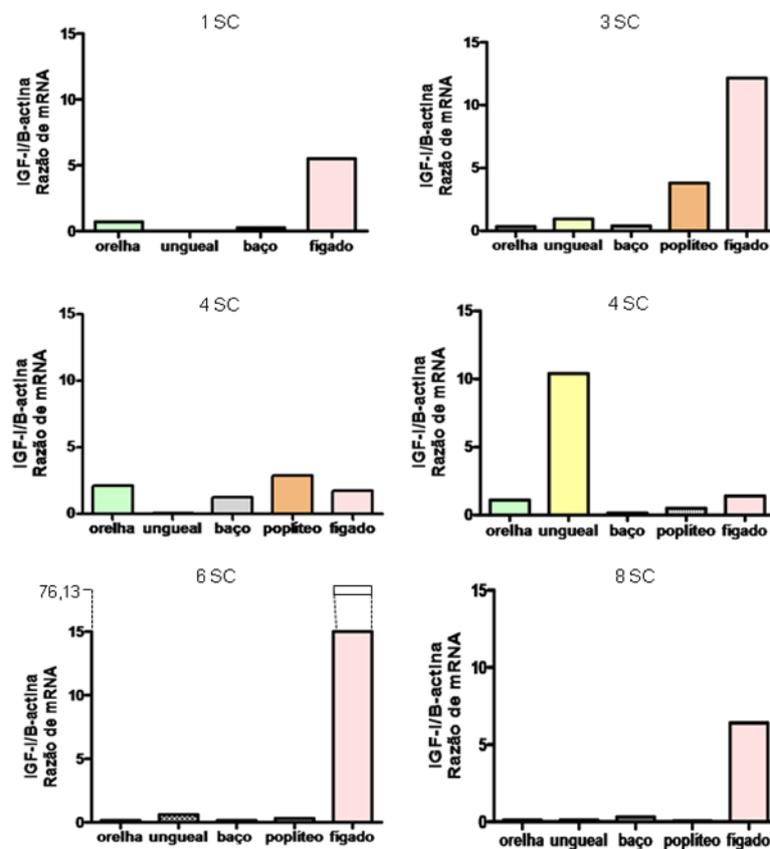


Figura 17. Expressão de mRNA de IGF-I em pele (orelha e região ungueal), baço, fígado e linfonodo poplíteo de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* segundo a intensidade de sinais clínicos apresentados. SC= sinais clínicos.

De um modo geral, ao compararmos os parâmetros clínicos, laboratoriais e histopatológicos, com a expressão de IGF-I em pele, o local de primeiro contato do parasita com o organismo do hospedeiro, observou-se que não houve correlação entre os mesmos.

Mas, cabe destacar que os cães infectados com maior número de amastigotas (cães 4, 5 e 6) apresentavam maior número de sinais clínicos e infiltrado inflamatório mais severo, e, à exceção do animal 4, uma menor expressão de IGF-I (Tabela 4).

Tabela 4. Exame hematológico, bioquímico, citológico, histopatológico e PCR em tempo real de cães com LV

Animais infectados	Sinais clínicos (n°)	Hematológico Leucócitos totais*	Albumina*	Bioquímico Globulina*	TGO*	TGP*	Quantificação de <i>Leishmania</i> (Citologia)	Infiltrado inflamatório (orelha)	Expressão IGF-I
1	1	4,8	2,31	6,31	48	49	0	+	7,30
2	3	5,9	-	-	-	-	0	+	3,70
3	4	10,2	2	7	13	53	1	++	21,00
4	4	13,7	2	5,6	190	95	2	++++	11,10
5	6	-	1,67	4,63	95	70	520	+++++	1,40
6	8	7,1	1,69	8,31	19	43	1	+++	1,20

\*Valores normais tabela em anexo

Citologia= número de amastigotas de *Leishmania* contadas em 50 campos aleatórios

Intensidade do infiltrado inflamatório (escores) 0= normal; + = mínimo; ++ = médio; +++ = moderado; ++++ = moderadamente severo; +++++ = severo

Expressão de IGF-I: razão mRNA de IGF/mRNA de  $\beta$ -actina

## 2.4 DISCUSSÃO

Muitos estudos realizados sobre leishmanioses são direcionados para o entendimento dos processos imunológicos que envolvem a resposta específica e inespecífica, em modelos murinos. No entanto, poucas pesquisas abordam a interação entre os fatores intrínsecos do hospedeiro e o parasita na infecção natural. Assim, a avaliação dos fatores relacionados ao curso da doença no cão naturalmente infectado assume grande importância, pois o cão desenvolve a infecção em sua forma plena, semelhante ao que acontece com o homem.

Para melhor compreender o papel da imunidade humoral e celular, recentemente estudos buscaram relacionar a resposta imune sistêmica à resposta imune compartimentalizada, pois o entendimento desses eventos em conjunto podem esclarecer, de forma mais concreta, quais são os fatores determinantes na cura ou progressão da infecção leishmaniótica. Desse modo, levando-se em consideração a importância de fatores de crescimento nas leishmanioses murina, nosso trabalho buscou analisar a relação entre os níveis de IGF-I sistêmico e compartimentalizado em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na tentativa de entender melhor o que esse fator pode estar contribuindo para o desenvolvimento da doença.

Dos seis animais infectados, as manifestações clínicas mais frequentes foram lesões de pele e linfadenopatia. Estes resultados estão de acordo com relatos de muitos autores (Costa-Val et al., 2007; Ribeiro, 2007; Reis et al., 2006; Baneth, 2006; Alvar et al., 2004; Amusatequi et al., 2003), muito embora outros estudos apontem para uma linfadenopatia generalizada (Amusatequi et al., 2003; Ribeiro, 2007; Costa-Val et al., 2007; Alvar et al., 2004), diferindo, assim, dos nossos resultados, em que foi observado, na maioria dos casos, uma linfadenopatia limitada ao linfonodo poplíteo.

Considerando as formas clínicas da LVC, foi possível definir diversos biomarcadores estreitamente relacionados com os resultados parasitológico, bioquímico e hematológico, como já foi observado em outros estudos (Reis et al., 2009). Dentre eles destacaram-se o aumento nos níveis de TGP, aumento de proteínas totais sérico e anemia normocítica normocrômica. As alterações bioquímicas, provavelmente, estão ligadas a lesões em órgãos alvo como o fígado, a uma resposta imune humoral policlonal, que leva a um aumento dos níveis de proteínas no soro (Marzochi et al., 1985; Reis et al., 2006), caracterizadas por hiperglobulinemia e hipoalbuminemia (Cardoso e Cabral, 1998; Almeida et al., 2005; Strauss-Ayali et al., 2007). As alterações hematológicas estão associadas com aspectos clínicos severos da LVC que afetam órgãos hematopoieticos importantes como a medula óssea levando não somente a anemia, mas, também, a leucopenia decorrente de linfopenia, eosinopenia e monocitopenia (Reis et al., 2006), as mesmas alterações encontradas nos animais infectados neste estudo.

Avaliando as lesões histopatológicas de pele dos cães com LV observou-se um padrão inflamatório predominantemente linfocitoplasmocitário. O infiltrado inflamatório era difuso e/ou focal peri-anexial. Havia presença de glândulas sudoríparas dilatadas, paraceratose, dilatação do bulbo folicular, edema de células epiteliais, vasculite e presença de granulomas na região sub-epidérmica. De um modo geral, com poucas variações na natureza, distribuição e extensão das lesões, tais alterações histopatológicas são decorrentes da ação direta do parasita na derme ou da deposição de complexo imune, comumente observadas no curso da LVC (Santos et al., 2004; Solano-Gallego et al., 2004; Giunchetti et al., 2006).

No fígado, os achados de hipertrofia e hiperplasia de células de Kupffer e infiltrado linfocitoplasmocitário, bem como a presença de granulomas intralobular, na zona 3 do lóbulo hepático e periportal, caracterizam a hepatopatia determinada pela LVC, como tem sido descrito por outros autores (Genaro, 1993; Tafuri et al., 1996; Tafuri et al., 2001; Sant'Ana; 2007). Cabe destacar que a hipertrofia e hiperplasia de células de Kupffer parecem

ser bons marcadores da lesão hepática na LVC, pois tais lesões eram significativamente mais acentuadas nos animais infectados do que nos controles.

O baço quando afetado pela *Leishmania*, mantém a infecção 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 afecção (Carrion et al., 2006; Wilson et al., 1996; Reis et al., 2009). No presente estudo, depleção de folículos, infiltrado inflamatório da cápsula e congestão, foram as alterações mais severas. Tais alterações estão contempladas no contexto das alterações mais encontradas na LVC (Reis et al., 2009; Santana et al., 2008). Uma lesão muito freqüentemente relatada, é a presença de granuloma, que no baço, pelo menos em modelo experimental, parece não está associada ao controle da infecção (Lemos et al., 2000). Nos animais infectados deste estudo, granulomas foram pouco encontrados, o que está de acordo com os resultados encontrados pelo autor acima referenciado, pois os animais apresentavam diferentes estágios clínicos de evolução da doença.

A linfadenopatia encontrada na LVC é determinada por alterações histológicas como hiperplasia folicular e uma marcante hipertrofia e hiperplasia de macrófagos medulares (cordões e seios) associados a linfadenite capsular e inflamação dos seios subcapsulares (Lima et al., 2004). A análise dos linfonodos dos animais infectados, a linfadenopatia era decorrente dessas alterações. Os autores relataram que as principais alterações foram encontradas nos linfonodos axilares, devido a sua posição anatômica drenar as regiões cutâneas e subcutâneas da cabeça e orelha. Muito embora não tenhamos feito uma análise histopatológica de todos os linfonodos superficiais dos nossos animais infectados, clinicamente foi observado que a linfadenopatia foi mais freqüente nos linfonodos poplíteos. Estes linfonodos, pelo fácil acesso, podem ser considerados como um parâmetro importante no diagnóstico clínico da LV.

Ao analisar o parasitismo em pele, fígado, baço e linfonodo poplíteo, encontramos um maior número de leishmanias no linfonodo poplíteo, sendo que a maior freqüência de amastigotas encontradas foi na pele da orelha. O parasitismo nesses dois órgãos apresentou uma correlação positiva. Estes achados evidenciam que o linfonodo é um órgão importante no diagnóstico da LVC e sugere que o mesmo pode ser tomado como parâmetro para estimar a capacidade de transmissão de leishmânia para o vetor, muito embora pesquisas mais aprofundadas neste sentido devam ser realizadas. Em outros estudos, pele e baço são os principais sítios de uma alta densidade parasitária durante a evolução da LVC (Reis et al., 2006), entretanto a carga parasitária em medula óssea e baço está mais relacionada com o

quadro clínico da LVC (Reis et al., 2009), o que difere, de algum modo, dos resultados apresentados neste trabalho, pois esses órgãos não foram os mais parasitados.

Sabendo que os fatores de crescimento também estão relacionados à modulação da infecção por leishmânia e que IGF-I promove aumento no parasitismo em camundongos BALB/c com aumento do infiltrado inflamatório (Goto et al., 1998; Gomes et al., 2000) na leishmaniose cutânea, buscamos ampliar esses estudos em nossos cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

Observamos que nos animais com LV os níveis séricos de IGF-I estavam diminuídos em relação ao controle. A avaliação das concentrações de IGF-I em cães com doença hepática infecciosa e neoplásica revelou que os cães que apresentavam hepatopatias tinham uma diminuição significativa de IGF-I quando comparado aos animais saudáveis e animais com doenças que não afetavam o fígado (Neumann et al., 2007). Isso demonstra que os níveis séricos de IGF-I circulantes são determinados primariamente pelo fígado (Schimpff et al., 1976; Han et al., 1988; Yakar et al., 2005). Sabe-se que na LVC o fígado é um dos principais órgãos afetados pela doença, o que foi demonstrado nos resultados deste trabalho. O quadro mais severo, encontrado nos animais com quadro clínico mais intenso, justifica os níveis séricos diminuídos em relação ao grupo controle não infectado.

Comparando as concentrações de IGF-I no soro de pacientes com as formas cutânea, muco-cutânea e disseminada, foi observado que nesses indivíduos os níveis de IGF-I eram significativamente menores em relação ao grupo controle. Além disso, foi verificado que os casos com a forma cutânea apresentavam níveis de IGF-I significativamente maiores do que aos outros tipos de leishmaniose cutânea (muco-cutânea e disseminada), sugerindo que a participação desse fator de crescimento seja importante nessa forma de leishmaniose. De modo semelhante, também, foi observado que pacientes com LV ativa apresentaram níveis séricos de IGF-I significativamente diminuídos em relação a LV curada e ao grupo controle (Vendrame et al, comunicação pessoal).

Ao avaliar a expressão de mRNA de IGF-I em pele, fígado, baço e linfonodo poplíteo pode-se constatar que tanto em pele (orelha e ungueal anterior) quanto em baço e fígado, havia uma maior expressão de IGF-I nos cães infectados quando comparados aos controles. Embora o IGF-I seja um fator que age diretamente sobre as formas promastigotas e amastigotas de leishmânia (Goto et al. 1998), existem outros fatores intrínsecos do hospedeiro que podem influenciar a produção desse fator de crescimento, como as citocinas. Assim, a expressão de IGF-I, principalmente por macrófagos, é desencadeada por um conjunto específico de citocinas que levam a um aumento do mesmo durante o processo infeccioso.

Citocinas de perfil Th1, principalmente IFN- $\gamma$ , diminuem a expressão de IGF-I, notadamente em macrófagos. Enquanto que citocinas de perfil Th2, principalmente IL-4 e IL-13, estimulam a expressão de IGF-I (Wynes e Riches, 2003). Os animais que apresentaram níveis elevados de IGF-I apresentavam manifestações clínicas de LV, portanto expressavam, provavelmente, perfil de citocinas do tipo Th2.

Estes resultados revelaram, também, que existe diferença na expressão de IGF-I “in situ” e sérico na LVC, provavelmente, pela predominância das citocinas secretadas, como resposta imunológica geral do organismo do animal, que atuam sobre os vários órgãos aumentando a expressão de IGF-I, em relação a lesão das células hepáticas que estariam comprometendo a secreção de IGF-I.

Quando avaliamos o IGF-I de forma isolada nos animais infectados, pelo número de sinais clínicos, observamos que os níveis de IGF-I estavam mais elevados nos animais com menos sinais clínicos, provavelmente naqueles animais que estavam numa fase mais recente da infecção, sugerindo que a participação desse fator de crescimento possa contribuir para o estabelecimento da infecção. Já nos animais com quadro clínico mais severo, observamos uma queda significativa de IGF-I nos órgãos analisados, à exceção do fígado. Esses resultados talvez estejam relacionados ao estado nutricional desses animais, pois em estudos realizados por Gomes et al. (2007) em pacientes com LV ativa, que apresentavam um estado nutricional deficiente, os mesmos tinham uma redução significativa nos níveis séricos de IGF-I. Assim, nos nossos cães infectados com seis e oito sinais clínicos, verificou-se uma marcada deficiência nutricional, talvez sendo essa a causa dos níveis mais baixos de IGF-I.

A expressão de IGF-I no linfonodo poplíteo dos animais infectados foi menor do que nos animais controles. Mas, como a linfadenopatia é uma das manifestações precoces da LVC, IGF-I pode estar relacionado com a instalação da infecção, vindo a seguir um aumento da carga parasitária, exacerbação da lesão, com doença bem estabelecida, e diminuição subsequente da secreção de IGF-I, indicando que IGF-I não possui ação tardia em linfonodo de cão com LV, como tem sido observado em outros estudos realizados (Gomes et al. 1997; Gomes et al., 1998; Goto et al., 1998).

Na LVC o perfil de citocinas ainda não está bem definido, principalmente nos animais com a infecção ativa, onde esse perfil é caracterizado por uma resposta mista Th1/Th2 (Pinelli et al., 1999; Santos-Gomes et al., 2002; Carrillo e Moreno, 2009). Portanto, os nossos resultados em relação à expressão de IGF-I nos órgãos analisados demonstraram a importância desse fator, mesmo sem conhecimento prévio das citocinas presentes em cada compartimento, pois IGF-I foi detectado em níveis maiores nos animais infectados

comparados ao grupo controle não infectado. Estes resultados encontram respaldo em trabalho realizado com animais BALB/c infectados por formas amastigotas ou promastigotas de *L. (L.) major* e de C57BL/6 infectados por promastigotas onde, mesmo na ausência do estímulo por citocinas, foi observado aumento na expressão de RNA de IGF-I em macrófagos em comparação ao controle não infectado (Assis, 2008). Cabe destacar, ainda, que mesmo em uma amostra pequena de animais já foi possível detectar esse aumento na expressão de IGF-I nos cães infectados. Isso é interessante, pois esse fator de crescimento tem uma grande variabilidade de expressão em animais com idades, raça e sexo diferentes (Eigenmann et al., 1984).

Nossos resultados sugerem que, observando-se expressão maior de IGF-I em órgãos onde há proliferação de parasitos e menor onde isto não ocorre (linfonodo), é um fator da imunidade inata importante no desenvolvimento da LVC e que estudos mais aprofundados poderão contribuir para um entendimento maior da patogenia da LVC.

## 2.5 CONCLUSÕES

- ➔ Animais infectados apresentaram níveis séricos de IGF-I menor em relação aos cães controle não infectados;
- ➔ Animais com LV apresentam uma maior expressão de IGF-I em pele, baço e fígado. Neste último órgão pode está associada à proliferação de células de Kupffer;
- ➔ Linfonodo poplíteo de animais infectados tem uma expressão de IGF-I menor quando comparado aos animais controles não-infectados;
- ➔ A expressão de IGF-I pode estar associada ao estabelecimento da doença;
- ➔ A expressão de IGF-I aumenta com a intensidade das manifestações clínicas até o estabelecimento da infecção;
- ➔ Na doença avançada IGF-I tem sua expressão reduzida;
- ➔ Lesões de pele e linfadenopatia foram os principais achados clínicos nos animais infectados;
- ➔ Há uma correlação positiva entre o parasitismo na pele e linfonodo poplíteo de cães infectados.

## 2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, M.A., Jesus, E.E., Sousa-Atta, M.L., Alves, L.C., Berne, M.E., Atta, A.M., 2005. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet. Parasitol.* 127, 227–232.
- 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.
- Assis, F.P., 2008. Participação do fator de crescimento insulina símile (IGF)-I na imunidade específica na infecção por *Leishmania (L.) major*. Dissertação. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 89p.
- Baneth, G., 2006. Leishmaniasis. In: Greene, C.E. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3a ed. Canada: Saunders Elsevier, p.685-698.
- Brandonisio, O., Carelli, G., Altamura M., Varvara, B., Ceci, L., 1990. Circulating immune complexes and autoantibodies in canine leishmaniasis. *Parasitol.* 32, 275-281.
- Cardoso, L., Cabral, M., 1998. *Leishmania* and canine Leishmaniasis. *Rev. Port. C. Vet.* XCIII (527), 122–141.
- Carrillo, E., Moreno, J., 2009. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128, 67-70.
- 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.
- Dantas-Torres, F.; Brandão-Filho, S. P., 2006. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 3, 151-156.
- Deplazes, P., Smith, N.C., Arnold, P., Lutz, H., Ecker, J., 1995. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol.* 17, 451-458.
- Eigenmann, J. E., Patterson, D.F., Zapf, J., Froesch, E.R. 1984. Insulin like growth factor in the dog: A study in different dog breeds and in dogs with growth hormone elevation. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 105, 294–301.

- Genaro, O. 1993. Leishmaniose visceral canina experimental. Tese Doutorado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. 202p.
- Giunchetti, R.C., Mayrink, W., Genaro, O., Carneiro, C.M., Corrêa-Oliveira, R., Martins-Filho, O.A., Marques, M.J., Tafuri, W.L., Reis, A.B. 2006. Relation between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J. Comp. Path.* 135, 100-107.
- Gomes, C.M., Giannella-Neto, D., Gama, M.E.A., Pereira, J.C., Campos, M.B., Corbett, C.E.P., 2007. Correlation between the components of the insulin-like growth factor I system, nutritional status and visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 101, 660-667.
- Gomes, C.M., Goto, H., Ribeiro da Matta, V.L., Laurenti, M.D., Gidlund, M., Corbett, C.E., 2000. Insulin-like growth factor (IGF)-I affects parasite growth and host cell migration in experimental cutaneous leishmaniasis. *Int. J. Exp. Pathol.* 81, 249-55.
- Gomes, C.M.C., Goto, H., Corbett, C.E.P., Gidlund, M., 1997. Insulin-like growth factor (IGF)-I is a growth promoting factor for *Leishmania* promastigotes. *Acta Trop.* 64, 225-228.
- Gomes, C.M.C., Monteiro, H.P., Gidlund, M., Corbett, C.E., Goto, H., 1998. Insulin-like growth factor (IGF) – I induces phosphorylation in *Leishmania* (*Leishmania*) *mexicana* promastigotes and amastigotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 45, 352-355.
- Gontijo, C.M.F., Melo, M.N., 2004. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.*, 7, 338-349.
- Goto, H., Gomes, C.M.C., Corbett, C.E.P., Monteiro, H.P., Gidlund, M., 1998. Insulin-like growth factor I is a growth promoting factor for *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Proc. Nat. Acad. Sci. of the USA.* 95, 13211-13216.
- Han, V.K., Lund, P.K., Lee, D.C., D'Ercole, A.J., 1988. Expression of somatomedin/insulin-like growth factor messenger ribonucleic acids in the human fetus: identification, characterization, and tissue distribution. *J. Clin. Endocr. Metabol.* 66, 422–429.
- Hommel, M., Jaffe, C.L., Travi, B., Milon, G., 1995. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 86, 55-73.
- 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.
- Lima, W.G., Michalick, M.S.M., Melo, M.N., Tafuri, W.L., Tafuri, W.L., 2004. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Trop.* 92, 43-53.
- Luna, G.L., 1968. Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. New York McGraw Hill, 285p.
- Marzochi, M.C., Coutinho, S.G., De Souza, W.J., De Toledo, L.M., Grimaldi Jr., G., Momen, H., Pacheco, R., Da, S., Sabroza, P.C., De Souza, M.A., Rangel Jr., F.B., 1985. Canine

visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977–1983). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 80, 349–357.

Mauricio, I.L., Stothard, J.R., Miles, M.A., 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol. Today* 16, 188–189.

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

Neumann, S., Welling, H., Thuere, S., 2007. Insulin-like growth factor I concentration in dogs with inflammatory and neoplastic liver diseases. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.* 54, 612-617.

Palatnik-de-Sousa, C.B., Santos, W.R., França-silva, J.C., Da costa, R.T., Reis, A.B., Palatnik, M., Mayrink, W., GENARO, O., 2001. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am. J. trop. Med. Hyg.* 65, 510-517.

Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 2002-2007.

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*. *Infect. Immun.* 62, 229-235.

Pinelli, E., Van der Kaaji, S.Y., Slappendel, R., Fragio, C., Ruitenber, E.J., Bernadina, W., Rutten, V.P.M.G., 1999. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 69, 121-126.

Qi, H., Ji, J., Wanasen, N., Soong, L., 2004. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.*, 72, 988-995.

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.

Rethinger, R., Davies, C.R., 1999. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61, 530-541.

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.

- Sant'ana, J.A.P., Lima, W.G., Oliveira, M.R., Simões, L.A., Michalick, M.S.M., Melo, M.N., Tafuri, W.L., Tafuri, W.L., 2007. Hepatic granulomas in canine visceral leishmaniasis and clinical status. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59, 1137-1144.
- 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.
- Santos, L.R., Barrouin-Melo, S.M., Chang, Y.; Olsen, J.; Mcdonough, S.P.; Quimby, F., 2004. Recombinant single-chain canine interleukin 12 induces interferon gamma mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of dogs with visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 98, 43-48.
- Santos-Gomes, G. M., Campino, L., Arranches, P., 2000. Canine Experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95, 193-198.
- Santos-Gomes, G.M., Rosa, R., Leandro, C., Cortes, S., Romao, P., Silveira, H., 2002. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 88, 21–30.
- Schimpff, R.M., Donnadieu, M., Glasnovic, J.C., 1976. The liver as a source of somatomedin. *Acta Endocrinol.* 83, 365–372.
- Silva, F. S., 2007. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Revista tropica – Ciências Agrárias e Biológicas.* 1, 20-31.
- Solano-Gallego, L., Fernandez-Bellon, H., Morell, P., Fondevila, D., Alberola, J., Ramis, A., Ferrer, L., 2004. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *J. Comp. Pathol.* 130, 7-12.
- Strauss-Ayali, D., Baneth, G., Jaffe, C.L., 2007. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. *Vet. Res.* 38, 547–564.
- Tafuri, W.L., Oliveira, M.R., Melo, M.N., Tafuri, W.L., 2001. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet. Parasitol.* 96, 203-212.
- Tafuri, W.L., Tafuri, W.L., Barbosa, A.J.A., Michalick, M.S., Genaro, O., Franca-Silva, J.C., Mayrink, W., Nascimento, E. 1996. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 38, 81-89.
- Vendrame, C.M.V., Carvalho, M.D.T., Rios, F.J.O., Manuli, E.R., Pettito-Assis, F., Goto, H., 2007. Effect of insulin-like growth factor-I on *Leishmania amazonensis* promastigote arginase activation and reciprocal inhibition of NOS2 pathway in macrophage in vitro. *Scand. J. Immunol.* 66, 287-296.

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

Wynes, M.W., Riches, D.W.H., 2003. Induction of macrophage insulin-like growth factor-I expression by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J. Immunol.* 171, 3550-3559.

Yakar, S., Pennisi, P., Wu, Y., Zhao, H., LeRoith, D., 2005. Clinical relevance of systemic and local IGF-I. *Endocr. Dev.* 9, 11–16.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. *Advances Parasitology*, v. 57, p. 1-88, 2004.

ANTUNES, J. E. L. et al. A importância da raposa *Cercopithecus thomasi* na transmissão de *Leishmania chagasi* em Teresina. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 42., 2006, Teresina. *Resumos...* Teresina: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2006. p.115.

ARAGÃO, L. V. O.; DOURADO, J. C. L.; PACHECO, J. J. Leishmaniose visceral em Teresina-PI 1995-2006 avaliação da eliminação de cães soropositivos como medida de controle. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, 35., 2008, Gramado. *Anais eletrônicos...* Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2008. Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0587-1.pdf>> Acesso em: 08 jan. 2010.

ARAÚJO, A. S.S. Calazar: Relato e Análise dos Trabalhos de Controle da Epidemia em Teresina-PI, 1995 (Espec; Monog).

BERRAHAL, F. et al. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 55, p. 273-277, 1996.

BRAGA, M. D. et al. Control of canine visceral leishmaniasis: 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.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Brasília, DF, 2006.

BRITO, F. L. C. et al. Uveitis associated to the infection by *Leishmania chagasi* in dog from Olinda city, Pernambuco, Brazil. *Ciência Rural*, v. 34, p. 925-929, 2004.

CABRAL, M. et al. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology*, v. 76, p. 173-189, 1998.

CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 128, p. 67-70, 2009.

- CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *The Veterinary Record*, v.141, p. 539-543, 1997.
- CLARK, R. The somatogenic hormones and insulin-like growth factor-1: stimulators of lymphopoiesis and immune function. *Endocrine Reviews*, v. 18, p. 157-179, 1997.
- COSTA, C. H. N. Are dogs important reservoirs of visceral leishmaniasis? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 30, p. 155, 1997.
- COSTA, C. H. N. et al. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. *Journal of Infectious Disease*, v. 182, p. 997-1000, 2000.
- COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. *Revista Saúde Pública*, v. 24, p. 361-72, 1990.
- 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.
- DEPLAZES, P. et al. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunology*, v. 17, p. 451-458, 1995.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis. *Annals of tropical medicine and parasitology*, v. 97, p. 3-15, 2003.
- FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. From canine leishmaniasis update. In: PROCEEDINGS OF A CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. *Anais ... Barcelona*, 1999. Disponível em:  
<[http://www.scalibor.it/descargas/sumarios/Congressi\\_04.pdf](http://www.scalibor.it/descargas/sumarios/Congressi_04.pdf)> Acesso em: 08 jan. 2010.
- FERRER, L. M. et al. Identifications of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. *Review Veterinary Science*, v. 44, p. 194, 1988.
- GARCIA-NAVARRO, C.E.K.; PACHALY, J.R. *Manual de hematologia veterinária*, São Paulo: Livraria Varela Ltda, 1994. 169 p.
- GOMES, C. M. C. et al. Insulin-like growth factor (IGF) – I induces phosphorylation in *Leishmania (Leishmania) mexicana* promastigotes and amastigotes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 45, p. 352-355, 1998.

GOMES, C. M. C. et al. Insulin-like growth factor (IGF)-1 is a growth promoting factor for *Leishmania* promastigotes. *Acta Tropica*, v. 64, p. 225-228, 1997.

GOMES, R. B. et al. Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 101, p. 127-133, 2007.

GOMES, C.M. et al. Insulin-like growth factor (IGF)-I affects parasite growth and host cell migration in experimental cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Experimental Pathology*. v. 81, p. 249-55, 2000.

GOTO, H. et al. Insulin-like growth factor I is a growth promoting factor for *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, p. 13211-13216, 1998.

GRIMALDI JR, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 6, p. 230–250, 1993.

HOMMEL, M. et al. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Annals of tropical medicine and parasitology*, v. 86, p. 55-73, 1995.

HUMBEL, R. E. Insulin like growth factors I and II. *European Journal of Biochemistry*, v. 190, p. 445-462, 1990.

JONES, J. I.; CLEMONS, D. R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Reviews*, v. 16, p. 3–34, 1995.

KANEKO, J.J. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. San Diego: Academic Press, 4 ed. 1989, 932 p.

KEENAN, C. M. et al. Visceral leishmaniasis in the German Shepherd dog-I. Infection. Clinical disease and Clinical Pathology. *Veterinary Pathology*, v. 21, p. 74-79, 1984.

KOOIJMAN, R.; HOOGHE-PETERS, E. L.; HOOGHE, R. Prolactin, growth hormone and insulin-like growth factor-I in the immune system. *Advances in Immunology*, v. 63, p. 377–453, 1996.

KRATZ, G et al. Mitogen activity of insulin-like growth factor (IGF) I and II and IGF binding protein-1 on cultured human keratinocytes and fibroblasts. *Experimental Cell Research*, v. 202, p. 381–385, 1992.

KRATZ, G.; GIDLUND, M. Insulin like growth factor-1 and-2 and their role in the re-epithelialisation of wounds; interactions with insulin-like growth factor binding protein type 1. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery*, v. 28, p. 107–112, 1994.

KRAUSPENHAR, C. et al. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, v. 37, p. 907-910, 2007.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: LAINSON, R.; SHAW, J. J. *The leishmaniasis*. London: Academic Press, p. 1-120, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World Leishmaniasis the Neotropical *Leishmania* Species. In: COX, F. E. G.; KREIER, J. P.; WAKELIN, D. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, Vol. 5, Parasitology, 9. ed. London: Arnold, p. 242-266, 1998.

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.

LARANGEIRA, D. L. *Avaliação da imunidade humoral e celular em cães naturalmente infectados com Leishmania (L.) chagasi e sua correlação com transmissibilidade do vetor*. 2008. 79 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LAURENTI, M. D. et al. The role of complement in the acute inflammatory process in the skin and in host-parasite interaction in hamsters inoculated with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 77, p. 15-24, 1996.

LE ROITH, D. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors. *The New England Journal of Medicine*, v. 336, p. 633-634, 1997.

LIMA, W. G. et al. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta tropica*, v. 92, p. 43-53, 2004.

LINHARES, G. F. C. et al. Relato de um caso clínico de leishmaniose visceral em um cão na cidade de Goiânia. *Revista de Patologia Tropical*, v. 34, p. 69-72, 2005.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil- Emerging Anthroponosis and Possibilities of their Control. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 10, p. 359-378, 1994.

MATTOS JR, D. G. et al. Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 56, p. 199-122, 2004.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today*, v. 16, p. 188–189, 2000.

MENDONÇA, I. L. et al. *Cerdocyon thous* infectada com *Leishmania* nos arredores de Teresina. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 39., 2003, Belém. *Resumos...* Belém: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2003. p. 348.

MONTEIRO, P. S.; LACERDA, M. M.; ARIAS, J. R. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 27, p. 64-72, 1994.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, v. 18, p. 399-405, 2002.

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infectious Immunology*, v. 62, p. 229-235, 1994.

PINELLI, E. et al. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.69, p.121-126, 1999.

QI, H. et al. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity*, v. 72, p. 988-995, 2004.

RECHLER, M. M.; NISSLEY, S. P. Insulin-Like Growth Factors in Peptide Growth Factors and Their Receptor. In: SPORN, B.; ROBERTS, A. B. *Handbook of Pharmacology*, 1990, p. 263-282.

REINER, L. S.; LOCKSLEY, R. M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annual Review of Immunology*, v. 13, p. 151-177, 1995.

REIS, A. B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*, v. 81, p. 68–75, 2006

REIS, A. B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 128, p. 87-95, 2009.

REY, L. *Bases da parasitologia médica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 379 p.

RIBEIRO, V. M. et al. Alternativa para tratamento de cães idosos e/ou portadores de insuficiência renal crônica acometidos de leishmaniose visceral e a infectividade da pele destes animais durante o tratamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 1999, Águas de Lindóia. *Anais... Águas de Lindóia: Associação nacional de clínicos veterinários de pequenos animais*, 1999. p. 27.

RIDLEY, D. S. Pathology. In: PETERS, W.; KILLICH-KENDRICK, R. (eds). *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press, 1987. p. 670-680.

RIVAS, L. et al. Virulence and disease in leishmaniasis: what is relevant for the patient? *Trends in parasitology*, v. 20, p. 297–301, 2004.

SACKS, D. L.; LOUIS, J. A.; WIRTH, D. F. Leishmaniasis. In: WARREN, K. S. *Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infection*, 3. ed. Boston: Blackwell, 1993. p. 237–268.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Review Immunology*, v. 2, p. 845-858, 2002.

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.

SANTOS-GOMES, G. M.; CAMPINO, L.; ARRANCHES, P. Canine Experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 193-198, 2000.

SANTOS-GOMES, G.M. et al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 88, p. 21–30, 2002.

- SHANKAR, A; TITUS, R. G. T cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 181, p. 845-855, 1995.
- SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Revista tropica – Ciências Agrárias e Biológicas*, v. 1, p. 20-31, 2007.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, p. 560-563, 2001.
- 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.
- TESH, R. B. Control of zoonotic Leishmaniasis: is it time to change strategies? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 52, p. 287-292, 1995.
- TRAVI, B. L. et al. Canine visceral leishmaniasis in colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 64, p.119-124, 2001.
- VENDRAME, C. M. V. et al. Effect of insulin-like growth factor-I on *Leishmania amazonensis* promastigote arginase activation and reciprocal inhibition of NOS2 pathway in macrophage *in vitro*. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 66, p. 287-296, 2007.
- VERÇOSA, B. L. et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. *BMC Veterinary Research*, v. 4, p. 1-7, 2008.
- WERNEK, G.L. et al. Avaliação da efetividade das estratégias de controle da leishmaniose visceral na cidade de Teresina, Estado do Piauí, Brasil: resultados do inquérito inicial – 2004\*. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 17, p. 87-96, 2008.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços. Disponível em: <[http://www.who.int/leishmaniasis/en\\_](http://www.who.int/leishmaniasis/en_)>. Acesso em 8 de janeiro de 2010.
- WYNES, M. W.; RICHES, D. W. H. Induction of macrophage insulin-like growth factor-I expression by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *The Journal of Immunology*, v. 171, p. 3550-3559, 2003.

## Apêndice 1

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 ( )
Coriza: Sim ( ) Não ( ) Tosse: Sim ( ) Não ( ) Epistaxe: Sim ( ) Não ( ) Espirro: Sim ( ) Não ( )
Dispneia: 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: _____
_____
_____

## ANEXO

## Valores hematológicos e bioquímicos de referência para cães

---

Leucócitos totais (mm <sup>3</sup> )	6-17 milhões
Albumina (g/dl)	2,6-3,3 g/dl
Globulina (g/dl)	2,7-4,4 g/dl
TGO (U/l)	10-30 U/l
TGP (U/l)	5-35 U/l

---

Segundo Garcia-Navarro & Pachaly (1994) e Kaneko, 1989